

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ имени А.Н. БАХА**

На правах рукописи

Матюшенко Александр Михайлович

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
МЫШЕЧНЫХ ИЗОФОРМ Trpm 1.1 И Trpm 2.2 РЕКОМБИНАНТНОГО
ТРОПОМИОЗИНА ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор Д. И. Левицкий

Москва – 2017

Оглавление

Список сокращений	5
Введение	6
1. Обзор литературы	13
1.1. Общие сведения о структуре и свойствах тропомиозина	13
<i>Распространение тропомиозина и многообразие его функций. Новая номенклатура изоформ тропомиозина.</i>	13
<i>Структура молекулы Трт и принципы ее формирования.</i>	16
<i>Актин – основной партнер тропомиозина. Структура комплекса Трт с актином.</i>	20
<i>Функциональные свойства тропомиозина: участие в регуляции мышечного сокращения</i>	24
1.2. Центральная часть молекулы тропомиозина и ее особенности	25
<i>Кластеры дестабилизации в центральной части Трт или что в ней особенного.</i>	25
<i>Механизм дестабилизации центральной части Трт и зачем это нужно.</i>	27
1.3. Наследственные заболевания, ассоциированные с точечными мутациями в генах тропомиозина	28
<i>Морфологические особенности и многообразие заболеваний, ассоциированных с мутациями в генах Трт.</i>	28
<i>Гены Трт, в которых обнаружены кардиомиопатические и миопатические мутации. Неоднородность распределения мутаций.</i>	32
<i>Предполагаемые механизмы развития наследственных заболеваний мышц, ассоциированных с мутациями в генах тропомиозина.</i>	34
<i>Некоторые конкретные аминокислотные замены в молекуле Трт</i>	39
1.4. Гетеродимеры тропомиозина – одна из важных форм его существования	42
<i>Виды существующих в мышцах гетеродимеров Трт и их распределение.</i>	42
<i>Методы получения гетеродимеров Трт in vitro и подходы к их изучению.</i>	
<i>Структурно-функциональные особенности $\alpha\beta$-гетеродимеров Трт.</i>	43
<i>Гетеродимеры и гомодимеры Трт с мутациями лишь в одной из двух цепей. Почему это так важно изучать.</i>	43
2. Материалы и методы исследования	45
2.1. Получение препаратов белков	45
<i>Сайт-направленный мутагенез.</i>	45
<i>Экспрессия рекомбинантного тропомиозина в клетках E. coli.</i>	48
<i>Выделение и очистка Трт методом ионообменной хроматографии.</i>	49

<i>Выделение и очистка Трт методом металло-аффинной хроматографии.</i>	50
<i>Формирование гетеродимеров Трт и его гомодимеров с мутацией в одной из двух цепей.</i>	50
<i>Получение других белков, используемых в работе.</i>	51
2.2. Методы, использованные для анализа структуры молекулы тропомиозина	52
<i>Спектроскопия кругового дихроизма (КД).</i>	52
<i>Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)</i>	52
<i>Температурные зависимости эксимерной флуоресценции пиренил-меченого Трт</i>	54
2.3. Методы исследования функциональных свойств тропомиозина	55
<i>Исследование взаимодействия Трт с F-актином методом соосаждения</i>	55
<i>Определение температурных зависимостей диссоциации комплексов Трт с F-актином по изменениям светорассеяния.</i>	55
<i>Определение АТФазной активности S1 в присутствии реконструированных тонких филаментов.</i>	56
<i>Измерение вязкости растворов Трт.</i>	57
<i>Эксперименты в искусственной подвижной системе (ИПС, in vitro motility assay).</i>	57
<i>Измерения, выполненные в оптической ловушке.</i>	59
2.4. Другие аналитические методы	59
<i>Определение концентрации белков спектрофотометрическим методом</i>	59
<i>SDS-гель электрофорез</i>	60
3. Результаты и их обсуждение	61
3.1. Исследования центральной части молекулы Трт.	61
<i>Структурные исследования.</i>	62
<i>Функциональные исследования</i>	77
3.2. Структурно-функциональные исследования рекомбинантных препаратов Трт с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим и миопатическим мутациям в генах Трт.	93
<i>Исследования препаратов Трт с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим мутациям в генах Трт.</i>	93
<i>Исследования препаратов Трт с аминокислотными заменами, соответствующими миопатическим мутациям в генах Трт.</i>	102
3.3. Исследования гетеродимеров и гомодимеров Трт с аминокислотными заменами в одной из двух цепей молекулы.	107
<i>Структурно-функциональные исследования $\alpha\beta$-гетеродимеров Трт с аминокислотными заменами в α-цепи и $\alpha\alpha$-гомодимеров Трт с заменами лишь в одной из двух α-цепей.</i>	108

<i>Структурно-функциональные исследования $\alpha\beta$-гетеродимеров Trp с аминокислотными заменами в β-цепи.</i>	114
Заключение	118
Список используемой литературы	121

Список сокращений

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

КД – круговой дихроизм

ИПС – искусственная подвижная система

Тpm – тропомиозин

ТЕМЕД – N,N,N',N'-Тетраметилэтилендиамин

ПСА – персульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СС – coiled-coil

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

DMF – N,N-диметилформамид

DTT – дитиотреитол

β -МЭ – 2-меркаптоэтанол

EGTA – этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота

F-актин – фибриллярный актин

IP TG – изопропилтиогалактозид

Нерес - 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота

PMSF – фенилметилсульфонил фторид

S1 – субфрагмент 1 миозина

SDS – додецилсульфат натрия

Тpm 1.1 – изоформа Тpm, соответствующая изоформе α -Тpm по старой номенклатуре

Тpm 2.2 – изоформа Тpm, соответствующая изоформе β -Тpm по старой номенклатуре

Тpm 3.1 – изоформа Тpm, соответствующая изоформе γ -Тpm по старой номенклатуре

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

Введение

Актуальность темы. Данная работа посвящена тропомиозину (Трм) – актин-связывающему белку, который широко представлен во многих животных организмах, а у человека присутствует во всех тканях. Он относится к семейству белков, называемых coiled-coil (СС), и имеет относительно простую структуру, состоящую из 2-х α -спиралей, формирующих димерную функциональную единицу. Благодаря концевым взаимодействиям между такими димерами, Трм способен формировать протяженный тяж, который расположен вдоль поверхности актинового филамента. Несмотря на кажущуюся простоту своей структуры, Трм способен выполнять множество функций, список которых растет с каждым годом. На данный момент, ему приписывают способность к дискриминации функций актинового цитоскелета в животной клетке, отводя ему роль своеобразного «привратника», определяющего с какими партнерами будет взаимодействовать актиновый филамент и в какой мере. На сегодняшний день в организме млекопитающих удалось обнаружить порядка 40 изоформ Трм. Однако это число может оказаться не окончательным, и вполне возможно появление новых изоформ Трм. По всей видимости, подобное многообразие тесно связано с многообразием функций тропомиозина и его обширным интерактомом. Данная работа посвящена одной из самых важных и наиболее известной функции тропомиозина – его участию в регуляции мышечного сокращения. Поэтому в нашей работе рассматривались только мышечные изоформы Трм. Так, для поперечно-полосатой мышечной ткани основными изоформами Трм являются Трм 1.1, Трм 2.2 и Трм 3.1. Изоформа Трм 1.1 (α -Трм по старой номенклатуре) является основной изоформой сердечной ткани и широко представлена в быстрых скелетных мышцах. Трм 2.2 (β -Трм) является одной из основных изоформ скелетно-мышечной ткани как в ее быстрых, так и в медленных волокнах, а также может в минорном количестве присутствовать в сердечной мышце. Наконец, третья изоформа Трм (Трм 3.1 или γ -Трм) присутствует в медленных скелетных мышцах. Мы ограничились рассмотрением только изоформ Трм 1.1 и Трм 2.2, наличие которых характерно для быстрых скелетных мышц и сердца.

Отдельного внимания заслуживает структура молекулы Трм, которая представляет собой прекрасный объект для изучения взаимосвязи структура-функция, ввиду своей значительной консервативности и достаточно предсказуемой взаимосвязи между первичной и третичной структурой белка. Подобная предсказуемость детерминирована

особенностью формирования первичной структуры белка. Вся последовательность тропомиозина можно разбить на семичленные повторы – гептады, каждая аминокислота в которых обладает характерными особенностями, необходимыми для построения структуры СС. При этом если остаток должен стабилизировать подобную структуру, то его называют каноническим, если же он, наоборот, дестабилизирует ее, то его называют неканоническим. Молекула Трп состоит в большинстве своем из канонических аминокислотных остатков, но в ее структуре присутствуют также неканонические остатки, приводящие к локальной дестабилизации определенных участков молекулы и имеющие, по всей видимости, функциональное значение.

Одна из таких зон локальной дестабилизации и привлекла наше внимание в этой работе. Речь идет о центральной части молекулы Трп. Она является наименее стабильной в молекуле и, по всей видимости, может играть существенную роль в функционировании Трп. Причины подобной дестабилизации были обнаружены ранее. Оказалось, что в центральной части молекулы Трп сосредоточены несколько неканонических остатков (в частности, D137 и G126), которые вносят существенный вклад в дестабилизацию этой части молекулы, а также ряд аланиновых кластеров, которые в силу малого гидрофобного радикала у остатка Ala не способны к формированию сильных гидрофобных взаимодействий и эффективной стабилизации димера СС. К настоящему времени установлен также механизм локальной дестабилизации, важную роль в котором как раз принимают остатки D137 и G126. Остаток D137 расположен в центре гидрофобного кора молекулы и впервые был обнаружен в лаборатории Лерера (S. Lehrer). Замена неканонического остатка аспартата на канонический лейцин приводила к стабилизации молекулы Трп, что было показано различными методами. К аналогичным последствиям также приводила замена неканонического остатка глицина в положении 126 на канонический остаток аргинина. В предыдущих работах исследователям удалось также рассчитать примерную протяженность зоны дестабилизации, которая составляет около 60–70 аминокислотных остатков. Однако до сих пор не удалось в полной мере определить функциональное значение данной дестабилизации. Поэтому одной из центральных задач нашего исследования стало изучение функциональной роли центральной части молекулы в регуляции мышечного сокращения.

В нашей работе мы также сфокусировали свое внимание на изучении особенностей функционирования Трп при таких патологиях скелетных и сердечной мышц, вызванных единичными аминокислотными заменами в нативной структуре Трп, как наследственные миопатии и их частный случай – кардиомиопатии. Актуальность данной проблематики

трудно переоценить, так как количество мутаций в гене TPM1 (кодирующем сердечную изоформу Trp – Trp 1.1), ассоциированных с развитием кардиомиопатий, составляет более трех десятков. Стоит отметить, что похожее количество мутаций также можно обнаружить в гене TPM2 (кодирующем мышечную изоформу Trp 2.2); такие мутации ассоциированы с развитием миопатий, дистальных артрогрипозов и других мышечных патологий. В нашей работе мы изучали последствия мутаций, приводящих к развитию как кардиомиопатий, так и миопатий.

Особое внимание нашего исследования приковано именно к кардиомиопатиям, в связи с несомненной важностью изучения заболеваний сердца, являющихся едва ли не самой распространенной причиной смертельных исходов, как в России, так и во всем мире. Обращает на себя внимание то, что на сегодняшний день накоплено большое количество данных о мутациях в генах Trp, ассоциированных с тяжелыми заболеваниями сердца, однако изучена из них пока лишь небольшая часть. Мутации, приводящие к кардиомиопатиям, сконцентрированы в изоформе Trp 1.1 – основной изоформе Trp сердечной ткани. С учетом накопления все большего и большего количества свидетельств о новых точечных мутациях в гене TPM1, кодирующем сердечную изоформу Trp 1.1, возникла необходимость в систематизации заболеваний не только по типу патогенеза на уровне тканей (гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии), но и по механизму развития заболевания на молекулярном уровне, что, в свою очередь, должно способствовать лучшему пониманию причин заболевания и развитию стратегии их дальнейшего лечения. В нашей работе мы обращаем внимание на те аминокислотные замены в молекуле Trp, вызванные мутациями в гене TPM1, которые находятся в зоне взаимодействия Trp с тропонином на поверхности актинового филамента, т.к. именно в этой области происходит контакт трех основных белков тонкого филамента (актина, тропомиозина и тропонина), участвующих в сокращении, что, на наш взгляд, может существенно влиять на характер функциональных эффектов таких замен и патогенез заболеваний. Таким образом, одной из основных задач нашего научного исследования являлось также выяснение молекулярного механизма развития кардиомиопатий – тяжелых наследственных заболеваний сердечных мышц, ассоциированных с точечными мутациями в генах Trp.

Еще одной несомненно важной задачей настоящего исследования являлось изучение развития различных тяжелых наследственных патологий скелетной мышцы – миопатий и дистального артрогрипоза. Как и в случае с кардиомиопатиями, абсолютное большинство работ, посвященных подобным мышечным патологиям, носит, как правило,

чисто описательный характер: в них анализируют генотип пациентов с подобными заболеваниями и сопоставляют его с гистологическими изменениями в мышечной ткани. Значительно меньше имеется работ, посвященных влиянию этих мутаций на функцию сократительного аппарата мышц. Что же касается работ, в которых анализировалось бы влияние таких мутаций на структуру и свойства Трм, то их количество на фоне массы медицинских статей исчезающе мало. Таким образом, одной из важных задач этой работы стало выявление тех изменений в структуре и функциях Трм, которые вызываются мутациями в гене Трм, ассоциированными с тяжелыми наследственными заболеваниями, на примере двух аминокислотных замен в молекуле Трм, вызываемых такими мутациями: это замена N202K, ассоциированная с артрогриппозом 2В типа, и замена R133W, ассоциированная с особой формой миопатии. Как нам кажется, это может оказаться чрезвычайно полезным для понимания механизмов развития миопатий и последующей разработки подходов к их коррекции.

Также в нашей работе мы не могли обойти еще один важный аспект изучения последствий различных мутаций в генах Трм, которому в большинстве работ не придают значения. Дело в том, что в мышце значительная часть молекул Трм присутствует в виде гетеродимеров, состоящих из разных изоформ. При этом изоформа Трм 2.2 (β -Трм) присутствует только в виде $\alpha\beta$ -гетеродимера, т.к. ее $\beta\beta$ -гомономер значительно менее стабилен. К огромному сожалению, во всех работах, посвященных развитию миопатий, вызванных мутациями в гене ТРМ2 этой изоформы, свойства Трм изучаются на $\beta\beta$ -гомомерах, несмотря на то, что наиболее адекватной моделью для изучения эффекта миопатий безусловно является $\alpha\beta$ -гетеродимер. Поэтому одной из задач нашего исследования являлось также сравнительное изучение свойств $\beta\beta$ -гомомеров и $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами в β -цепи, вызываемыми такими мутациями в гене ТРМ2.

С учетом всего вышеизложенного **целью** настоящей работы стало изучение структурно-функциональных особенностей различных мышечных изоформ Трм 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 Трм.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие **конкретные задачи**:

1. Установить роль центральной части молекулы Трм 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 Трп с такими заменами.

2. Получить рекомбинантные препараты Трп с аминокислотными заменами, соответствующими миопатическим и кардиомиопатическим мутациям в генах Трп, и изучить структурные и функциональные свойства таких препаратов.
3. Изучить структурные и функциональные свойства препаратов гомо- и гетеродимеров Трп 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 Трп стабилизирует не только эту часть молекулы, но и всю молекулу в целом. Эти изменения в структуре молекулы Трп приводят к стабилизации комплекса Трп с актином и увеличению жесткости тонкого филамента (актинового филамента, содержащего Трп и тропонин). В ходе работы впервые были получены данные об изменениях функциональных свойств Трп, 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 Трп с головкой миозина на поверхности актинового филамента. Получены новые данные о влиянии кардиомиопатических мутаций в генах Трп на структуру и функциональные свойства рекомбинантных препаратов Трп, несущих соответствующие аминокислотные замены в различных частях молекулы.

Научно-практическая значимость работы. Представленные в работе данные расширяют представления о функционировании Трп и о его роли в регуляции мышечного сокращения. В частности, становится понятно, что «природная» нестабильность центральной части молекулы Трп 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 Трп с аминокислотными заменами, ассоциированными с кардиомиопатиями, расширяют представления об их влиянии на сокращение сердечной мышцы и могут быть

в дальнейшем использованы для поиска новых препаратов, направленных на лечение этих наследственных заболеваний.

Методы исследования. В работе были использованы методы генной инженерии и молекулярной биологии для получения рекомбинантных препаратов Тpm с аминокислотными заменами в различных частях молекулы, а также многочисленные современные физико-химические методы исследования белков для анализа структуры и свойств таких препаратов: дифференциальная сканирующая калориметрия, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, вискозиметрия, методы искусственной подвижной системы (ИПС, *in vitro* motility assay) и оптической ловушки, и ряд других.

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 Тpm, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

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 тропониновый 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 Трт, 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 Трт, 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 материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в российских и международных рецензируемых журналах и 24 тезиса в материалах отечественных и международных конференций.

1. Обзор литературы

1.1. Общие сведения о структуре и свойствах тропомиозина

Распространение тропомиозина и многообразие его функций. Новая номенклатура изоформ тропомиозина.

В последнее время все больше растет интерес к исследованиям актин-связывающего белка тропомиозина (Трм). Точнее, это целое семейство актин-связывающих белков, насчитывающее порядка 40 изоформ в тканях млекопитающих [1]. Подобный интерес не случаен. Потрясает многообразие функций, приписываемых Трм в последнее время: показано участие Трм в таких важных процессах, как морфогенез и дифференцировка тканей [2–7], транспорт везикул внутри клетки [8–11], клеточная адгезия [12–15], регуляция сокращения скелетных и сердечных мышц [16–19]. В последнее время все большее признание получает идея о том, что Трм является дискриминатором свойств актинового цитоскелета и определяет если не все его функциональные свойства, то многие из них [1, 20–22]. Эта идея все больше подкрепляется новыми данными о том, что Трм способен регулировать стабильность актинового филамента [23–25] и его динамику [26, 27], а также вовлечен во взаимодействия с другими актин-связывающими белками – как напрямую [28–32], так и опосредованно [33, 34]. Важность Трм для выполняемых клеткой функций подтверждается изменением профиля экспрессии Трм при раковых трансформациях и метастазировании [21, 35–37].

Подобное многообразие функций Трм тесно связано с большим количеством его изоформ (рис. 1). Как видно, Трм является продуктом четырех генов (ТРМ1, ТРМ2, ТРМ3 и ТРМ4) и столь высокое разнообразие его изоформ достигается в основном за счет альтернативного сплайсинга [38]. Сложность изоформного состава, путаница в обозначении различных изоформ, а также возрастающее количество исследований, связанных с Трм, потребовало создания новой классификации, которая была предложена в 2015 году [39]. Удобство этой классификации объясняется тем, что теперь короткое название изоформы Трм содержит в себе ген, с которого она экспрессируется, и ее порядковый номер. Например, название Трм 1.1 указывает на то, что этот белок является продуктом гена ТРМ1, его первой изоформой.

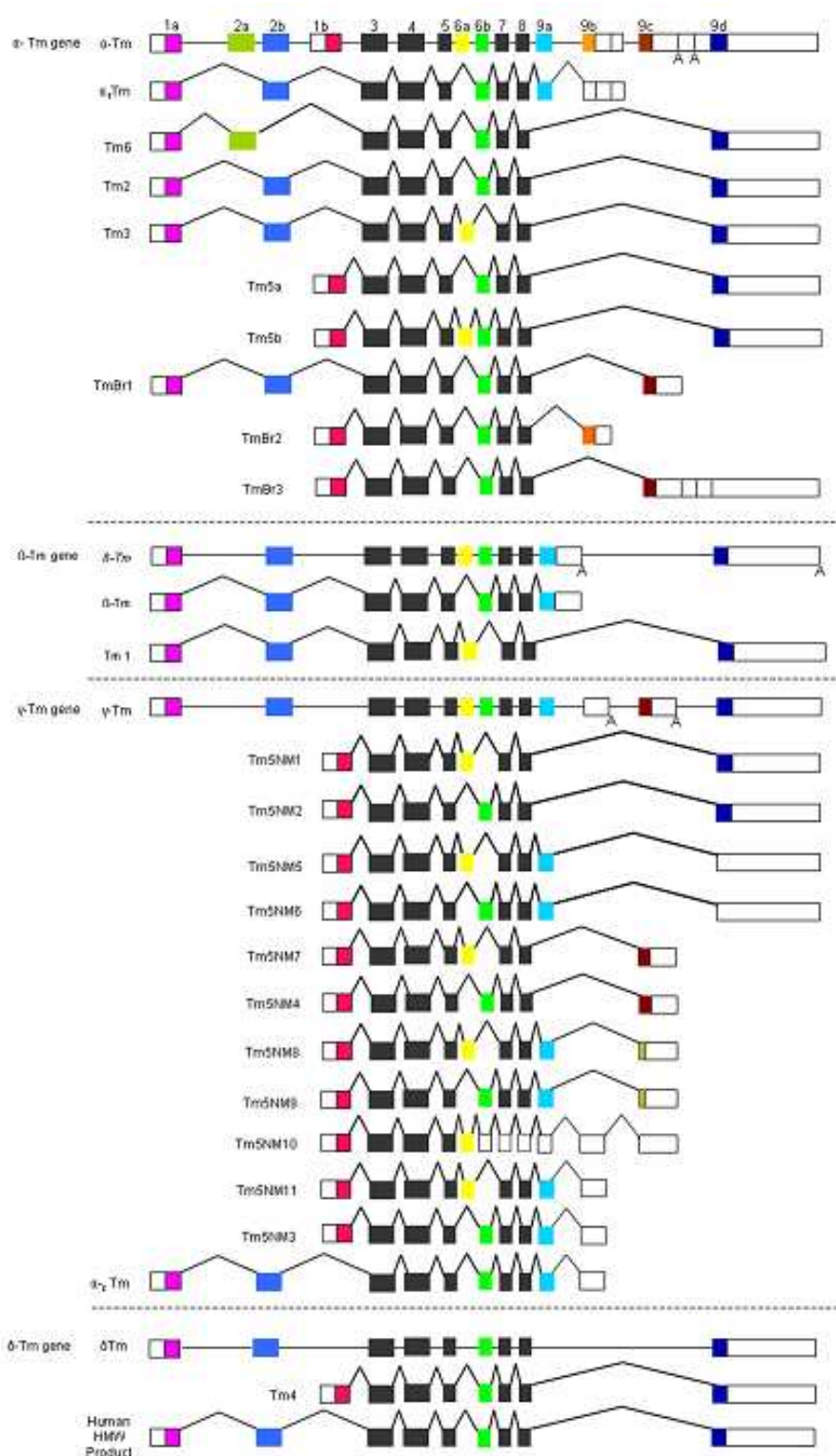


Рис. 1. Основные изоформы Трп, получаемые при экспрессии генов и альтернативном сплайсинге [38]. Представлена структура 4-х генов Трп (α -, β -, γ -, δ -гены, названные по белковым продуктам, соответствующим генам TRP 1, 2, 3 и 4, соответственно). На рисунке используется старая номенклатура (α -, β -, γ - и δ -Tm).

Введение новой классификации должно в первую очередь способствовать универсализации использования обозначений изоформ Трм, что положительно скажется на упрощении понимания материала по данной тематике. Мы всячески поддерживаем эту идею, поэтому в нашей работе мы использовали новую классификацию двух исследуемых изоформ Трм – Трм 1.1 и Трм 2.2 (α -Трм и β -Трм по старым классификациям). Тем не менее, в некоторых случаях мы также будем использовать и старую классификацию, т.к. она значительно более удобна, например, для обозначений гетеродимеров Трм.

Поскольку наша работа напрямую связана с регуляцией мышечного сокращения и заболеваниями скелетной и сердечной мышц, то остановимся более подробно на рассмотрении изоформ Трм, экспрессируемых в этих тканях. В скелетной мускулатуре существует два принципиально разных типа мышечных волокон – медленные и быстрые волокна, которые, в отличие от медленных, делят в свою очередь по типу метаболизма на гликолитические и окислительные [40]. Медленные мышечные волокна способны развивать большую силу, но сокращаются со значительно меньшей скоростью, чем быстрые волокна, и наоборот. В организме есть мышцы, которые практически полностью состоят либо из быстрых, либо из медленных мышечных волокон, но большинство мышц относится к смешанному типу, в которых присутствуют как быстрые, так и медленные волокна, что в конечном итоге во многом определяет физиологический профиль мышечной ткани всего организма. Различные мышечные волокна отличаются друг от друга паттерном экспрессии мышечных белков, и в частности – тропомиозина, одного из ключевых регуляторов мышечного сокращения [3, 38, 41]. Основными изоформами Трм зрелой скелетной мускулатуры являются Трм 1.1, Трм 2.2, и Трм 3.1 [40], являющиеся продуктами разных генов. Они находятся в разных типах мышц; так, Трм 1.1 является основной изоформой быстрых скелетных мышц и сердца [2, 3], Трм 2.2 присутствует во всех скелетных мышцах [3, 41], а Трм 3.1 присутствует в медленных скелетных мышцах [40–42]. Стоит также отметить, что в некоторых тканях основной формой существования Трм являются его гетеродимеры [43, 44]. В сердечной ткани у млекопитающих, в том числе и у человека, в норме экспрессируется в основном изоформа Трм 1.1, хотя при различных патологиях появляется также Трм 2.2 [40, 45]. Важно отметить, что эти изоформы Трм не являются взаимозаменяемыми; так, повышенная экспрессия Трм 2.2 приводила к развитию серьезных отклонений в работе сердца мыши [46].

В силу того, что наша работа была направлена на изучение фундаментальных особенностей функционирования Трм, в том числе – его роли в патогенезе сердечной ткани, мы посчитали, что достаточно остановиться на исследованиях только двух изоформ

(Трт 1.1 и Трт 2.2, по старой классификации – α -Трт и β -Трт), наличие которых характерно для быстрых скелетных мышц и сердца.

Структура молекулы Трт и принципы ее формирования.

Молекула Трт представляет собой димер α -спиралей, образующих левозакрученную суперспираль (coiled-coil, CC), при этом оси спиралей не параллельны, а скошены друг относительно друга на 20° [47]. Образование такой структуры тесно связано с первичной последовательностью белка, в основе которой лежит гептадная периодичность (рис. 2).

<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>
Y	E	E	V	A	R	K
L	V	I	L	E	G	E
L	E	R	S	E	E	R
A	E	V	A	E	S	K
C	G	D	L	E	E	E
L	K	I	V	T	N	N
L	K	S	L	E	A	Q
A	D	K	Y	S	T	K
E	D	K	Y	E	E	E
I	K	L	L	E	E	K
L	K	E	A	E	T	R

Рис. 2. Участок первичной структуры Трт, разбитый на гептады [40].

На один виток в α -спирали такой структуры приходится не 3,6 аминокислотных остатка, как обычно, а 3,5; при этом одна гептада образует 2 витка. В гептадах каждой аминокислоте присвоили свою латинскую букву, а в 2004 году Mason и Arndt выдвинули так называемую «PV гипотезу» (Peptide Velcro), в которой указали структурные элементы, необходимые для образования CC (рис. 3) [48].

Согласно этой гипотезе, в положениях *a* и *d* α -спирали расположены гидрофобные остатки аминокислот, ответственные за удержание двух α -спиралей в прочном контакте друг относительно друга благодаря гидрофобным взаимодействиям. Эта структура напоминает структурный мотив «лейциновой молнии», и в результате ее формирования образуется гидрофобный «кор», который прочно связывает две α -цепи молекулы друг с другом. При этом в идеале гидрофобный радикал аминокислотного остатка, входящего в

состав кора, должен быть достаточно длинным для успешного формирования гидрофобных взаимодействий, но не слишком объемным, что может внести стерические затруднения при формировании СС. Так, например, метильная группа аланина является слишком короткой, объемный радикал триптофана – слишком большим, а вот изопропил валина уже способен успешно участвовать в формировании гидрофобного кора (рис. 3).

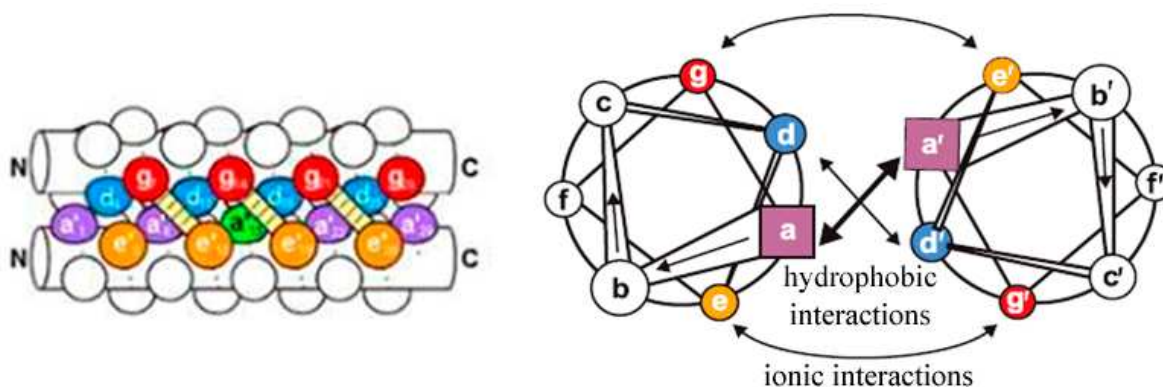


Рис. 3. Расположение аминокислотных остатков гептады в структуре СС [48].

Помимо этого, согласно «PV гипотезе», в положениях **e** и **g** в структуре гептады должны быть расположены заряженные аминокислоты, между которыми формируются электростатические взаимодействия. Таким образом, заряженные аминокислоты одной α -спирали взаимодействуют с соседними остатками, расположенными на другой α -спирали, при этом «солевые мостики» расположены под углом. Правило формирования таких связей подчиняется формуле $i \rightarrow i' + 5$, т.е. остаток **g** одной спирали образует ионную пару с остатком **e** следующей гептады другой спирали (рис. 3). Подобные взаимодействия с одной стороны увеличивают стабильность СС [49], а с другой – обеспечивают специфичность взаимодействия спиралей в структуре СС [48]. В положениях **b**, **c** и **f**, в свою очередь, расположены полярные или заряженные аминокислоты. Это имеет большое значение для структуры Трп и выполняемых им функций, т.к. именно эти аминокислотные остатки участвуют во взаимодействии Трп как с растворителем (водой), так и с актиновыми филаментами [50]. В первичной структуре Трп 1.1 скелетных мышц содержится 284 аминокислотных остатка, формирующие 40 гептад, которые никогда не прерываются, что является отличительной чертой этого белка (отметим при этом, что 4 остатка, не входящие в состав гептад, расположены на С-конце молекулы и необходимы для взаимодействий между N- и С-концами молекул Трп на поверхности актинового филамента [51, 52]. Ранее множество работ было посвящено влиянию различных аминокислотных остатков, расположенных в разных положениях гептады, на

стабильность СС. Все накопленные данные были суммированы и подробно проанализированы в обзоре И.А Невзорова и Д.И. Левицкого «Тропомииозин: двойная спираль из мира белков», опубликованном в 2011 году [40]. Итак, перечислим факторы, определяющие стабильность СС (и, в частности, стабильность молекулы Трм):

1. Стабильность α -спиралей. Как известно, стабильность целого комплекса зависит от стабильности его элементов. Так как СС молекулы Трм состоит из двух α -спиралей, то ее устойчивость определяется стабильностью каждой из них. Стабильность самой α -спирали, в свою очередь, зависит от аминокислот, ее формирующих. Так, наибольшей спиралеобразующей способностью обладают метионин, аланин, лейцин, глутамин и лизин, а наименьшей – пролин (он вносит изгиб в полипептидную цепь) и глицин (аминокислота, обладающая чрезвычайно высокой конформационной лабильностью).
2. Аминокислотные остатки, занимающие в гептадах положения **a**, **d**, **e** и **g**. Этот пункт тесно связан с гипотезой «Peptide Velcro» и был проанализирован выше.
3. Плотность упаковки гидрофобного «кора» молекулы. Чем плотнее упакован гидрофобный «кор», тем меньше в нем участков для контакта с растворителем и тем стабильнее структура СС молекулы Трм.

Приведенные выше правила справедливы для формирования идеально стабильной структуры СС, но в реальности такое, как правило, не наблюдается. Отклонения от подобной схемы и замены канонических аминокислотных остатков (т.е. остатков, подчиняющихся данной модели) на неканонические, а также присутствие в молекулах дестабилизирующих остатков, часто формирующих целые кластеры (такие, например, как «аланиновые» кластеры в молекуле Трм), часто встречаются в структурах СС. Трм не является в этом смысле исключением. Первые данные о том, что молекула Трм представляет собой достаточно эластичный и гибкий стержень, можно отнести к ранним работам по кристаллографии Трм. В 2000 году была получена первая кристаллическая структура с достаточно плохим разрешением 7 Å [53]. Тем не менее, авторам удалось сделать ряд важных выводов о структуре Трм; в частности, им удалось установить, что молекула Трм образует три полных витка вокруг своей оси и является достаточно лабильной, т.к. способна образовывать много различных кристаллических форм. В 2001 году другому коллективу авторов удалось получить с хорошим разрешением (2 Å) кристаллическую структуру N-концевого фрагмента молекулы Трм (81 аминокислотный остаток) [54]. Помимо этого, им удалось впервые показать, что участки локальной нестабильности Трм могут быть ответственны за формирование изгибов молекулы и

рассчитать, что Трп может принимать до 128 конформаций, которые, возможно, необходимы для выполнения им своих функций. Кроме того, они предположили, что такие изменения могут иметь как локальный характер, так и затрагивать всю молекулу в целом. В дальнейшем подобные исследования только развивались, укрепляя идею о том, что Трп представляет собой не просто жесткий стержень, а достаточно лабильную молекулу, нестабильность структуры которой важна для проявления выполняемых Трп функций. Так, исследователям удалось выявить в структуре Трп порядка 9 стабилизирующих и 6 дестабилизирующих кластеров (рис. 4) [55, 56], а также показать, что участки дестабилизации Трп совпадают с местами неплотной «упаковки» гидрофобного кора СС [56].

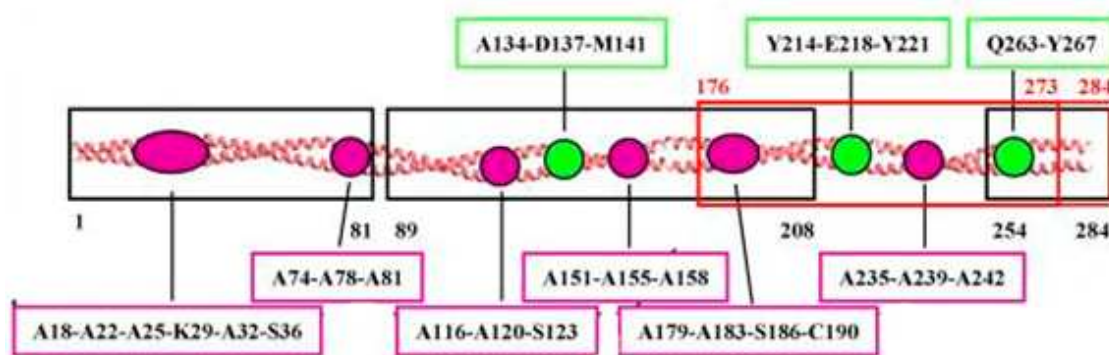


Рис. 4. Структура молекулы Трп с указанием дестабилизирующих кластеров. Фиолетовым цветом на рисунке обозначены «аланиновые» кластеры, зеленым – дестабилизирующие кластеры, содержащие заряженные аминокислоты [64].

Было показано, что в структуре молекулы Трп присутствует большое количество изгибов [57, 58], которые, как предполагается, важны для связывания Трп с актиновым филаментом. На данный момент структуру Трп все чаще называют полужесткой, т.к. отмечают не только важность дестабилизации структуры Трп для выполняемых им функций, но и жесткость некоторых элементов этой структуры [59–61]. Кроме того, в структуре молекулы Трп удалось выявить участки, в которых наблюдается значительное расхождение двух α -спиралей друг от друга [62–64]. Данные участки расположены в центральной части молекулы Трп [62] и в ее С-концевой части [63, 64]. В этих участках наблюдались значительные изгибы молекулы Трп, а также, в случае С-концевого участка, появление молекул воды в гидрофобном коре [63, 64]. Стоит отметить, что молекулы воды в гидрофобном коре могут присутствовать и в центральной части молекулы, но на кристаллической структуре их увидеть не удалось. Совершенно очевидно, что столь серьезные структурные изменения в молекуле Трп важны для выполняемых им функций,

но до сих пор их функциональную значимость выявить не удалось. Поэтому установление роли локальной дестабилизации центральной части Трм в его функционировании стало одной из приоритетных задач нашего исследования.

Актин – основной партнер тропомиозина. Структура комплекса Трм с актином.

Каким бы сложным не было многообразие функций Трм, главным его партнером является актиновый филамент, с которым Трм всегда связан в клетке и благодаря которому он реализует все свои функции [65]. Молекулы Трм, взаимодействуя друг с другом своими концами, образуют непрерывную нить вдоль всего актинового филамента, таким образом, что на одну молекулу Трм приходится 6 или 7 мономеров актина, в зависимости от ее длины (248 аминокислотных остатков для коротких немышечных изоформ Трм или 284 остатка для высокомолекулярных изоформ Трм) [47, 66].

На данный момент установлена природа взаимодействия Трм с актином и она носит в основном электростатический характер [67–69]. Уже давно было установлено, что оптимальными для связывания Трм с F-актином являются условия, близкие к физиологическим (100 мМ NaCl и 5 мМ MgCl₂), в то время как повышение или уменьшение ионной силы сильно снижало сродство Трм к актину [70]. Дальнейшие исследования были направлены на поиски конкретных участков в молекуле Трм, которые участвуют в формировании электростатических взаимодействий с актином. В молекуле Трм выделяют семь псевдоповторов [71] (см. рис. 5), что хорошо согласуется с количеством актиновых мономеров, которые покрывает одна молекула Трм на актиновом филаменте [72, 73]. Поэтому было высказано логичное предположение, что в каждом таком псевдоповторе должен содержаться актин-связывающий центр. Было показано, что делеции и аминокислотные замены в этих повторах так или иначе влияют на связывание Трм с актином [72, 74, 75]. Оказалось, однако, что эти псевдоповторы не являются равнозначными с точки зрения связывания Трм с F-актином. Так, оказалось, что псевдоповторы 3, 4 и 5 имеют большее значение для такого связывания, чем остальные повторы [69, 72]. Наконец, в 2011 году на основе данных электронной микроскопии и компьютерного моделирования была предложена модель, в которой детально были разобраны участки взаимодействия между актином и Трм, которые включали более 40 пар противоположно заряженных аминокислотных остатков актина и Трм, расположенных близко друг от друга (на расстоянии, не превышающем нескольких Å) [76]. Справедливость данной модели была частично подтверждена в работе по мутагенезу отрицательно заряженных поверхностных остатков в молекуле Трм [69]. Кроме

электростатических взаимодействий, удалось также обнаружить и гидрофобные контакты, ответственные за связывание Трм с актиновым филаментом [76, 77], что объясняет падение сродства Трм к F-актину при снижении температуры в эксперименте [78] (гидрофобные взаимодействия тем сильнее, чем выше температура). Наконец, представить более полную картину взаимодействия Трм с актином позволяет новая, недавно опубликованная структура комплекса Трм с актиновым филаментом, где можно проследить, что Трм находится в связанном состоянии с положительно заряженной продольной бороздкой филамента [79]. Таким образом, на данный момент достаточно хорошо понятна природа взаимодействия Трм с поверхностью актинового филамента, а также то, какие именно остатки Трм и актина принимают участие в этом взаимодействии.

Также на данный момент хорошо установленным фактом является то, что это взаимодействие носит кооперативный характер. Кооперативность связывания Трм с актиновым филаментом удалось показать еще в 1979 году, когда методом соосаждения было продемонстрировано, что сродство к актину первых нескольких молекул Трм значительно ниже, чем сродство последующих молекул, присоединяющихся к актину [80]. Впоследствии удалось измерить константу диссоциации единичного взаимодействия одной молекулы Трм с актиновым филаментом, которая составила всего $3 \times 10^{-3} \text{ М}$ [81]. Несомненным и неоспоримым на данный момент также является тот факт, что кооперативность связывания Трм с F-актином очень сильно зависит от взаимодействий между N- и C-концами молекул Трм на поверхности актинового филамента. Это утверждение было подтверждено целым рядом работ. Так, в случае протеолитической деградации Трм с C-конца при обработке карбоксипептидазой А удаление всего четырех C-концевых остатков приводило к потере способности Трм полимеризоваться и связываться с актиновыми филаментами [51, 52]. К аналогичным результатам приводило и удаление N-концевого гексапептида [82]; кроме того, было показано, что даже потеря N-концевого остатка ацетилированного метионина (Ac-Met1) при бактериальной экспрессии Трм приводит к полной потере его способности к связыванию с актином [83], что, вероятно, связано с появлением заряженного аминокислотного остатка на N-конце молекулы. Существует также целый ряд экспериментальных данных, которые демонстрируют, что описанные выше концевые взаимодействия между молекулами Трм хотя и безусловно важны, но это все-таки далеко не единственный фактор, обеспечивающий кооперативность взаимодействия Трм с актином. Так, недавно было установлено, что степень перекрытия N- и C-концевых участков Трм не влияет на кооперативность его взаимодействия с актином [84]. Еще одним аргументом против того, что такая кооперативность определяется только концевыми взаимодействиями молекул

Трп, могут служить результаты экспериментов по обработке актиновой нити глутаровым альдегидом, в результате которой образование внутри- и межмолекулярных сшивок в актиновых филаментах приводило к полной потере ими способности связывать Трп [80]. Стоит отметить, однако, что подобная обработка представляет собой достаточно грубое воздействие на актиновый филамент, которое может приносить очень серьезные изменения в его структуру и в силу этих причин делать невозможным его взаимодействие с Трп.

Интересно отметить, что до сих пор нет окончательной ясности в том, как правильно формируются концевые взаимодействия между молекулами Трп. Долгое время считалось несомненным, что С-конец Трп является расплетенным и в него входит более структурированный N-конец другой молекулы [68, 85, 86]. Однако в 2008 году К. Murakami с соавторами удалось получить с хорошим разрешением ($2,1 \text{ \AA}$) кристаллическую структуру участка перекрытия N- и С-концов Трп, как в присутствии фрагмента тропонина Т, так и в его отсутствие, где, наоборот, был расплетен N-конец Трп, а более структурированным был его С-конец [87]. Разницу между своими данными и более ранними данными, полученными методом ЯМР [85, 86], они объяснили тем, что в предыдущих исследованиях был взят недостаточно длинный N-концевой участок молекулы Трп, что, видимо, не позволяло достоверно определить его структуру в области перекрытия.

Если с природой взаимодействий Трп с актином на поверхности актинового филамента достигнута определенная ясность, то по поводу механизма кооперативного связывания Трп с F-актином до сих пор идут горячие споры. На данный момент популярны 2 теории, предлагающие альтернативные механизмы такого взаимодействия. Согласно модели, которая наиболее активно поддерживается и проверяется группой S. Hitchcock-DeGregori, за связывание Трп с актином главным образом отвечают отрицательно заряженные кластеры молекулы Трп, аминокислотные остатки которых расположены в положениях **b**, **c** и **f** гептадных повторов [73, 88]. Основную роль при этом приписывают конформационной подвижности молекулы Трп, которая необходима для оптимального взаимодействия таких отрицательно заряженных кластеров с поверхностью актинового филамента. Как было показано, ряд мутаций в этих кластерах действительно снижает сродство Трп к актину [50, 72]; выяснилось, однако, что мутации далеко не во всех кластерах вызывают столь драматичный эффект, что является аргументом против этой теории. Поэтому была предложена новая модифицированная модель, которая объясняет подобное противоречие [68]. Авторы предположили, что существуют два типа

взаимодействий Трп с F-актином: первичные – в тех областях молекулы Трп, где аланиновые кластеры (участки дестабилизации структуры СС) совпадают с отрицательно заряженными кластерами, необходимыми для связывания с актином (рис. 5), и вторичные, которые не столь важны для первичного связывания Трп с актином, но способны дополнительно стабилизировать уже образованные комплексы Трп с актином. И все же у данной модели есть свои недостатки; в частности, она предполагает изначально единичное взаимодействие Трп с поверхностью актинового филамента, которое является чрезвычайно слабым, а также рассматривает как основу модели очень высокую конформационную подвижность самой молекулы Трп, что пока еще до конца не доказано.

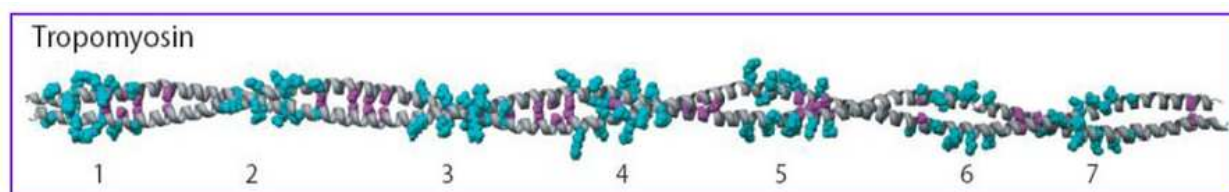


Рис. 5. Модель структуры молекулы Трп с указанием аланиновых кластеров (фиолетовые) и аминокислотных остатков, ответственных, как предполагается, за связывание Трп с актином (циановые). Номерами обозначены 7 актин-связывающих псевдоповторов Трп [68]. Видно, что аланиновые кластеры расположены внутри областей остатков, ответственных за связывание Трп с актином, только в случае псевдоповторов 1 и 5.

Другой точкой зрения на механизм взаимодействия Трп с актином является т.н. теория «gestalt-связывания» (от нем. *gestalt* – форма, шаблон) [59]. Согласно этой теории, молекула Трп уже имеет заданную конформацию и взаимодействует с актиновым филаментом по принципу комплементарности. Изначально эта модель предполагает более жесткую структуру Трп. Согласно последним представлениям, с нитью актина сначала связываются молекулы Трп, обладающие наиболее подходящей конформацией, затем они принимают наиболее подходящую форму для взаимодействия с актиновым филаментом, однако у них остаются более свободными и подвижными концы, которые ответственны за поиск соседних молекул на поверхности актинового филамента и дальнейшую полимеризацию Трп вдоль всей актиновой нити [61]. Этот процесс продолжается до тех пор, пока весь актиновый филамент не будет полностью декорирован молекулами Трп, и только в этом случае произойдет снижение подвижности N- и C-концов Трп [89]. У этой теории также есть ряд своих недостатков. Так, она предполагает наличие достаточно стабильных конформаций у молекул Трп, которые позволят им достаточно быстро и эффективно декорировать актиновый филамент; кроме того, эта модель не объясняет,

каким образом этот процесс может протекать без образования промежутков (участков, свободных от Трп) на поверхности актинового филамента [20, 89].

Функциональные свойства тропомиозина: участие в регуляции мышечного сокращения

Как уже упоминалось выше, Трп принимает участие в регуляции множества протекающих в клетке процессов. Но в скелетных мышцах и в сердце главной функцией Трп является регуляция взаимодействия миозина с актином, которое лежит в основе молекулярного механизма мышечного сокращения. В основе такой регуляции лежит способность Трп перемещаться на поверхности актинового филамента, открывая или закрывая участки взаимодействия актина с головками молекул миозина. Свидетельства того, что Трп вместе с тропонином может стерически блокировать взаимодействие миозина с актином, были получены достаточно давно и самыми разными методами, такими как электронная [90] и крио-электронная [91, 92] микроскопия, дифракция рентгеновских лучей [16] и др. Однако еще раньше, в 1993 году, McKillop и Geeves [19] предложили т.н. «модель 3-х состояний» для описания механизма осуществляемой Трп регуляции миозин-актинового взаимодействия, которая до сих пор не утратила своей актуальности. Согласно этой модели, Трп может находиться в трех разных положениях на поверхности актинового филамента – “blocked”, “closed” и “open” [19] (рис. 6).

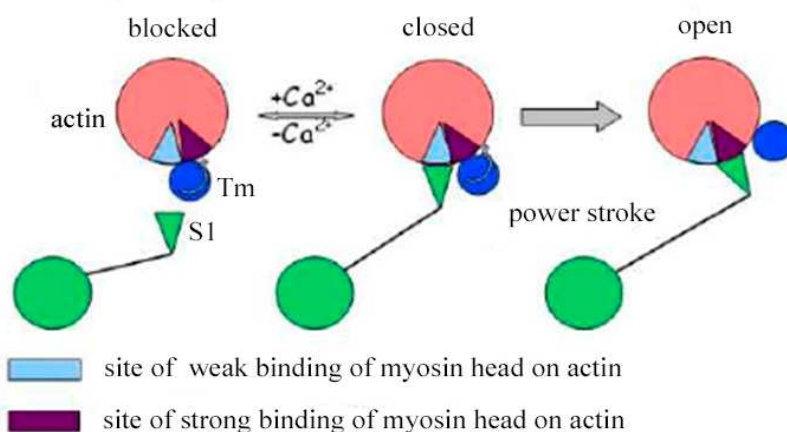


Рис. 6. Модель регуляции тропомиозином мышечного сокращения путем стерического блокирования взаимодействия миозина с актином («модель 3-х состояний» – “blocked”, “closed” и “open” [19]). Зеленым цветом обозначен миозин, зелеными треугольниками – головки молекул миозина (субфрагмент 1 миозина, S1), красным – актин, синим – тропомиозин. Представлен вид с торца актиновых и миозиновых филаментов.

В состоянии “blocked” (в отсутствие Ca^{2+} в расслабленной мышце) тропонин удерживает Трп в положении, в котором он закрывает участки связывания миозина на

актине, предотвращая взаимодействие головок миозина с актином. Переход Трп из состояния “blocked” в состояние “closed” осуществляется в ходе структурных перестроек при связывании Ca^{2+} с тропонином при запуске мышечного сокращения, освобождая участок для слабого связывания миозиновой головки с актиновым филаментом. Затем миозиновая головка, переходя в состояние сильного связывания с актином, выталкивает Трп в состояние “open”, что приводит к активному взаимодействию миозиновых головок с актиновыми филаментами, которое сопровождается генерацией силы в мышце и активацией миозиновой АТФазы актином. Стоит отметить, что в настоящее время данная схема регуляции является общепризнанной, хотя некоторые ее аспекты требуют уточнения. Так, например, все еще обсуждается роль Трп в блокировании миозин-актинового взаимодействия: является ли он действительно стерическим блокатором или все же аллостерическим регулятором (т.е. действует как координатор структурных перестроек в актине) [93]. В пользу последней модели (аллостерического регулятора) свидетельствуют данные о том, что Трп не способен блокировать взаимодействие миозина головки с актином в отсутствие одного из компонентов тропонинового комплекса – тропонина I [94]. Кроме того, до сих пор не ясно, способен ли Трп непосредственно взаимодействовать с миозиновой головкой при ее связывании с актином. В пользу существования такого взаимодействия свидетельствуют данные о том, что сродство Трп к актину возрастает в присутствии миозина [95]. Если такое взаимодействие действительно имеет место, то весьма интересным представляется вопрос о том, какие именно участки молекулы Трп могут быть в него вовлечены. Представляется вполне возможным, что такие участки могут располагаться в центральной части молекулы Трп или поблизости от нее [96].

1.2. Центральная часть молекулы тропомиозина и ее особенности

Кластеры дестабилизации в центральной части Трп или что в ней особенного.

Представления о нестабильности центральной части молекулы Трп были сформулированы еще давно. Одни из первых работ в этой области были посвящены анализу продуктов протеолиза Трп трипсином [97, 98]. Использование этого метода для исследования стабильности молекулы Трп далеко не случайно, т.к. в ее структуре присутствует множество заряженных остатков аргинина – потенциальных участков протеолиза (наиболее предпочтительным местом протеолиза трипсином является связь после остатка Arg, если только следующим остатком не является Pro). Тем не менее, первичным местом протеолиза молекулы Трп трипсином является лишь один из них –

остаток Arg133, расположенный в центральной части молекулы [99]. Впоследствии была определена температурная зависимость эффективности такого протеолиза [100], которая, в совокупности с данными о наличии тепловой денатурации части молекулы Трм при относительно низкой температуре (ниже 37°C), полученными методом КД [101], однозначно свидетельствовала о нестабильности центральной части Трм. Однако ясность в вопросе об организации центральной части Трм появилась только после опубликования ее структуры в 2005 году [62]. В этой работе авторам удалось обнаружить участки неплотной упаковки молекулы Трм в ее центральной части, которые приводят к образованию полостей (рис. 7А). Образование таких полостей сопровождается увеличением радиуса СС (рис. 7В) и обусловлено наличием в этой области Трм как объемных радикалов остатков Met, Ile и Leu, так и заряженного остатка Asp137 в гидрофобном коре, а также остатков Ala, неспособных к образованию плотного гидрофобного кора. Особенно стоит обратить внимание на наличие заряженного остатка Asp137, т.к. он способен образовывать ионные и водородные взаимодействия с молекулой воды, которая может быть размещена в этой полости.

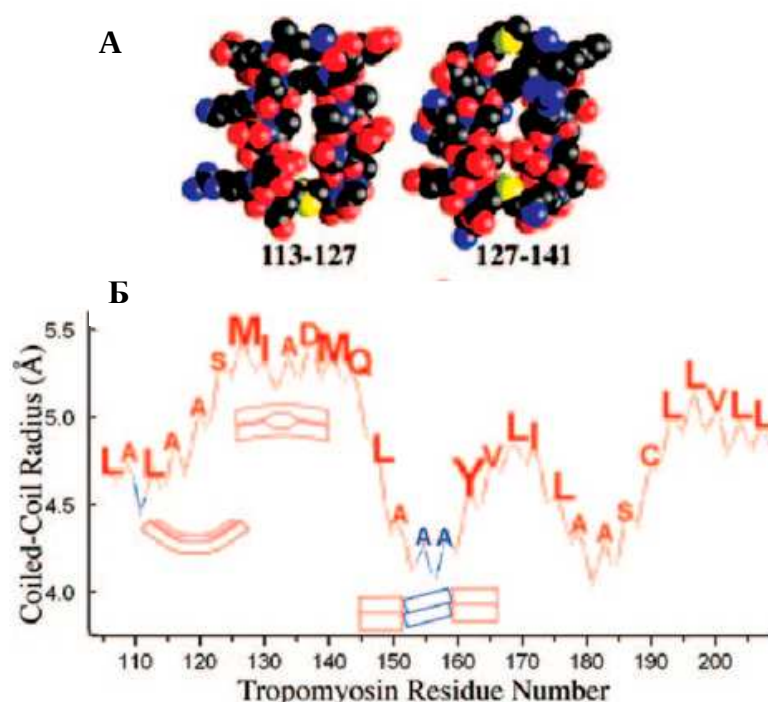


Рис. 7. Особенности структуры центральной части молекулы Трм [62]. **(А)** Структуры двух разных участков Трм. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, указывающие границы рассматриваемых участков. Из рисунка видно, что между двумя α -цепями Трм присутствуют полости. **(Б)** Рисунок иллюстрирует зависимость радиуса СС от положения остатков в структуре Трм. Синим цветом выделены участки, соответствующие наименьшему радиусу, картинки под графиком указывают на наличие изгибов и полостей в структуре Трм.

Кроме того, авторам этой работы удалось обнаружить в центральной части Трп наличие особого вида изгибов молекулы – на угол 4–8° в области между остатками 127 и 134 и на угол в 11° в области остатка 117 [62]. Они предположили, что подобные изгибы в структуре молекулы необходимы для правильного связывания Трп с актиновым филаментом. Впоследствии выяснилось, однако, что это предположение оказалось неверным.

Механизм дестабилизации центральной части Трп и зачем это нужно.

В 2008 году S. Lehrer с соавторами решили более детально рассмотреть высококонсервативный неканонический остаток Asp137, который дестабилизирует центральную часть молекулы Трп [102]. Им удалось показать, что его замена на канонический остаток лейцина (мутация D137L) предотвращает протеолиз этой части Трп трипсином по остатку Arg133. Двумя годами позже в центральной части молекулы Трп был обнаружен еще один высококонсервативный неканонический остаток – Gly126, дестабилизирующий эту область молекулы; и оказалось, что его замена на канонический остаток Arg (мутация G126R) стабилизирует центральную часть Трп, предотвращая, подобно замене D137L, расщепление Трп трипсином. Помимо этого, методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) было показано, что аминокислотная замена G126R изменяет характер тепловой денатурации центральной части молекулы Трп с некооперативного на кооперативный [103], а также был описан механизм протеолиза центральной части Трп трипсином, согласно которому для эффективного протекания протеолиза требуется согласованное действие двух неканонических остатков – Asp137 и Gly126. При этом аспартат дестабилизирует гидрофобный кор молекулы, обеспечивая тем самым образование полости, а глицин дестабилизирует α -спираль. В результате такая двойная дестабилизация открывает участок для протеолиза трипсином по остатку Arg133. Более того, в этой статье с использованием метода ДСК впервые удалось рассчитать размер центральной части Трп, которая включает около 60–70 аминокислотных остатков, т.е. составляет приблизительно четверть молекулы [103]. С другой стороны, однако, в обеих этих работах [102, 103] замены неканонических остатков Asp137 или Gly126 на канонические остатки Leu или Arg не приводили к изменению сродства Трп к F-актину; это свидетельствует о том, что наличие нестабильной центральной части в молекуле Трп не играет особой роли при связывании Трп с актином. С другой стороны, обе эти стабилизирующие замены при высоких концентрациях Ca^{2+} приводили к значительному увеличению АТР-разной активности изолированных головок миозина (субфрагмента 1 миозина, S1) в присутствии реконструированных тонких филаментов (т.е. филаментов, состоящих из F-актина, Трп и

тропонина) [102, 103], что было первым свидетельством их влияния на функциональные свойства Трм. Исследования, связанные с центральной частью Трм, были продолжены большим коллективом американских авторов, которым удалось получить трансгенных мышей с мутацией D137L [104]. Было показано, что эта мутация влияет на механические свойства кардиомиоцитов и волокон, выделенных из сердечной мышцы, делая их сходными по фенотипу с препаратами, для которых была установлена дилатационная кардиомиопатия. Эти авторы также исследовали методом ДСК влияние замены D137L на тепловую денатурацию Трм и обнаружили существенную стабилизацию его молекулы.

Несмотря на значительное количество работ в этой области, функциональное значение дестабилизации центральной части молекулы Трм так и оставалось непонятным; именно этот пробел мы решили восполнить в нашей работе.

1.3. Наследственные заболевания, ассоциированные с точечными мутациями в генах тропомиозина

Морфологические особенности и многообразие заболеваний, ассоциированных с мутациями в генах Трм.

В основе патогенеза большинства мышечных заболеваний, т.е. в нарушении нормального функционирования скелетных и сердечной мышц, лежат наследственные изменения в генах мышечных белков, в частности тропомиозина, изучению которых и посвящена часть нашей работы. Принимая во внимание строгую организацию структуры Трм и ее высокую консервативность, а также ту важную роль, которую играет Трм в регуляции мышечного сокращения, кажется совсем неудивительным, что даже единичные замены в генах Трм могут приводить к серьезным наследственным заболеваниям. Все наследственные заболевания, связанные с Трм, можно разбить на две большие группы – это заболевания сердца, представленные кардиомиопатиями, и заболевания скелетных мышц, представленные огромным количеством миопатий и дистальными артрогриппозами.

Кардиомиопатии – это заболевания сердечной мышцы, которые сопровождаются морфологическими изменениями в желудочках сердца. Большая часть этих заболеваний детерминирована наследственными причинами и вызывается мутациями в генах, кодирующих саркомерные белки [105]. Абсолютное большинство наследственных мутаций приводит к двум типам кардиомиопатий – гипертрофической и дилатационной. Правда, существуют также и другие, более редкие виды, такие как левая желудочковая

некомпактность [106] и аритмогенная правая желудочковая кардиомиопатия [107]. Однако мутации, рассматриваемые в нашей работе, были связаны с развитием гипертрофической и дилатационной кардиомиопатий, поэтому на них мы остановимся подробнее.

Гипертрофическая кардиомиопатия – это аутосомно-доминантное заболевание сердечной ткани, сопровождающееся увеличением левого желудочка в основном за счет разрастания межжелудочковой перегородки (рис. 8) [107], что приводит к уменьшению объема желудочка. В гистологическом плане оно также характеризуется нарушением в расположении миоцитов и фиброзом. В функциональном плане это сказывается на систолическом выбросе, что приводит к гиперсократимости левого желудочка и неполной его релаксации [106]. В итоге это может приводить к таким тяжелым заболеваниям, как инфаркт миокарда. Кроме того, тяжесть наследственной гипертрофии подтверждается тем, что гипертрофия левого желудочка является самой распространенной причиной внезапной смерти в подростковом возрасте [105].

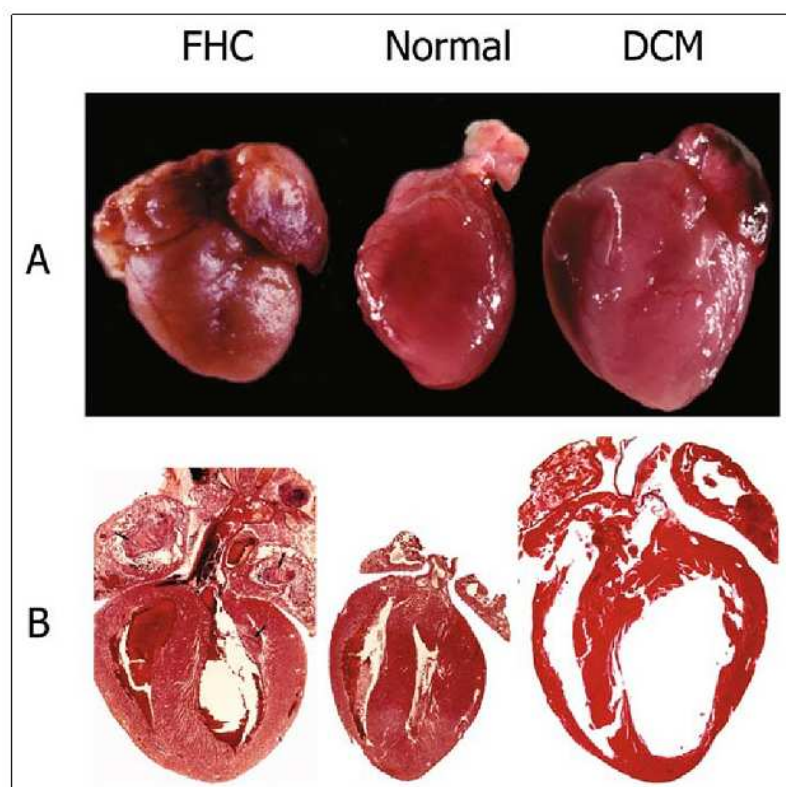


Рис. 8. Эффекты наследственной гипертрофической кардиомиопатии (FHC), вызванной мутацией E180G в гене *Trp*, и дилатационной кардиомиопатии (DCM), вызванной мутацией E54K, продемонстрированные на целом сердце (A) и на гистопатологическом срезе (B) в сравнении с нормальным сердцем [121].

В биохимическом и биофизическом плане пока не так много удается выделить характерных особенностей для этого типа кардиомиопатий. К числу наиболее общих из них можно, наверное, отнести увеличенную чувствительность сократительного аппарата к ионам Ca^{2+} и повышенную АТФазную активность миозина [106, 108–111]. Первой мутацией, которая приводила к гипертрофической кардиомиопатии, была мутация, обнаруженная в гене тяжелой β -цепи миозина [112]. После этой работы исследования были существенно расширены и было обнаружено 9 генов саркомерных белков, мутации в которых приводили к гипертрофиям [113]. Одним из них был ген, кодирующий Трп 1.1 – основную сердечную изоформу Трп. На данный момент насчитывается около 18 мутаций в гене TPM1, которые ассоциированы с развитием гипертрофической кардиомиопатии [106]. Несмотря на то, что количество кардиомиопатических мутаций в этом гене, ассоциированных с гипертрофией, не так велико, как для некоторых других саркомерных белков [113], частота встречаемости таких мутаций в популяциях людей, страдающих от гипертрофической болезни, составляет от 5 до 11 % [114, 115], что для столь маленького белка достаточно много. Небольшое количество мутаций в гене Трп, а также их распространенность делают исследования структурных и функциональных последствий этих мутаций особенно актуальными.

Дилатационная кардиомиопатия – это заболевание сердечной ткани, сопровождающееся утоньшением стенки левого желудочка, что приводит к увеличению объема сердечной камеры [106] (рис. 8). Это сопровождается в гистологическом плане фиброзом миокарда и смертью миоцитов, а в функциональном плане – систолической дисфункцией [107]. Стоит отметить, что это заболевание, в отличие от гипертрофической кардиомиопатии, может вызываться не только наследственными причинами, доля которых от общего пула подобных заболеваний составляет от 35 до 50% случаев [116]. В генетическом плане эти заболевания также значительно более разнородны. Так, мутации, ассоциированные с дилатационными кардиомиопатиями, затрагивают порядка 40 генов, кодирующих не только белки саркомеров, но и другие белки [116, 117]. Если говорить о биохимических проявлениях мутаций, ассоциированных с дилатационными кардиомиопатиями, то в целом они противоположны тем, которые характерны для мутаций, вызывающих гипертрофические кардиомиопатии, т.е. приводят к снижению Ca^{2+} -чувствительности сократительного аппарата [118, 119]. У этого наблюдения есть, однако, и исключения: так, например, некоторые мутации, ассоциированные с кардиомиопатиями дилатационного типа, приводили не к снижению, а, напротив, к увеличению Ca^{2+} -чувствительности сокращения сердечной мышцы [120]. В целом, природа дилатационных кардиомиопатий, которые могут быть вызваны множеством

разных факторов, значительно менее изучена, чем гипертрофических. В гене TRPM1 к настоящему времени обнаружено около десятка мутаций, ассоциированных с данным типом кардиомиопатии [106]. В нашей работе рассматривались мутации, приводящие к кардиомиопатиям обоих типов – как гипертрофической, так и дилатационной.

Миопатии – это широкая группа заболеваний, включающая в себя множество сходных по симптоматике болезней, которые сопровождаются мышечной слабостью, нарушением работы сократительного аппарата мышц и изменением гистологической структуры мышечной ткани [122]. Что же касается дистального артрогрипоза, то его выделяют в отдельную группу заболеваний, которые похожи по симптоматике на миопатии, но не имеют видимых гистологических проявлений [123]. К настоящему времени в литературе имеется множество работ, которые указывают на многочисленные мутации, в том числе в генах Trpm, которые могут быть ассоциированы с различными наследственными миопатиями или артрогрипозами [124, 125]. В отличие от кардиомиопатий, механизмы развития различных миопатий (заболеваний скелетных мышц) являются практически еще не изученными. Об этом свидетельствует хотя бы то, что до сих пор нет хоть сколько-нибудь вразумительной модели, которая могла бы объяснить эффекты, наблюдаемые при развитии наследственных заболеваний в скелетной мускулатуре. На сегодняшний день хорошо известно лишь то, что в развитие наследственных миопатий вовлечены мутации по крайней мере в 17 генах [126]. При этом генетическая обусловленность развития различных миопатий варьирует по разным оценкам от 50 до 90% [126, 127]. Для дистальных артрогрипозов известно, в свою очередь, что мутации, ассоциированные с развитием этих заболеваний, располагаются в основном в генах, кодирующих белки саркомеров [123]. В нашей работе мы изучали эффекты мутаций в гене TRPM2, приводящих к изменениям в последовательности изоформы Trpm 2.2 (β -Trpm) и ассоциированных с дистальным артрогрипозом 2В типа (мутация N202K) и так называемой особой формой миопатии – «кэповым заболеванием» (мутация R133W), гистологически характеризующимся появлением т.н. «кэп структур», расположенных на периферии мышечного волокна и состоящих из дезорганизованных миофибрилл и увеличенных Z-дисков.

Стоит отметить, что абсолютное большинство работ по изучению как кардиомиопатий, так и миопатий носит, как правило, чисто описательный характер: в них анализируют генотип пациентов с подобными заболеваниями и сопоставляют его с гистологическими изменениями в мышечной ткани. Значительно меньше имеется работ, посвященных эффектам этих мутаций на функцию сократительного аппарата мышц. Что

же касается работ, в которых анализировалось бы влияние таких мутаций на структуру и свойства Трп, то их количество на фоне массы медицинских статей исчезающее мало. Изменения, внесенные в аминокислотную последовательность Трп при различных мутациях, могут изменять структуру его молекулы, тем самым оказывая существенное влияние на выполняемую им функцию. В нашей работе мы придаем особое значение изучению тех изменений в структуре и функциональных свойствах Трп, которые были вызваны введением в его последовательность аминокислотных замен, ассоциированных с развитием миопатий или кардиомиопатий.

Гены Трп, в которых обнаружены кардиомиопатические и миопатические мутации. Неоднородность распределения мутаций.

Как уже отмечалось выше, у человека Трп является продуктом четырех генов – ТРМ1, ТРМ2, ТРМ3 и ТРМ4 [38]. Мутации в гене ТРМ1 ассоциированы с развитием кардиомиопатий, т.к. затрагивают Трп 1.1 – основную изоформу тропомиозина в сердечной мышце. Совершенно удивительным является то, что мутации в этой изоформе приводят только к развитию кардиомиопатий [1, 106], несмотря на то, что изоформа Трп 1.1 широко распространена и в скелетных мышцах, в основном быстрого типа. Развитие заболеваний, связанных с патологиями скелетной мышечной ткани, связаны с мутациями в генах ТРМ2 и ТРМ3, ответственных за синтез мышечных изоформ Трп 2.2 и Трп 3.1 [125]. Распределение в структуре Трп аминокислотных замен, вызываемых этими мутациями, заслуживает, на наш взгляд, особого внимания.

Так, вызываемые такими мутациями замены в изоформе Трп 1.1 расположены достаточно равномерно по всей длине молекулы (рис. 9), за исключением участка со 107 по 160 аминокислотный остаток, относящегося к центральной части молекулы Трп. Подобное распределение может быть объяснено двумя способами. Либо по какой-то причине эта область значительно меньше подвержена мутациям, либо эта область чрезвычайно важна для функционирования Трп и потому мутации в ней приводят к летальным последствиям еще на стадии раннего эмбриогенеза. Стоит также отметить, что мутации расположены как в областях, ответственных за связывания с актином или рядом с ними, так и вне их. Похожая картина также справедлива и для участков связывания тропонина Т (рис. 9).

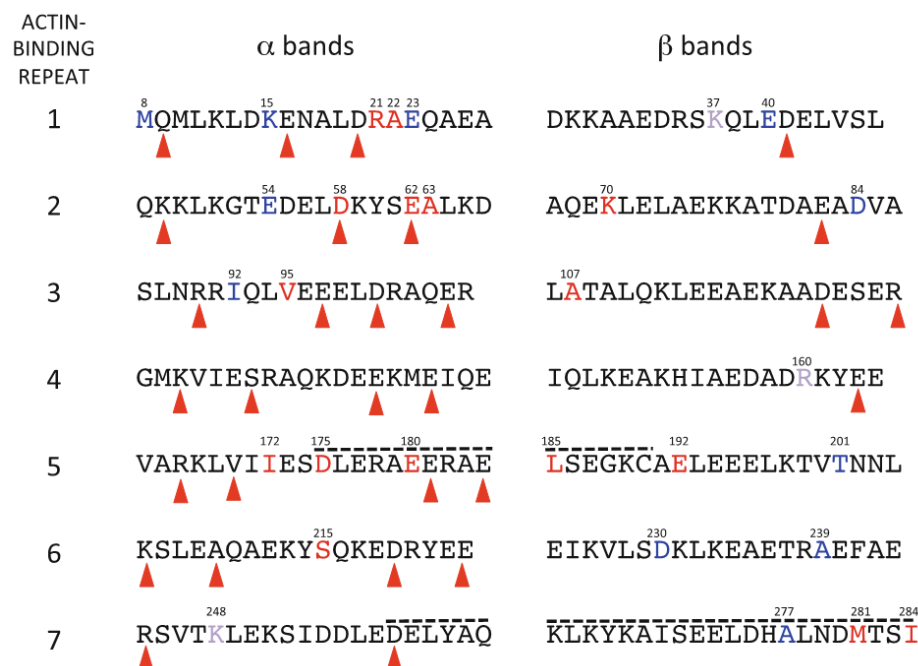


Рис. 9. Первичная последовательность изоформы Trpm 1.1 человека, разбитая на 7 псевдоповторов с указанием аминокислотных остатков, ответственных за связывание актинового филамента (красные треугольники) и участков связывания тропонина Т (пунктирная линия) [106]. Красным цветом обозначены остатки, ассоциированные с развитием гипертрофической кардиомиопатии, синим – с развитием дилатационной кардиомиопатии.

В случае с распределением мутаций в генах изоформ Trpm 2.2 и Trpm 3.1 также есть ряд интересных наблюдений. Так, обращает на себя внимание то, что в изоформе Trpm 2.2 значительно больше мутаций, ассоциированных с развитием заболеваний скелетной мускулатуры, чем в изоформе Trpm 3.1 (рис. 10). Кроме того, все мутации в изоформе Trpm 2.2 расположены равномерно вдоль всей молекулы Trpm. Это может быть связано как с тем, что мутации в гене TRPM3 на данный момент просто хуже изучены, что, на наш взгляд, все-таки маловероятно, так и с тем, что изоформа Trpm 2.2 не может существовать в виде гомодимера и изменения в ней могут быть нивелированы партнером в гетеродимере (цепью изоформы Trpm 1.1 или Trpm 3.1). Также обращает на себя внимание неравномерность распределения мутаций в изоформе Trpm 3.1, которым свойственна пока не совсем объяснимая кластеризация (рис. 10). Стоит отметить, что в этом случае, как и в случае с изоформой Trpm 1.1, отсутствуют мутации в центральной части молекулы Trpm.

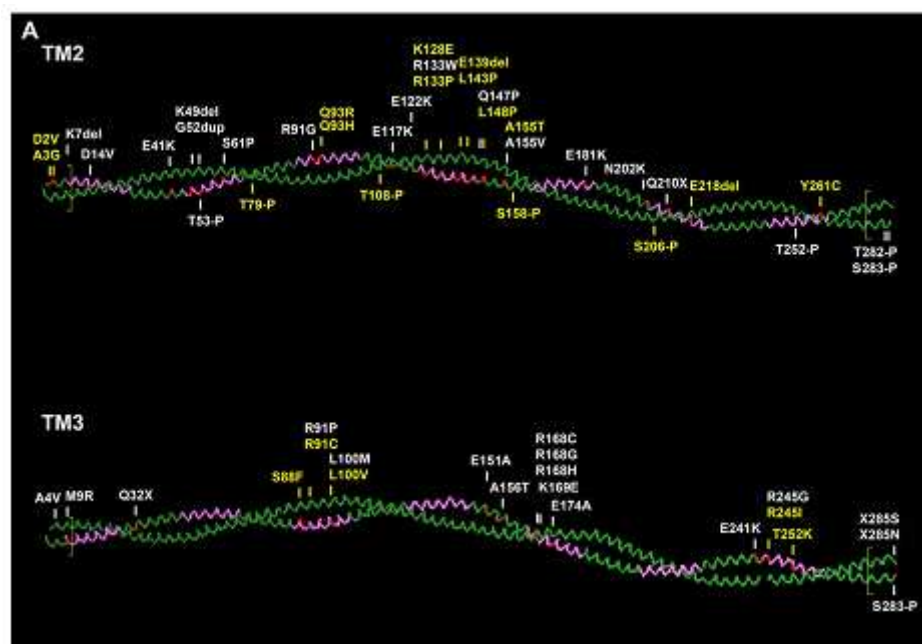


Рис. 10. Схематическое изображение распределения мутаций в структуре изоформ Трп 2.2 (ген ТМ2) и Трп 3.1 (ген ТМ3) [125].

В целом, огромное количество мутаций, равномерность их распределения в структуре Трп и отсутствие видимой кластеризации (за исключением изоформы Трп 3.1) может свидетельствовать о многообразии механизмов, лежащих в основе патогенеза наследственных заболеваний мышц.

Предполагаемые механизмы развития наследственных заболеваний мышц, ассоциированных с мутациями в генах тропомиозина.

Накапливающееся огромное количество данных о мутациях, приводящих к наследственным заболеваниям сердечной и скелетной мышечной ткани, требовало систематизации полученных данных и создания моделей, их объясняющих. Стоит отметить, что малое количество данных биофизических и биохимических исследований не позволяет пока сделать сколько-нибудь вразумительных выводов, объединяющих молекулярные механизмы развития мышечных заболеваний независимо от генов, в которых обнаружены такие мутации. Такие попытки систематизации полученных данных и объединения их в единую модель были, однако, предприняты для мутаций в генах Трп. Особенно значительные успехи были достигнуты при создании моделей, объясняющих развитие гипертрофических кардиомиопатий, что неудивительно, т.к. они являются наиболее изученными на данный момент.

Одна из таких моделей, объясняющих в сформулированном виде механизм развития кардиомиопатий, была предложена коллективом авторов, проанализировавших

изменения энергии взаимодействия Трп с актиновым филаментом при различных аминокислотных заменах, ассоциированных с развитием кардиомиопатий [128]. Согласно этой модели, все эффекты замен, приводящих к гипертрофическим кардиомиопатиям, могут быть вызваны ослаблением взаимодействия Трп с актиновым филаментом. Так, им удалось выявить такое ослабление, выражаемое в увеличении свободной энергии взаимодействия, в случае аминокислотных замен в Трп, ассоциированных с гипертрофическим фенотипом (рис. 11).

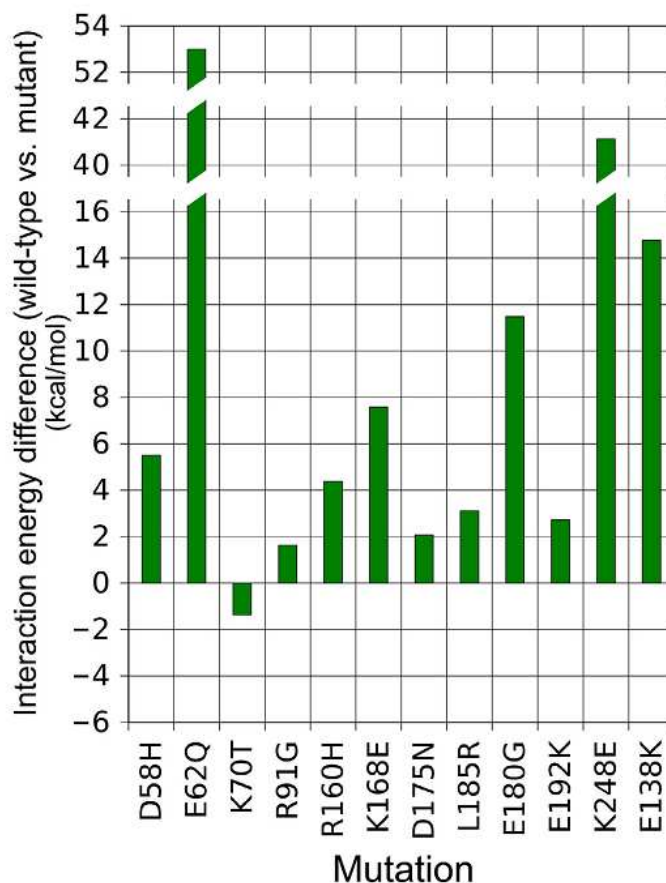


Рис. 11. Гистограмма, иллюстрирующая изменения в энергии кулоновских взаимодействий между Трп и актиновым филаментом при различных аминокислотных заменах в изоформе Трп 1.1, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией [128]. Положительные значения на гистограмме указывают на ослабление взаимодействий между Трп и актиновым филаментом.

Главным выводом из этой работы является то, что при кардиомиопатических мутациях в генах Трп может нарушаться прочность комплекса Трп с актиновым филаментом в положении blocked, что может приводить к более легкому смещению Трп в последующие состояния, а это, в свою очередь, может раньше времени запускать мышечное сокращение при низких концентрациях кальция и приводить к гиперсократительному фенотипу. Эта модель [128] может служить отличным инструментом для прогнозирования эффектов новых мутаций в генах Трп, для которых

еще неизвестны их проявления на молекулярном уровне. Косвенно эта модель подтверждается тем, что для большинства проанализированных мутаций было действительно обнаружено снижение сродства Трп к актину и увеличение чувствительности миозин-актинового взаимодействия к ионам Ca^{2+} [119, 129, 130]. Эта модель не лишена, однако, очевидных недостатков, как накладываемых расчетами (модель не предполагает никаких тепловых движений Трп относительно поверхности актинового филамента), так и другими факторами. Например, зависимость изменений свободной энергии взаимодействия Трп с актином от мутаций в гене Трп удалось найти только для мутаций, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией, но не удалось выявить для мутаций, ассоциированных с дилатационной кардиомиопатией [128]. Помимо этого, модель не охватывает все гипертрофические мутации, найденные в Трп, и справедлива только для тех, которые находятся поблизости от участков взаимодействия Трп с актином, что не позволяет использовать ее для объяснения эффектов всех таких мутаций. Для некоторых из них было обнаружено влияние соответствующих аминокислотных замен на взаимодействие Трп с тропониновым комплексом [131], которое будет подробно рассмотрено ниже, при анализе другой модели.

Стоит отметить, что в литературе также существует очень похожая модель, ставящая во главу угла взаимодействие Трп с актиновым филаментом и объясняющая тем самым эффекты мутаций в генах Трп, связанные с развитием наследственных заболеваний скелетной мускулатуры [125]. В ее основе также лежат нарушения, вызванные изменением электростатических взаимодействий Трп с актином, а также нарушения взаимодействий между N- и C-концами молекул Трп, которые, в свою очередь, могут приводить к нарушению формирования протяженного тропомиозинового тяжа вдоль поверхности актинового филамента. Эта модель также не лишена всех перечисленных выше недостатков. Но к ним также можно добавить еще и то, что она, на наш взгляд, лишена какой-либо достаточной прогностической силы, т.к. не очень понятно, как можно объяснить все многообразие проявлений, связанных с наследственными заболеваниями скелетной мускулатуры, используя лишь нарушения во взаимодействии Трп с актиновым филаментом, имеющие в целом сходный характер.

В другой модели, объясняющей механизм развития кардиомиопатий, основное внимание уделяется влиянию мутаций на взаимодействие Трп с тропониновым комплексом (главным образом, с одним из его компонентов – тропонином Т) на поверхности актинового филамента. К сожалению, в основе этой модели нет какой-то одной работы, в которой был бы проанализирован весь пул возможных эффектов; имеется

лишь небольшое количество работ, в которых эффекты кардиомиопатических мутаций в генах Тpm и тропонина Т объясняются именно через структурные изменения в комплексе Тpm с тропонином [131–133]. Рассмотрение этой модели мы хотели бы провести на примере трех работ, в которых внимание сконцентрировано главным образом на физиологической значимости взаимодействия Тpm с тропонином. Так, в 2003 году А. Hinkle и L. Tobacman показали, что мутации в N-концевой части тропонина Т (именно в этой консервативной области наблюдается наибольшее количество мутаций) влияют на стабильность его С-концевого «хвоста», вступающего во взаимодействие с Тpm. На примере мутации F110I в тропонине Т им удалось продемонстрировать, что увеличение жесткости структуры тропонина Т ослабляет его взаимодействие с Тpm, что в свою очередь влияет на способность Тpm регулировать взаимодействие миозина с актином [132]. Кроме того, в этой работе была выдвинута гипотеза о том, что большинство кардиомиопатических мутаций в «хвосте» тропонина Т влияет на актин-миозиновое взаимодействие не напрямую, а опосредовано, через его взаимодействие с Тpm. В 2004 году другому коллективу авторов удалось показать, что замена участков в изоформе Тpm 1.1, ответственных за связывание тропонина Т, на аналогичные участки, взятые из изоформы Тpm 2.2, приводит к тяжелым физиологическим последствиям, снижая интенсивность сокращения и расслабления мышечных сердец, экспрессирующих мутантные белки [133]. Особняком стоит работа, опубликованная большим коллективом авторов в 2015 году, в которой было показано, что аминокислотные замены в Тpm, вызванные кардиомиопатическими мутациями, могут приводить к изменениям в структуре тропонина С (компонента тропонинового комплекса, с которым Тpm не вступает в непосредственное взаимодействие) [131]. Результатом подобных изменений является увеличение сродства тропонина С к ионам Ca^{2+} , которое, в свою очередь, повышает кальциевую чувствительность актин-миозинового взаимодействия. Очевидно, что и у этой модели также имеется много недостатков; в частности, довольно трудно представить, как замены в молекуле Тpm, отдаленные от зоны контакта Тpm с тропонином Т, могут влиять на взаимодействие этих белков. Непонятными с точки зрения этой модели представляются также эффекты тех мутаций в генах Тpm, которые не приводят к изменению Ca^{2+} -чувствительности актин-миозинового взаимодействия.

Ну и наконец, еще одну модель для объяснения эффектов мутаций, ассоциированных с развитием гипертрофической кардиомиопатии, предложили недавно S.S. Lehrer и M.A. Geeves [134]. В основе модели лежит концепция, предполагающая появление нового, 4-го состояния в описанной выше «модели 3-х состояний», которую McKillop и Geeves предложили для описания механизма регуляции мышечного

сокращения еще в 1993 году [19]. Суть этой модели заключается в том, что в определенных ситуациях (например, при гипертрофической кардиомиопатии) может возникать состояние, при котором миозиновые головки способны связываться с актиновым филаментом и генерировать силу даже в отсутствие Ca^{2+} , приводя к гиперсократительному фенотипу и неполной релаксации сердечной мышцы. Эта модель основана на наблюдениях, что при многих мутациях в белках сократительного аппарата мышц, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией, базальная АТФазная активность актомиозина сохраняется даже при низких концентрациях Ca^{2+} , т.е. в тех условиях, когда взаимодействие миозина с актином является в норме невозможным [135–138]. Несомненным преимуществом данной модели является то, что она объединяет эффекты всех таких мутаций во всех белках сократительного аппарата в единую концепцию. Однако, к сожалению, далеко не всегда удается обнаружить такую базальную активность для всего множества подобных мутаций, что явно ставит под сомнение универсальность данной модели. Кроме того, авторы предполагают, что взаимодействие миозина с актином в мышце может протекать без участия ионов Ca^{2+} , что, как нам кажется, должно приводить к полной потере регуляции мышечного сокращения. На наш взгляд, возникновение подобного состояния представляется более вероятным уже в процессе мышечного сокращения, запущенного ионами Ca^{2+} .

Как видно из описанных выше моделей, до сих пор нет единого мнения о механизме развития гипертрофических кардиомиопатий. Кажется вполне вероятным, что каждая из моделей может быть вполне справедливой для отдельно взятых мутаций. Также нельзя исключить возможность того, что существуют мутации, которые не подходят ни под одну из предложенных моделей. В этом отношении особенно интересными представляются исследования, посвященные мутациям в генах *Трт*, приводящим к изменениям его взаимодействия с белками, не принимающими непосредственного участия в мышечном сокращении. Так, было показано, что такие мутации могут приводить к нарушениям взаимодействия *Трт* с тропомодулином [139] и небулином [140]. Особенно актуальными могут стать исследования нарушений во взаимодействиях *Трт* с другими актин-связывающими белками при изучении механизмов развития наследственных заболеваний скелетных мышц, в силу огромного количества разнородных фенотипических изменений и нарушений в структуре саркомера, наблюдаемых при развитии подобных болезней.

Некоторые конкретные аминокислотные замены в молекуле Трп

В заключение раздела, посвященного наследственным заболеваниям скелетной и сердечной мышц, хотелось бы подробнее рассмотреть некоторые конкретные аминокислотные замены, вызываемые мутациями в генах Трп и ассоциированные с такими заболеваниями, влияние которых на свойства Трп является на данный момент наиболее изученными, а также привести имеющуюся информацию о тех заменах, влияние которых на свойства Трп было исследовано в нашей работе.

Как уже упоминалось выше, в данной работе мы концентрируем внимание на мутациях, приводящих как к различным видам кардиомиопатий, так и к наследственным заболеваниям скелетной мускулатуры. Наиболее изученными на данный момент кардиомиопатическими мутациями в гене TPM1 являются мутации E180G и D175N, ассоциированные с гипертрофической кардиомиопатией, и мутации E40K и E54K, ассоциированные с дилатационной кардиомиопатией. Исследование эффектов этих мутаций является прекрасным примером основательного подхода к изучению молекулярных механизмов развития ассоциированных с ними заболеваний. В частности, было показано, что эти мутации оказывают заметное влияние на свойства Трп 1.1 и на доменную структуру его молекулы [129,141]; помимо этого, было выявлено влияние этих мутаций на акто-миозиновое взаимодействие, лежащее в основе молекулярного механизма мышечного сокращения [110, 142]. Интересно отметить, что замена E180G значительно снижает температуру диссоциации Трп с поверхности актинового филамента и, соответственно, температуру его тепловой денатурации в присутствии F-актина [129]. Более того, были даже получены специальные линии трансгенных мышей, несущих данные аминокислотные замены в структуре Трп, после чего было показано, что мыши с мутацией E180G умирают гораздо раньше, чем остальные [143]. Все эти результаты впервые позволили приблизиться к пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе физиологических эффектов данных мутаций, приводящих к тяжелым кардиомиопатиям, в том числе с летальным исходом.

В случае мутаций, приводящих к развитию наследственных заболеваний в скелетной мускулатуре, наиболее хорошо известной и изученной из них является мутация R91G в изоформе Трп 2.2, ассоциированная с развитием дистального артрогриппоза. Эта замена оказывала сильное влияние на структуру молекулы Трп [144] и на ее функциональные свойства. Так, она увеличивала Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия [130] и изменяла способность Трп перемещаться по

поверхности актинового филамента, что способствовало более быстрому переходу миозиновых головок в состояние сильного связывания [145].

В нашей работе мы исследовали свойства рекомбинантных препаратов Трм с аминокислотными заменами, ассоциированными как с кардиомиопатиями (замены I172T, E180V, L185R, K15N, M8R, I284V, M281T и A277V в Трм 1.1), так и с дистальным артрогриппозом 2В типа и миопатией (замены N202K и R133W в Трм 2.2, соответственно). Список этих замен с указанием заболеваний, с которыми они ассоциированы, представлен в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотные замены в рекомбинантных препаратах Трм, используемых в настоящей работе, с указанием заболеваний, с которыми они ассоциированы, и положения в гептадах Трм.

Аминокислотная замена	Заболевание	Положение в гептаде
I172T	Гипертрофическая кардиомиопатия	d
E180V	Гипертрофическая кардиомиопатия/дилатационная кардиомиопатия	e
L185R	Гипертрофическая кардиомиопатия	c
K15N	Дилатационная кардиомиопатия	a
M8R	Дилатационная кардиомиопатия	a
I284V	Гипертрофическая кардиомиопатия	d
M281T	Гипертрофическая кардиомиопатия	a
A277V	Дилатационная кардиомиопатия	d
N202K	Дистальный артрогриппоз 2В типа	f
R133W	«Кэповое заболевание»	g

Выбор кардиомиопатических мутаций был совсем не случаен. В нашей работе мы исследовали эффекты мутаций, расположенных в области связывания Трм с тропонином Т, предполагая, что они могут иметь наиболее ярко выраженные эффекты, поскольку именно в этой области в тесном контакте расположены все 3 белка тонкого филамента (актин, Трм и тропониновый комплекс) и потому препараты Трм с такими заменами могут обладать общими свойствами. На сегодняшний день известно, что тропонин связывается с Трм через тропонин Т в двух участках – как в области остатка Cys190 молекулы Трм, так и в области контакта двух соседних молекул Трм на поверхности актинового филамента, т.е. в зоне перекрытия N- и C-концов молекул Трм [106, 146–148] (рис. 9, 12). Если точные границы области взаимодействия Трм с тропонином в области остатка Cys190 еще окончательно не установлены, то для зоны перекрытия N- и C-концов молекул Трм уже имеются структуры, полученные с достаточно хорошим разрешением, что облегчает анализ эффектов кардиомиопатических мутаций в этой области [87, 149].

Таким образом, мы выбрали мутации, которые находятся в двух разных участках связывания тропонина Т с Трм (рис. 12).

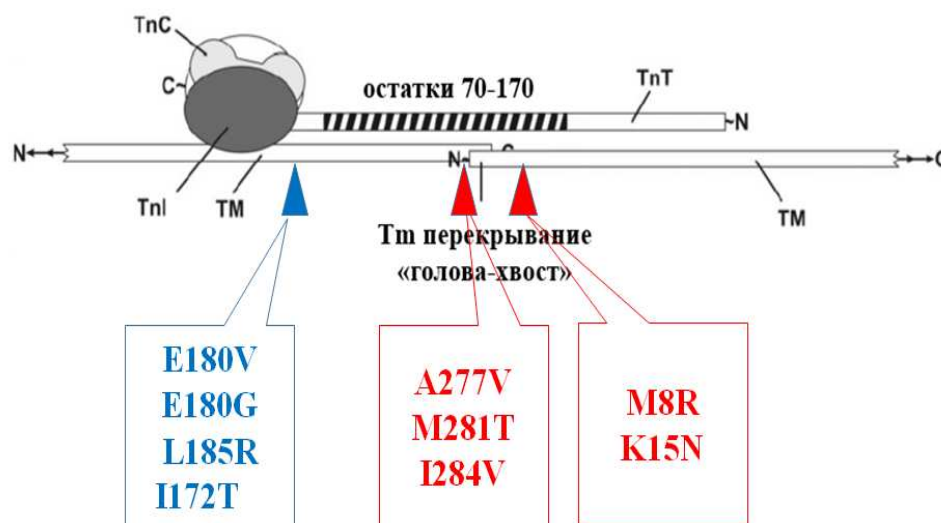


Рис. 12. Схематические изображения контактов Трм с тропонином Т в составе тропонинового комплекса [146] в двух участках молекулы Трм: в области остатка Cys190 (синий треугольник) и в области перекрывания N- и C-концов двух соседних молекул Трм на поверхности актинового филамента (красные треугольники). В выносках приведены изучаемые в данной работе аминокислотные замены в Трм.

Для большинства этих кардиомиопатических мутаций их влияние на свойства Трм на данный момент либо очень мало изучено, либо еще не изучено вообще и для них существуют только генетические работы или морфологические наблюдения. Так, для мутаций E180V, A277V, M8R и K15N проводились пока только клинические работы [150–152]. Крайне интересной с точки зрения клинической картины представляется мутация E180V, поскольку сначала она ассоциирована с развитием гипертрофической кардиомиопатии, а впоследствии (после достижения пациентом возраста 40 лет) ее проявления приобретают признаки дилатационной кардиомиопатии [150]. Для мутаций M281T, L185R и I172T была продемонстрирована незначительная стабилизация структуры Трм, а также (для всех, кроме мутации I172T) – небольшое увеличение сродства Трм к актину [131]. Мутации M281T и L185R также слегка увеличивали АТФазную активность миозина в присутствии регулируемых тонких филаментов [131], а замены I172T и L185R приводили к изменению кальциевой чувствительности актин-миозинового взаимодействия [119, 131]. Для мутации I284V было продемонстрировано, что кардиомиоциты, взятые при биопсии сердца человека с этой мутацией, обладают повышенной кальциевой чувствительностью при активации их сокращения [153].

Что касается мутаций, приводящих к заболеваниям скелетной мускулатуры, то об их влиянии на свойства Трм известно также совсем немного. Так, в случае мутации N202K имеются только гистологические наблюдения [123, 154], а для мутации R133W есть некоторые данные об изменениях функциональных свойств: в экспериментах на миофибриллах было показано замедление скорости присоединения миозиновых головок к актиновому филаменту с одновременным увеличением скорости их отсоединения [155].

Как видно из приведенного анализа литературы, посвященной наследственным заболеваниям мышц, ассоциированным с мутациями в генах Трм, молекулярные механизмы развития таких заболеваний остаются пока неясными. Именно этот пробел мы попытались хотя бы отчасти восполнить в своей работе.

1.4. Гетеродимеры тропомиозина – одна из важных форм его существования

Виды существующих в мышцах гетеродимеров Трм и их распределение.

Абсолютное большинство работ, в которых рассматриваются гетеродимеры Трм, на данный момент носит описательный характер, т.е. в них рассматривается лишь процентное содержание гетеродимеров в мышечных тканях, а также потенциальная возможность формирования того или иного типа гетеродимеров. Это связано с огромной сложностью их получения *in vitro*, а точнее – получения фракции Трм, которая бы была полностью представлена только гетеродимерами. Эта проблема была разрешена относительно недавно, лишь в 2012 году, благодаря работе, в которой был описан специально разработанный метод получения гетеродимеров Трм [156]. Сначала, однако, остановимся на описании мышечных изоформ Трм, способных к формированию его гетеродимеров в скелетных мышцах, и рассмотрим их особенности.

Как отмечалось выше, в скелетных мышцах экспрессируются три изоформы Трм – Трм 1.1 (α -Трм по старой классификации), Трм 2.2 (β -Трм) и Трм 3.1 (γ -Трм), являющиеся продуктами разных генов (TRPM1, TRPM2 и TRPM3, соответственно). Все они способны к образованию не только гомодимеров, но и гетеродимеров, состоящих из цепей разных изоформ. Так, α - и γ -изоформы Трм способны формировать гетеродимеры с β -изоформой Трм, но не друг с другом [47]. Поскольку в настоящей работе мы использовали только α - и β -изоформы Трм – основные изоформы Трм быстрых скелетных мышц, то остановимся здесь только на них. Димерные молекулы Трм быстрых скелетных мышц обычно представлены либо $\alpha\alpha$ -гомодимерами, либо $\alpha\beta$ -гетеродимерами [47], т.к. $\beta\beta$ -гомодимеры нестабильны и встречаются очень редко [157]. В процентном

соотношении α -изоформа Трп в быстрых скелетных мышцах (60%) обычно доминирует над β -Трп (40%) [158], однако соотношение этих изоформ может варьировать в зависимости от источника, типа и вида мышц [41, 159]. Интересно заметить, что несмотря на термодинамическую предрасположенность к формированию гомодимеров в смеси α - и β -изоформ Трп [156], в скелетных мышцах часто наблюдается появление $\alpha\beta$ -гетеродимеров [160].

Методы получения гетеродимеров Трп in vitro и подходы к их изучению.

Структурно-функциональные особенности $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп.

Получение изолированных $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп скелетных мышц представляет собой чрезвычайно сложную и трудоемкую задачу. Лишь совсем недавно, в 2012 году, в лаборатории М. Дживса (M. Geeves) был разработан новый эффективный метод, основанный на введении N-концевого His-tag в одну из двух цепей Трп, экспрессируемых в *E. coli* (в β -цепь), и позволяющий отделять методом аффинной хроматографии $\alpha\beta$ -гетеродимеры Трп от $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеров, получая таким образом чистые препараты $\alpha\beta$ -гетеродимеров [156]. Используя этот подход, авторы показали, что $\alpha\beta$ -гетеродимеры Трп отличаются по термостабильности как от $\alpha\alpha$ -, так и от $\beta\beta$ -гомодимеров. Кроме того, сродство $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп к F-актину было ниже, чем у $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеров. В экспериментах по связыванию изолированных головок миозина (субфрагмент 1 миозина, S1) с тонкими филаментами (актиновыми филаментами, содержащими Трп и тропонин) никаких отличий $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп от $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеров авторам обнаружить не удалось [156]. Тем не менее, в этой работе впервые удалось показать, что $\alpha\beta$ -гетеродимеры скелетномышечного Трп отличаются по некоторым свойствам от его гомодимеров.

Гетеродимеры и гомодимеры Трп с мутациями лишь в одной из двух цепей.

Почему это так важно изучать.

Актуальность этой проблематики лежит на поверхности. Учитывая то, что в скелетных мышцах практически нет $\beta\beta$ -гомодимеров Трп, как это уже отмечалось выше, все эффекты, вызываемые мутациями в β -цепи Трп, определяются свойствами ее гетеродимера с α -цепью Трп. Представляется совершенно очевидным, что эффекты мутаций в β -цепи Трп следует исследовать именно с использованием $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп, а не $\beta\beta$ -гомодимеров. Однако все работы с использованием рекомбинантных препаратов β -Трп (в частности, все исследования эффектов мутаций в β -Трп на его структуру и свойства) проводились ранее исключительно на препаратах $\beta\beta$ -гомодимеров.

Работы, выполненные с использованием $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп с мутациями в β -цепи, на данный момент пока отсутствуют. Мы решили восполнить этот пробел и исследовать свойства таких препаратов, после чего сравнить полученные результаты с уже имеющимися данными для $\beta\beta$ -гомодимеров Трп, несущих подобные мутации в обеих β -цепях.

Важно отметить, что исследование влияния мутаций лишь в одной из двух цепей димерной молекулы Трп актуально не только в случае гетеродимеров, но и в случае гомодимеров Трп, особенно в случае $\alpha\alpha$ -гомодимеров. Поскольку α -Трп (Трп 1.1) – это основная изоформа сердечной мышечной ткани, то в сердце она практически полностью представлена в виде $\alpha\alpha$ -гомодимеров. Часто мутации, ассоциированные с наследственными кардиомиопатиями, затрагивают в гене Трп лишь один аллель из двух, т.е. гетерозиготны по своей природе. Следовательно, в ходе синтеза α -изоформы Трп в сердечной ткани могут возникать цепи, как содержащие мутацию, так и не содержащие ее, что, в свою очередь, может приводить к формированию $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп, несущих мутацию лишь в одной из двух цепей. Подобные гомодимеры (с мутацией лишь в одной из цепей) могут, видимо, заметно отличаться по своим свойствам от гомодимеров, где она представлена в двух цепях одновременно. Подтверждением этой гипотезы явилась единственная пока работа на эту тему, выполненная недавно, в 2012 году, в лаборатории М. Дживса. [161]. Оказалось, что $\alpha\alpha$ -гомодимеры Трп, несущие аминокислотную замену E180G лишь в одной из двух цепей, отличались по своей термостабильности и актин-связывающим свойствам как от $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп дикого типа, так и от $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп с такими заменами в обеих цепях молекулы.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Получение препаратов белков

Сайт-направленный мутагенез.

Кодирующая последовательность Trpm 1.1 скелетномышечной ткани человека (284 а.а., Uniprot ID P09493) в векторе рMW172 была любезно предоставлена доктором Чарльзом Редвудом (Оксфордский университет, Великобритания). Кодирующая последовательность Trpm 2.2 (284 а.а., Uniprot ID P07951), содержащего N-концевой His-tag и сайт для протеолиза десятым фактором свертываемости крови (factor Xa), находилась в векторе рJC20 и была любезно предоставлена профессором Майклом Дживсом (Кентский Университет, Великобритания). Молекулярно-генетическая конструкция для Trpm 2.2, не содержащая His-tag, была получена путем переклонирования исходной последовательности в вектор рMW172 по сайтам рестрикции NDEI и ECoRI с использованием пары специфичных праймеров, приведенных в таблице 2. Также мы получили содержащую His-tag молекулярно-генетическую конструкцию для Trpm 1.1 с использованием специфических праймеров (таблица 2) и повторным клонированием в вектор рMW172. Молекулярно-генетические конструкции, содержащие аминокислотные точечные замены, были получены методом сайт-направленного мутагенеза на основе плазмид дикого типа. Кодирующим последовательностям Trpm предшествовала последовательность 5'-GCTAGC-3', соответствующая дипептиду Ala-Ser, который имитировал N-концевое ацетилирование, необходимое для взаимодействия Trpm с F-актином [83]. Мутации были внесены с использованием пары перекрывающихся праймеров (рис. 13), содержащих необходимые замены, или методом клонирования с мега-праймером (рис. 14). Мутагенные, а также вектор-специфичные праймеры приведены в таблице 2. Подробности клонирования изображены на рисунках 13 и 14.

Таблица 2. Олигонуклеотидные последовательности, используемые в работе.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
T7 fw	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 rev	5'-CGGGCTTTGTTAGCAGCCG-3'
Trpm 1.1 His-Tag fw	5'CATATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACATCGAAGGGCG CGCTAGCATGGACGCCATCAAG-3'
Trpm 1.1 rev	5'ATATATGAATTCTTATATGGAAGTCATATCGGTTGAG-3'

Tpm 2.2 fw	5' ATATACATATGGCGAGCATGGACGCC-3'
Tpm 2.2 rev	5' ATATAGAATTCTCAGAGGGAAGTGATGTCATTG-3'
C190A fw	5'-AAGGCAAAGCTGCCGAGCTTG-3'*
C190A rev	5'-CAAGCTCGGCAGCTTTGCCTT-3'*
G126R fw	5'-GAGTGAGAGACGCATGAAAG-3'*
G126R rev	5'-CTTTCATGCGTCTCTCACTC-3'*
D137L fw	5'-GCCCAAAAACTTGAAGAAAAA-3'*
D137L rev	5'-TTTTTCTTCAAGTTTTTGGGC-3'*
S36C fw	5'-GACAGGTGCAAGCAGCTG-3'*
S36C rev	5'-CAGCTGCTTGACCTGTC-3'*
S123C fw	5'-AGCAGATGAGTGTGAGAGAGGC-3'*
S123C rev	5'-GCCTCTCTCACACTCATCTGCT-3'*
E180V fw	5'-GAACGTGCAGTGGAGCGG-3'*
E180V rev	5'-CCGCTCCACTGCACGTTC-3'*
L185R fw	5'- GCTGAGCGCTCAGAAGGC-3'*
L185R rev	5'- GCCTTCTGAGCGCTCAGC-3'*
I172T fw	5'- GCTGGTCATCACTGAGAGCGAC-3'*
E180G fw	5'- GAACGTGCAGGGGAGCGG-3'*
M8R fw	5'-ATATTCATATGGCTAGCATGGACGCCATCAAGAAGAAG AGGCAGATG-3'*
K15N rev	5'-GGCGTTCTCGTTGTCGAGCTTC-3'*
I284V rev	5' TATATGAATTCTTATACGGAAGTCATATCG 3'*
M281T rev	5'-TATATGAATTCTTATATGGAAGTCGTATCGTTGAGAGC-3'*
A277V rev	5'-TATATGAATTCTTATATGGAAGTCATATCGTTGAGAAC GTGGTC 3'*
M127A/I130A fw	5'-GAGAGGCGCGAAAGTCGCTGAGAGTC-3'*
M141A/Q144A rev	5'-GATCTCCGCAATTTCCGCTTTTTC-3'*
R133W Tpm2.2 rev	5'-CTTCATGGCCAGTTCTCAATG-3'*
N202K Tpm 2.2 fw	5'-GAAAATTGTTACCAAGAACTTGAAATCTC-3'*

*- мутагенные кодоны подчеркнуты

Полученную с помощью ПЦР кодирующую последовательность, содержащую интересующую мутацию, и вектор pMW172 подвергали действию эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *EcoRI* в течение 3 часов при 37°C. За 20 минут до окончания рестриктной реакции к вектору добавляли термочувствительную щелочную фосфатазу

(FASTAP, Fermentas), после чего ферменты инактивировали 20 мин при 70°C. Далее проводили лигазную реакцию, добавляя 10-кратный молярный избыток полученного фрагмента (вставки) относительно вектора. Реакцию проводили с использованием фермента T4 DNA Ligase («СибЭнзим-М») в течение ночи при 4°C или в течение 1,5 часов при 20°C; ферменты инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. После этого проводили отбор клонов при помощи метода ПЦР-скрининга («screening»), «положительные» клоны (содержащие фрагмент нужного размера) выращивали в течение ночи в 5 мл среды Лурия-Бертани (LB) с добавлением ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл. Выделение плазмиды проводили при помощи набора GeneJet Plasmid MiniPrep Kit (Fermentas) или набора Plasmid Miniprep («Евроген»). Корректность нуклеотидной последовательности и наличие исследуемых мутаций проверяли с помощью секвенирования в коммерческой организации «Евроген».

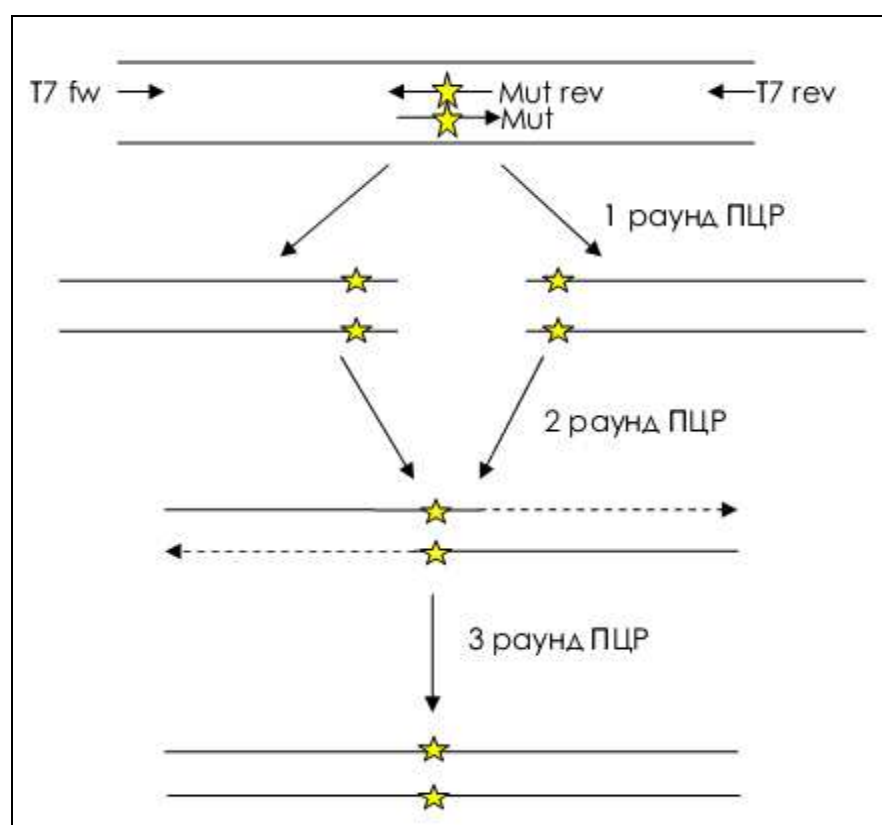


Рис. 13. Схема сайт-направленного мутагенеза с использованием пары перекрывающихся праймеров. Звездами на схеме обозначены места внесения мутации в структуру кодирующей последовательности. T7 fw и T7 rev – пара праймеров, комплементарных последовательности вектора; Mut fw и Mut rev – пара праймеров, несущих вводимую мутацию.

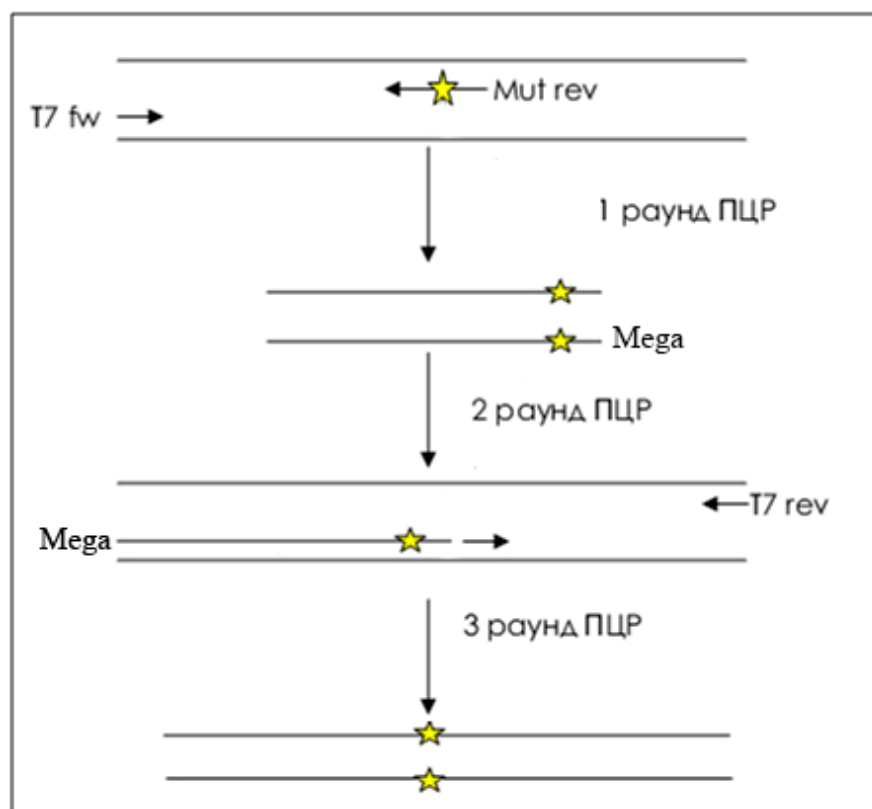


Рис. 14. Схема сайт-направленного мутагенеза с использованием мега-праймера. Звездами на схеме обозначены места внесения мутации в структуру кодирующей последовательности. T7 fw и T7 rev – пара праймеров, комплементарных последовательности вектора; Mut rev – праймер, необходимый для создания мега-праймера, несущий вводимую мутацию. Mega – мега-праймер.

Экспрессия рекомбинантного тропомиозина в клетках *E. coli*.

Рекомбинантный Trm и его мутанты были экспрессированы в клетках *E. coli* штамма C41(DE3). Трансформацию «химически» компетентных клеток проводили плазмидой pMW172 или pJC20, содержащей необходимую конструкцию, и затем высевали трансформантов на чашки со средой LB-агар, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Далее, одиночные колонии инокулировали в 15 мл стерильной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и оставляли на ночь на шейкере при 37°C и 234 об/мин. После этого 15 мл ночной культуры добавляли в 1 литр среды LB (содержащей 100 мкг/мл ампициллина) и оставляли клетки расти на шейкере до величины оптической плотности при 600 нм, равной 0,8–1,2 (~ 3 часа). К среде добавляли индуктор экспрессии изопропилтиогалактозид (IPTG) до конечной концентрации 1 mM и продолжали экспрессию в течение 3–4 часов. Осадок клеток собирали центрифугированием при 4000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R в течение 1 часа при 4°C, а затем его ресуспендировали в лизис-буфере (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 15% сахара, 1 mM PMSF, 1 mM ЭДТА), если белок не содержал His-Tag. Для конструкций, содержащих His-tag, ресуспендирование проводили в буфере А (10 mM имидазол-HCl,

pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF). Полученные клетки замораживали и хранили при -70°C до выделения.

Выделение и очистка Трт методом ионообменной хроматографии.

Осадок клеток размораживали в 15 мл холодного лизис-буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 15% сахароза, 1 mM PMSF, 1 mM ЭДТА) и тщательно ресуспендировали. После этого суспензию клеток подвергали обработке ультразвуком в течение 10 мин с использованием прибора Vibra Cell (Sonics, США). Затем к суспензии добавляли лизис-буфер, содержащий дополнительно 2 M NaCl, и инкубировали на льду в течение 15 мин. Для избавления от большого количества балластных белков лизат подвергали тепловой обработке на водяной бане в течение 6 мин при температуре 85°C, затем охлаждали на льду и центрифугировали при 13400g в течение 40 мин. Супернатант подвергали изoeлектрическому осаждению (добавляли 4 M ацетат натрия с pH 4,8 до конечной концентрации 100 mM) при перемешивании на шейкере в течение 20 мин при 4°C. Полученный раствор центрифугировали 40 мин при 13400g. Осадок растворяли в буфере А (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) и проводили диализ против 1 л этого буфера в течение ночи для ренатурации тропомиозина.

Диализат фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Далее проводили очистку супернатанта, содержащего ренатурированный тропомиозин, при помощи ионообменной хроматографии на колонке HiTrap QHP (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы ProStar 3250 (Varian Inc.). Две колонки соединяли в тандем и уравнивали 5 объемами буфера А (50 мл) при скорости 3 мл/мин, после чего на колонку наносили белок. Затем колонку отмывали от не связавшихся белков в течение 10 мин при той же скорости. Элюцию проводили градиентом соли от 200 до 2 M NaCl на буфере А, собирая фракции по 3 мл. После хроматографии проводили SDS-электрофорез для анализа белкового состава фракций с колонки. Фракции, содержащие наибольшее количество Трт, объединяли и подвергали изoeлектрическому осаждению, как это описано выше, а затем центрифугировали при 4°C в течение 30 мин при 13400g. Осадок перерастворяли в небольшом объеме диализного буфера (30 mM Hepes-NaOH, pH 7,3, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF) и диализовали против 2 л этого буфера в течение ночи.

Концентрацию белка в диализате определяли спектрофотометрически, а затем полученный препарат разделяли на аликвоты, быстро замораживали и хранили при -70°C.

Выделение и очистка Трп методом металло-аффинной хроматографии.

Осадок клеток размораживали в буфере А (10 мМ имидазол-НCl, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 1 мМ PMSF) и тщательно ресуспендировали, после чего суспензию клеток подвергали обработке ультразвуком в течение 10 мин. Затем обработанную подобным образом суспензию подвергали центрифугированию при 13400g в течение 40 мин. Полученный супернатант наносили на колонку HisTrap HP (GE HealthCare) объемом 5 мл, предварительно уравновешенную 10 объемами (50 мл) буфера А. Эту колонку подключали к хроматографической системе ProStar 3250 (Varian Inc.) и промывали при скорости 3 мл/мин в течение 10–20 мин. Элюцию проводили градиентом имидазола от 10 до 500 мМ на базе буфера А. Фракции, содержащие наибольшее количество Трп, объединяли и диализовали против 2 л буфера 30 мМ Hepes-NaOH, рН 7,3, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ PMSF в течение ночи. Затем белок замораживали и хранили при –70°C.

Формирование гетеродимеров Трп и его гомодимеров с мутацией в одной из двух цепей.

$\alpha\beta$ -Гетеродимеры Трп получали согласно описанной ранее методике [156] с некоторыми введенными нами модификациями. Принцип методики получения $\alpha\beta$ -гетеродимеров приведен на рис. 15.

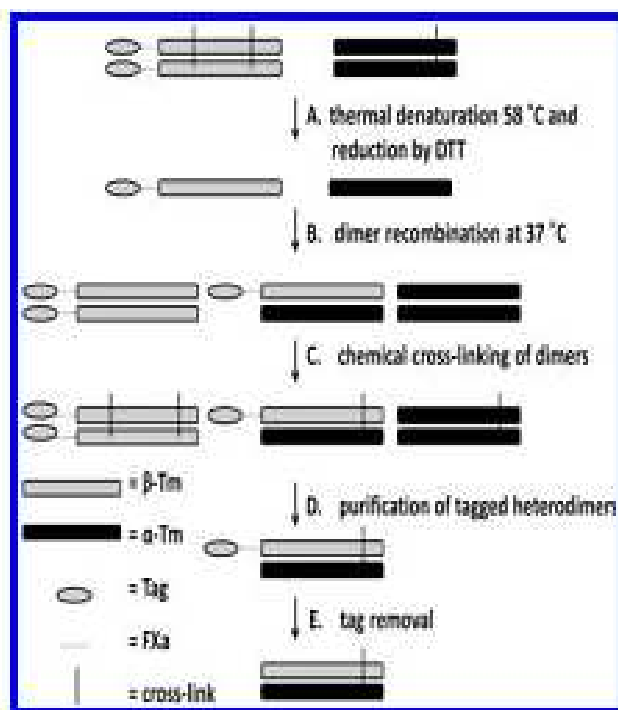


Рис. 15. Схема получения $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина [156].

Суть этой методики сводится к следующему: $\alpha\alpha$ -гомодинеры Трп, содержащие в своей структуре необходимую мутацию, смешивали с $\beta\beta$ -гомодинерами, содержащими N-концевой His-tag, в молярном отношении, равном 3:1. Затем смесь нагревали до 65°C для разделения димеров Трп на отдельные мономеры, после чего полученную смесь мономеров охлаждали до 25°C и инкубировали при этой температуре для реассоциации цепей Трп с образованием димеров. При этом образуется смесь $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодинеров и $\alpha\beta$ -гетеродимеров. Затем полученную смесь гомодимеров и гетеродимеров Трп подвергали металло-аффинной хроматографии. Для этого препарат наносили на колонку His-Trap HP (GE HealthCare) объемом 1 мл, на которой удерживаются лишь $\alpha\beta$ -гетеродимеры и $\beta\beta$ -гомодинеры, содержащие His-tag в β -цепи. Колонку промывали в течение 10 мин буфером А (10 мМ имидазол-HCl, pH 8,0, 300 мМ NaCl), после чего белки разделяли градиентом имидазола от 10 до 500 мМ на основе буфера А. Фракции собирали, отбирали аликвоты для анализа методом SDS-электрофореза, и на основе полученных электрофореграмм объединяли только те фракции, которые содержали $\alpha\beta$ -гетеродимеры Трп (т.е. те, в которых соотношение His- β -Трп и α -Трп с интересующей мутацией оставляло 1:1). После этого белок диализовали в течение ночи против буфера, оптимального для работы протеазы Factor Xa (NEB) (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂). На последней стадии His-tag отщепляли от β -цепи $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп, обрабатывая их протеазой Factor Xa (NEB). При этом инкубацию с протеазой проводили не при комнатной температуре, как в исходно описанной методике, а при 4°C, т.к. это предотвращало протеолиз по дополнительному сайту, расположенному в центре молекулы Трп.

$\alpha\alpha$ -Гомодимеры Трп с мутацией в одной из двух цепей получали аналогичным способом [156, 161], только в качестве белка, содержащего His-tag, использовали не β -Трп, а α -Трп C190A.

Получение других белков, используемых в работе.

Актин, тропонин и миозин получали из скелетных мышц кролика по стандартным методикам [162–164]. Мономерный G-актин полимеризовали в филаменты F-актина, добавляя к нему KCl и MgCl₂ до конечной концентрации 100 мМ и 2 мМ соответственно [163]. Полученный F-актин стабилизировали, добавляя к нему 1,5-кратный молярный избыток фаллоидина (Sigma Chemical Co.). Субфрагмент 1 миозина (S1) получали путем переваривания миозиновых филаментов α -химотрипсином, обработанным TLCK («Sigma») [165].

2.2. Методы, использованные для анализа структуры молекулы тропомиозина

Спектроскопия кругового дихроизма (КД).

В основе метода кругового дихроизма (КД) лежит взаимодействие оптически активных молекул с поляризованным светом, при этом прибор определяет разность молярного поглощения лево- и правополяризованного света ($\Delta \xi = M^{-1} \text{см}^{-1}$). Разность молярного поглощения можно перевести в молярную эллиптичность (θ), умножив ее на коэффициент 3298, тогда результат будет представлен в градусах. При исследовании белков чаще используют молярную эллиптичность (θ), приведенную на один аминокислотный остаток, которая рассчитывается по формуле:

$$(\theta) = (M \cdot \theta_{\lambda}) / 10 \cdot d \cdot C,$$

Где θ_{λ} – молярная эллиптичность в градусах, M – средняя молекулярная масса на остаток (115 Да), d – длина оптического пути в см, C – концентрация белка в г/л. Полученная величина имеет размерность $\text{град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}$.

Метод спектроскопии КД в дальней ультрафиолетовой области является эффективным методом изучения вторичной структуры белка, а анализ формы и амплитуды спектра может дать информацию о том, из каких элементов вторичных структур он состоит. Например, если в структуре белка есть α -спирали, то форма спектра характеризуется двумя отрицательными максимумами при 208 и 222 нм, и положительным при 192 нм. Спектры именно такой формы мы ожидали получить для растворов тропомиозина, полностью состоящего из α -спиралей.

Измерение спектров КД проводили на приборе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics) в Центре коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФИЦ биотехнологии РАН. Эксперименты проводили в диализном буфере (30 мМ HEPES-NaOH, pH 7,3, 100 мМ NaCl) в кювете с длиной оптического пути 0,02 см. Температурные зависимости тепловой денатурации $T_{\text{рт}}$ регистрировали при 222 нм, прогревая образцы с постоянной скоростью 1 °С/мин.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Изучение температурных зависимостей тепловой денатурации $T_{\text{рт}}$ проводили методом ДСК на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения РАН, Пущино), как было описано ранее [103, 129, 141]. Применение этого метода обусловлено тем, что в совокупности с

высокой точностью измерения, при анализе кривых избыточного теплопоглощения можно получить представление о стабильности молекулы, а также информацию о доменной структуре белка – т.е. о наличии в его молекуле калориметрических доменов (участков молекулы белка, которые при нагревании денатурируют кооперативно и независимо от других областей молекулы) [166]. Важно отметить, что кривые теплопоглощения являются индивидуальной характеристикой белка. Главными параметрами при их измерении являются температура максимума теплового перехода соответствующего калориметрического домена и энтальпия перехода (т.е. площадь под описывающей его кривой теплопоглощения). Стоит также заметить, что компьютерное разложение кривой теплопоглощения на отдельные калориметрические домены (деконволюция) применима только для белков с обратимой тепловой денатурацией, к числу которых относится тропомиозин.

Эксперименты проводили в диализном буфере (30 мМ Hepes-NaOH, pH 7,3, 100 мМ NaCl). Использование диализного буфера строго обязательно, т.к. ДСК является чрезвычайно чувствительным методом и даже незначительные изменения в составе или ионной силе буфера могут вносить существенные искажения при измерениях.

При проведении эксперимента методом ДСК рабочую ячейку калориметра заполняли белком с концентрацией ~2 мг/мл, растворенным в диализном буфере (при этом ячейку сравнения заполняли диализным буфером), и прогревали пробу при постоянной скорости 1 К/мин от 10 °С до 75–85 °С. Рабочий объем ячейки составляет 0,47 мл, а для ее полного заполнения требуется 0,83 мл пробы [166]. Препараты Trpm подвергали двум последовательным прогревам, чтобы продемонстрировать обратимость тепловой денатурации, что необходимо для последующего разложения кривых теплопоглощения на отдельные калориметрические домены. При получении кривых теплопоглощения для препаратов Trpm, содержащих в своей структуре аминокислотные остатки цистеина, первый прогрев не учитывали, т.к. присутствующий в пробе β-МЭ (необходимый для восстановления SH-групп Trpm) оказывал значительное влияние на кривую теплопоглощения. После 2-го прогрева препаратов их прогревали еще раз; при этом разницы в результатах 2-го и 3-го прогревов практически не наблюдалось.

При обработке данных из полученных экспериментальных кривых теплопоглощения сначала вычитали базовую линию прибора, полученную при заполнении обеих ячеек калориметра диализным буфером, а затем переводили условные единицы прибора в микроватты (μW), используя калибровочную метку мощностью 25 μW. Последующую обработку результатов (вычитание «химической» базовой линии,

нормализация по концентрации белка для расчета молярной энтальпии и т.п.) проводили, используя программу Origin 1.16 ("MicroCal"). В этой же программе проводили процедуру деконволюции (т.е. разложение кривой теплопоглощения на отдельные калориметрические домены), используя алгоритмы, предложенные ранее в работе [167].

Температурные зависимости эксимерной флуоресценции пиренил-меченого Trp

Метод измерения эксимерной флуоресценции основан на способности пиренил-йодацетамида образовывать возбужденные эксимеры (димеры). Такие эксимеры излучают флуоресценцию с максимумом при 485 нм, в то время как мономерная метка – при 390 нм. В молекуле Trp цепи, формирующие структуру СС, расположены параллельно, что дает возможность двум остаткам цистеина, расположенным в одном и том же месте в первичной структуре Trp 1.1, находиться в регистре – т.е. друг напротив друга в СС. При модификации таких остатков цистеина пиреновой меткой может образовываться эксимер. Денатурация Trp сопровождается расхождением двух его цепей и, соответственно, тушением пиреновой флуоресценции. Таким образом, вводя остатки цистеина в различные положения в молекуле Trp, по тушению эксимерной флуоресценции пирена можно наблюдать за тепловой денатурацией молекулы Trp в «заданной точке» (т.е. в том месте, где локализованы остатки цистеина).

Приготовление пиренил-меченого Trp проводили по методике, исходно предложенной Ishii & Lehrer [168] и несколько модифицированной в нашей лаборатории. Сначала проводили восстановление SH-групп в молекуле Trp. Для этого к 1 мл Trp с концентрацией 1,5–2 мг/мл добавляли DTT до конечной концентрации 4 мМ и нагревали препарат в течение 45 мин при 65°C. Затем проводили изоэлектрическое осаждение Trp, добавляя концентрированный Na-ацетатный буфер (pH 4,6) до конечной концентрации 120 мМ. Далее пробу инкубировали при 4°C при перемешивании на шейкере фирмы «Biosan» в течение 10 мин и центрифугировали 3 мин при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf MiniSpin. Осадок растворяли в 1 мл буфера 1 (30 мМ Hepes-NaOH, pH 7,3). Процедуру изоэлектрического осаждения повторяли, после чего полученный осадок растворяли в 0,8 мл буфера 2 (30 мМ Hepes-NaOH, pH 7,3, 5М гуанидин гидрохлорид), проверяли pH с помощью универсального индикатора и доводили его, если нужно, до значений 7,5–8,0 добавлением NaOH. Далее к раствору Trp добавляли свежерастворенный в DMF пирен-йодацетамид (Invitrogen), пробирку оборачивали фольгой и оставляли при постоянном перемешивании на ночь при комнатной температуре. Для удаления свободной метки пробу центрифугировали и проводили диализ супернатанта против буфера 30 мМ Hepes-NaOH, pH 7,3, содержащего 100 мМ

NaCl (3 смены). Концентрацию меченого белка определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции ϵ при 344 нм, равный $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Общую концентрацию белка измеряли при помощи SDS-электрофореза; для этого на гель наносили в различных количествах Trm известной концентрации, по которому строили калибровку, и пробы Trm, меченого пирен-йодацетамидом. Гели сканировали и обрабатывали при помощи программных пакетов ImageJ 1.45 и Origin 8.0.

Эксперименты по тепловой денатурации пиренил-меченого Trm проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian), оборудованном термоприставкой для поддержания постоянной скорости нагрева. Пробы объемом 0,6 мл содержали меченый белок в концентрации от 1 до 20 μM . Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 340 нм и регистрировали при 485 нм. При проведении эксперимента пробы нагревали от 20°C до 75°C с постоянной скоростью нагрева 1°C/мин.

2.3. Методы исследования функциональных свойств тропомиозина

Исследование взаимодействия Trm с F-актином методом соосаждения

Соосаждение Trm с F-актином – это классический и наиболее часто применяемый метод определения сродства различных видов Trm к актину. Пробы объемом 100 мкл (приготовленные на 30 mM Hepes-NaOH буфере, pH 7,3, 100 mM NaCl) содержали 10 мкМ F-актин, стабилизированный фаллоидином (15 мкМ), и Trm в концентрации от 0,25 до 6 мкМ. Пробы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали 40 мин на Airfuge TL100A (Beckman) при 100000g. Осадок растворяли в 100 мкл исходного буфера, затем к супернатанту и к осадку добавляли равный объем буфера для образцов (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 8% SDS, 40% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 5% β -МЭ) и нагревали 5 мин при 98°C. Пробы анализировали при помощи SDS-электрофореза. Для определения количества белка в осадках и супернатантах гели сканировали и обрабатывали при помощи программных пакетов ImageJ 1.45 и Origin 8.0.

Определение температурных зависимостей диссоциации комплексов Trm с F-актином по изменениям светорассеяния.

Температурные зависимости диссоциации комплексов Trm с F-актином регистрировали по изменению светорассеяния при 350 нм под углом в 90° [129, 169] на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian), оборудованном специальным термоблоком, позволяющим поддерживать постоянную скорость нагрева при постоянной регистрации температуры. Метод основан на том, что комплекс Trm с F-актином имеет большее

светорассеяние, чем свободный F-актин, в то время как свободный Трпм вовсе не рассеивает свет в выбранных условиях. Таким образом, по уменьшению светорассеяния можно судить о диссоциации Трпм с поверхности актинового филамента, а температура, при которой происходит этот процесс, может в свою очередь служить мерой прочности связывания Трпм с актином (другими словами – относительной мерой стабильности комплексов Трпм с F-актином). Нагрев проводили с постоянной скоростью 1°C/мин в температурном диапазоне от 20°C до 75°C. В качестве основного параметра, выявляемого при таких измерениях, использовали T_{diss} , т.е. ту температуру, при которой интенсивность светорассеяния снижалась на 50%.

Определение АТФазной активности S1 в присутствии реконструированных тонких филаментов.

Применение этого метода основано на том, что актин-активируемая АТФазная активность миозина (в данном случае – изолированной головки миозина, называемой субфрагментом 1 миозина, S1) в присутствии реконструированных (регулируемых) тонких филаментов (т.е. актиновых филаментов, содержащих Трпм и тропонин) зависит от концентрации свободного Ca^{2+} . В этих экспериментах интерес представляют два главных параметра – максимальная скорость АТФазной реакции при высоких концентрациях Ca^{2+} ($p\text{Ca} \leq 5$) и Ca^{2+} -чувствительность реакции (т.е. зависимость ее скорости от концентрации Ca^{2+}).

Для эксперимента готовили ряд 10 мМ (10-кратных) Ca^{2+} /EGTA буферов со значениями $p\text{Ca}$ от 4,5 до 8,0. Концентрацию исходного раствора CaCl_2 определяли с помощью колориметрического метода, основанного на образовании окрашенного комплекса Ca^{2+} с комплексом арсеназо III. Для построения калибровочного графика использовали стандартный раствор нитрата кальция фирмы Merck. Отношения Ca^{2+} и EGTA, необходимые для приготовления буферов с точными значениями $p\text{Ca}$, рассчитывали с помощью программы MaxChelator (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) с поправками на ионную силу раствора и температуру.

Эксперименты проводили в пробках объемом 500 мкл, содержащих 5 мкМ актин, 2 мкМ тропонин, 2 мкМ Трпм и 2 мкМ S1, в буфере 10 мМ Hepes-NaOH, pH 7,3, содержащем 50 мМ NaCl, 0,1 мМ DTT и 0,1 мМ PMSF; помимо этого, все пробы содержали 1 мМ Ca^{2+} /EGTA буфер с заданным значением $p\text{Ca}$. Пробы инкубировали 10 мин при 25°C, после чего добавляли АТФ до конечной концентрации 2 мМ, быстро перемешивали, и проводили АТФазную реакцию в течение 15 мин при 25°C. Затем к пробам добавляли 0,5

мл 5% HClO_4 для остановки реакции и проводили измерение накопленного в ходе эксперимента неорганического фосфата [170]. Для этого из полученной смеси отбирали 300 мкл и добавляли к ним 470 мкл «голубого буфера» (5,4 М Na-ацетатный буфер, pH 4,0, содержащий 0,5% CuSO_4) и 380 мкл свежеприготовленного раствора, содержащего 2,5% молибдат аммония, 2,5% Na_2SO_3 и 0,1% метол. Пробы перемешивали и инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре. Развивающуюся синюю окраску регистрировали при 860 нм на спектрофотометре Cary 100 (Varian). В ходе реакции количество гидролизованной АТФ не превышало 10% от исходно добавленной, что соответствует линейной зависимости скорости этой ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Измерение вязкости растворов Трт.

При помощи этого метода мы оценивали силу взаимодействий между N- и C-концами молекул Трт у разных препаратов Трт. Этот метод является широко распространенным в мировой практике и хорошо известно, что повышение вязкости растворов Трт связано с усилением таких взаимодействий между его молекулами.

Измерения проводили в капилляре объемом 1,5 мл при 25°C на вискозиметре Anton Paar AMVn. Для исследуемых растворов Трт предварительно измеряли их плотность на приборе Anton Paar DMA 4500, которая затем использовалась для точного определения вязкости. Все измерения проводили при концентрации Трт 0,5 мг/мл в буфере 30 мМ Hepes-NaOH, pH 7,3, содержащем 30 мМ NaCl. Измерения вязкости каждого препарата проводили три раза и полученные значения усредняли.

Эксперименты в искусственной подвижной системе (ИПС, in vitro motility assay).

В основе этого метода лежит измерение скорости перемещения (скольжения) флуоресцентно-меченых актиновых филаментов или реконструированных тонких филаментов (филаментов, состоящих из актина, Трт и тропонина) по поверхности с миозином, иммобилизованным на поверхности проточной ячейки. В присутствии АТФ филаменты двигаются (скользят) по поверхности, покрытой миозином. Эксперименты, проводимые этим методом с использованием полученных нами мутантных форм Трт, были выполнены в руководимой д.б.н. С.Ю. Бершицким лаборатории биологической подвижности Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) совместно с сотрудниками лаборатории к.б.н. Г.В. Копыловой и к.б.н. Д.В. Щепкиным, с которыми у нас налажено успешное взаимодействие. Важно отметить, что это единственная в России лаборатория, в которой налажен и успешно используется этот

эффективный метод исследования взаимодействия миозина с актином в условиях, приближенных к физиологическим.

В работе использовались три модификации этого метода. В первой из них исследовали зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации свободного кальция в проточной ячейке. В другой модификации скорость скольжения тонких филаментов исследовали в зависимости не от концентрации кальция, а от концентрации миозина, добавленного в ячейку, при высокой концентрации кальция Ca^{2+} (при $p\text{Ca}$ 4). Это делалось для того, чтобы оценить кооперативность взаимодействия между миозином и тонким филаментом. И, наконец, в третьей модификации оценивалась сила, развиваемая миозиновыми головками в проточной камере при добавлении актин-связывающих белков, препятствующих движению. В нашей работе это был миозин, модифицированный N-этилмалеимидом (NEM-миозин), который сохраняет способность взаимодействовать с актином, но при этом полностью утрачивает способность перемещать актиновые филаменты. Силу, развиваемую миозином, оценивали по тому процентному содержанию NEM-миозина в смеси с немодифицированным миозином, при котором движение тонких филаментов в ИПС полностью останавливалось. Использование этого подхода описано в статье [171].

Регистрация скорости перемещения тонких филаментов осуществлялась с помощью инверсионного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 200 M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Более подробно методика проведения подобных экспериментов описана в статьях сотрудников этой лаборатории [172–174]. При анализе полученных данных для каждой концентрации кальция в каждом эксперименте анализировалась скорость перемещения 50–150 филаментов. Зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации кальция анализировали с помощью уравнения Хилла:

$$V = V_{\max}(1 + 10^{n(p\text{Ca} - p\text{Ca}_{50})})^{-1},$$

где V и $V_{\max}$ — скорость и максимальная скорость скольжения тонких филаментов при насыщающей концентрации кальция, соответственно; $p\text{Ca}_{50}$ (кальциевая чувствительность) — значение $p\text{Ca}$, при котором достигается полумаксимальная скорость скольжения филаментов; n — коэффициент кооперативности Хилла.

Зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации миозина в ячейке оценивали по формуле:

$$V = V_{\max} \times c^n \times (c_{50}^n + c^n)^{-1}$$

где V и $V_{\max}$ – скорость и максимальная скорость скольжения тонких филаментов, C – концентрация миозина в ячейке; C_{50} – концентрация миозина, при которой достигается полумаксимальная скорость скольжения филаментов; n – коэффициент кооперативности Хилла.

Для каждого препарата Trpm эксперименты проводили как минимум трижды.

Измерения, выполненные в оптической ловушке.

В оптической ловушке проводились эксперименты по измерению изгибной жесткости регулируемого тонкого филамента. Эти эксперименты выполнялись в той же лаборатории биологической подвижности Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) совместно с сотрудником лаборатории С.Р. Набиевым.

Измерение изгибной жесткости основано на том, что исследуемый реконструированный и регулируемый тонкий филамент, образованный фибриллярным актином, Trpm и тропонином, растягивают между двумя микросферами, удерживаемыми лучами оптической ловушки [175]. В процессе пошагового растяжения путем смещения луча, удерживающего один из шариков, измеряют силу растяжения (по сигналу рассогласования положения центра шарика и положения неподвижного луча) и расстояние между центрами шариков (с помощью количественного анализа микрофотографий). Затем полученные данные обрабатывают с использованием специального программного комплекса, основанного на математической модели, описывающей изгиб филамента и поворот шариков при таких испытаниях, в результате чего рассчитывается изгибная жесткость филамента [175].

2.4. Другие аналитические методы

Определение концентрации белков спектрофотометрическим методом

Оптическую плотность полученных препаратов Trpm измеряли на спектрофотометре Cary 100 (Varian). При расчете концентрации пользовались законом Бугера-Ламберта-Бэра, принимая коэффициент экстинкции при 280 нм равным $0,273 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (UniProt P09493). Для препарата Trpm 2.2 R133W использовали расчетный коэффициент, равный $0,439 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Концентрацию других белков также измеряли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты: $0,63 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для актина (коэффициент приведен для 290 нм) и $0,75 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для субфрагмента миозина (S1).

SDS-гель электрофорез

Для анализа белкового состава образцов использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS, описанный Лэммли [176]. При работе в качестве разделяющих использовали 15% полиакриламидные гели. Инициацию полимеризации начинали добавлением TEMED и ПСА. При приготовлении проб к раствору белка добавляли 1/4 объема 4-х кратного буфера для образцов (0,25 М Tris-HCl, pH 6,8, 8% SDS, 40% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 5% β -МЭ), а затем инкубировали в течение 5–10 мин при 98°C. Электрофорез проводили при напряжении электрического поля 200 V до выхода лидирующего красителя из геля. В качестве катодного буфера использовали 0,192 М глицин-Tris, pH 8,6, 0,1% SDS, а в качестве анодного – 0,25 М Tris-HCl, pH 8,6. После окончания электрофореза гели помещали в раствор уксусной кислоты (5–15%) и инкубировали в течение 5–10 мин для фиксации белков в геле. После этого гели окрашивали раствором Кумасси G-250 (0,3% Кумасси на 40% изопропанол и 10% уксусной кислоте) при перемешивании на шейкере в течение 15–20 мин, а затем избыток красителя отмывали в кипящей дистиллированной воде.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Исследования центральной части молекулы Трм.

Все исследования, связанные с установлением роли центральной части молекулы Трм, проводились на изоформе Трм 1.1. Мы посчитали это возможным, приняв во внимание два важных факта. Во-первых, Трм 1.1 – это самая распространенная изоформа в скелетной мускулатуре и практически единственная изоформа Трм сердечной ткани, что делает ее выбор обоснованным с точки зрения основного объекта исследования. Во-вторых, это высокая консервативность центральной части Трм, как среди изоформ человека, так и среди позвоночных животных (рис. 17), что позволяет нам, в свою очередь экстраполировать полученные данные на другие изоформы Трм.

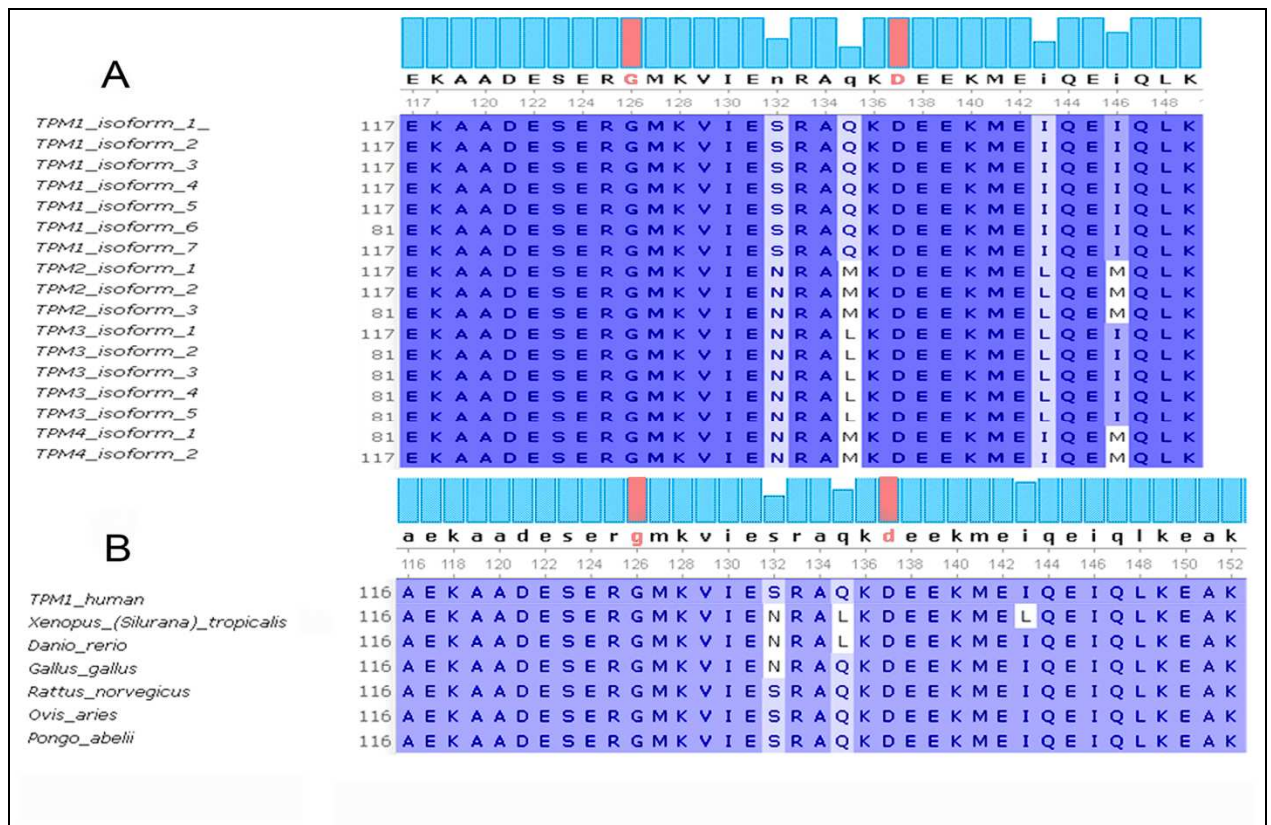


Рис. 16. Результаты выравнивания последовательностей различных изоформ Трм человека (А) и позвоночных животных – от *Danio Rerio* до человеческого (В). Синим цветом на рисунке выделены консервативные остатки (чем интенсивнее цвет, тем чаще встречается аминокислота в этом положении в используемых последовательностях). Сверху под каждым выравниванием столбиками указана доля встречаемости аминокислоты в этом положении в используемых последовательностях. Красным цветом выделены консервативные неканонические остатки G126 и D137. Множественное выравнивание проводили в программе Ugene с использованием протокола clustalw.

Структурные исследования.

В первой серии экспериментов мы использовали вместо Трм дикого типа (Трм WT) Трм с заменой С190А, в котором единственный остаток цистеина (Cys190) был заменен на остаток аланина. Это было необходимо для того, чтобы в дальнейшем использовать Трм С190А как модельный объект для изучения эффектов, вызываемых аминокислотными заменами в центральной части Трм. Целесообразность такого использования Трм С190А обусловлена тем, что процедура восстановления SH-группы единственного остатка цистеина в скелетномышечном Трм WT (Cys190), необходимая для проведения калориметрических экспериментов, занимает у экспериментатора довольно много времени (требуется предварительный прогрев образца в присутствии β -МЭ, занимающий около 2 часов) и в ряде случаев даже препятствует проведению некоторых экспериментов.

Хотелось бы также немного остановиться на том, почему была выбрана именно замена цистеина на аланин, хотя наиболее логичной кажется использование серина. Дело в том, что исследование Трм с заменой цистеина на серин уже проводилось раньше методом ДСК и было показано, что Трм с такой заменой не в полной мере соответствует структуре Трм WT [129]. Кроме того, S. Lehrer с сотрудниками весьма успешно использовали ранее Трм с заменой С190А в своих экспериментах [102]. Тем не менее, мы решили сравнить свойства двух этих препаратов (Трм С190А и Трм WT) методами ограниченного протеолиза Трм трипсином и ДСК, чтобы убедиться в том, что замена С190А не слишком сильно влияет на свойства молекулы Трм.

В экспериментах по ограниченному протеолизу трипсином было показано, что Трм С190А является чуть более устойчивым к протеолитическому расщеплению, чем Трм WT, однако эти различия не слишком существенны (рис. 17). По-видимому, вносимая замена несколько стабилизирует структуру α -спиралей, что делает Трм С190А устойчивее к воздействию трипсина по сравнению с Трм WT.

В экспериментах, проведенных методом ДСК (рис. 18, 19, таблица 3), было показано, что замена С190А в молекуле Трм вызывает небольшое смещение менее термостабильного теплового перехода на $1,5^{\circ}\text{C}$ в сторону более низкой температуры. Поскольку ранее было установлено, что этот переход соответствует плавлению С-концевой части молекулы Трм [129], то из этих данных можно заключить, что замена С190А несколько снижает термостабильность этой части молекулы.

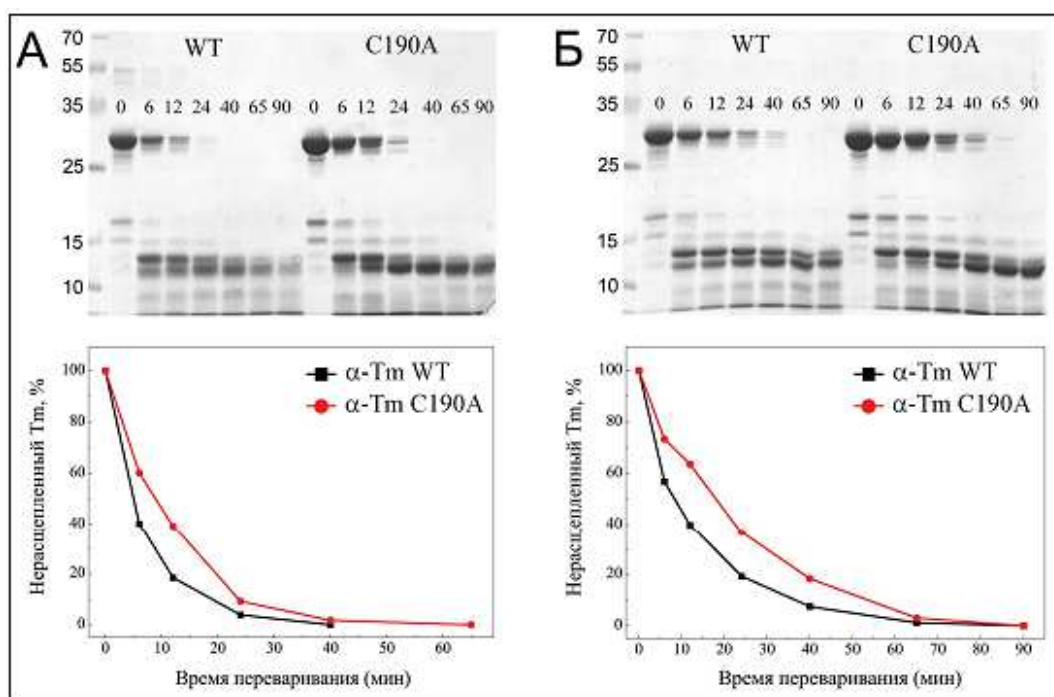


Рис. 17. Ограниченный трипсинолиз препаратов Трпм C190A и Трпм WT при двух весовых соотношениях трипсина к тропомиозину – 1:300 (А) и 1:600 (Б). На рисунке приведены электрофореграммы (сверху), где слева обозначены маркеры (в кДа), а цифры соответствуют минутам, при которых отбиралась проба на SDS-электрофорез. Снизу представлена кинетика протеолитического расщепления Трпм трипсином в условиях реакции, протекающей при 30 °С.

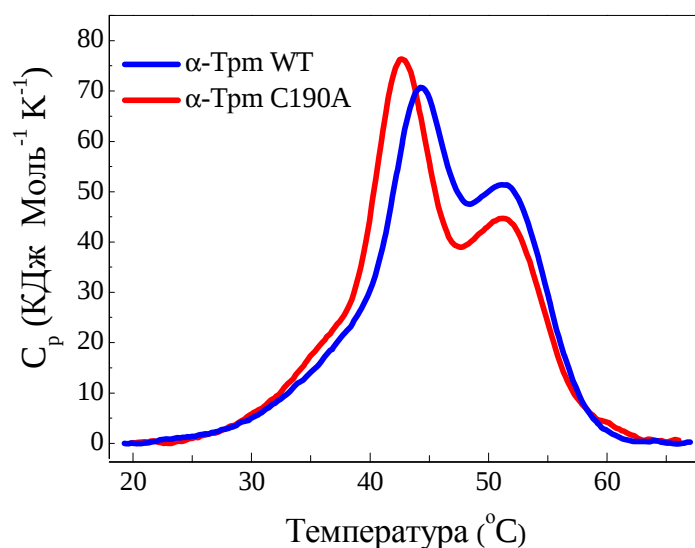


Рис. 18. Термограммы ДСК для препарата Трпм WT с восстановленными SH-группами остатков Cys190 (синяя кривая) и препарата с аминокислотной заменой C190A (красная кривая). Эксперименты проводили при концентрации Трпм 2 мг/мл и постоянной скорости нагрева 1 К/мин.

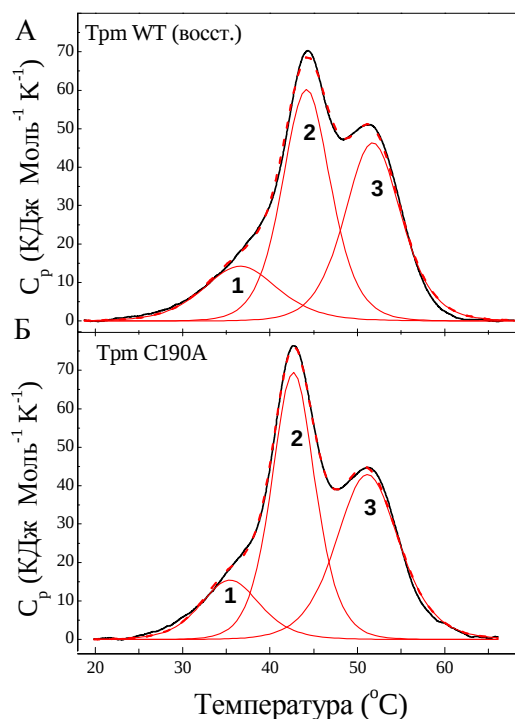


Рис. 19. Разложение кривых теплопоглощения, полученных методом ДСК для препаратов Трpm WT с восстановленными SH-группами остатков Cys190 (А) и Трpm с заменой С190А (Б) на отдельные калориметрические домены. Цифрами на рисунке обозначены калориметрические домены, полученные при разложении (слева направо). Домен 2 соответствует С-концевой части молекулы Трpm, домен 3 – N-концевой части молекулы, а домен 1 ранее описан не был.

Таблица 3. Калориметрические параметры отдельных доменов для препаратов Трpm WT и Трpm C190А (см. рис. 19). T_m – температура максимума теплового перехода; ΔH_{cal} – калориметрическая энтальпия.

Препарат	Домен	$T_m(^{\circ}\text{C})$	ΔH_{cal} (Кдж/моль)
Трpm WT	1	36,7	160
	2	44,2	440
	3	51,8	400
Трpm C190А	1	35,5	140
	2	42,7	450
	3	51,2	410

На первый взгляд, данные ДСК (рис. 18, 19, таблица 3) противоречат данным протеолитического расщепления (рис. 17), однако это не совсем так. Дело в том, что остаток аланина обладает хорошей спиралеобразующей способностью, и, следовательно, стабилизирует α -спирали тропомиозина, но дестабилизирует при этом структуру СС (из-за недостаточно объемного гидрофобного радикала), т.е. выполняет «двоякую» функцию. Таким образом, участок для трипсинолиза (Arg133) может быть менее доступен ферменту, но структура СС становится в то же время менее стабильной. На первый взгляд, снижение температуры максимума одного из тепловых переходов на $1,5^{\circ}\text{C}$ – это довольно

существенные изменения для столь точного метода, как ДСК. Стоит, однако, посмотреть на значения энтальпии калориметрических доменов (рис. 19, таблица 3). Хорошо видно, что они практически не изменяются в результате замены C190A, что свидетельствует о сходном характере тепловой денатурации. Также практически не изменяется суммарная энтальпия денатурации; это свидетельствует о том, что в структуру молекулы не привносится дополнительное конформационное напряжение. Из всего этого можно заключить, что разница в характере тепловой денатурации между молекулами Trm C190A и Trm WT весьма незначительна.

Итак, оценивая в совокупности данные, полученные различными методами, можно сделать вывод о том, что Trm с заменой C190A вполне может использоваться как модельный объект для изучения замен в центральной части молекулы Trm.

Успешное решение описанной выше задачи позволило перейти к главной части работы, а именно – к сравнительному структурному анализу препаратов Trm с аминокислотными заменами в центральной части молекулы: Trm C190A/G126R, Trm C190A/D137L и Trm C190A/G126R/D137L. При сравнении свойств этих препаратов со свойствами Trm C190A и оценке влияния этих замен на структуру молекулы Trm использовались те же подходы, что и при сравнении Trm C190A и Trm WT. Описание и обсуждение полученных результатов хотелось бы начать с метода ограниченного протеолиза.

Как видно из данных, приведенных на рис. 20, все препараты Trm с заменами в центральной части молекулы оказались намного устойчивее к протеолитическому расщеплению трипсином, чем Trm C190A, что свидетельствует о значительной стабилизации этой части молекулы. Кроме того, из этого рисунка хорошо видно, что наиболее стабильной является молекула Trm, несущая одновременно сразу две замены в центральной части (препарат Trm G126R/D137L/C190A). Помимо того, что она дольше всего остается нерасщепленной, меняется еще и характер ее протеолитического расщепления. Так, происходит исчезновение протеолитических фрагментов, соответствующих протеолиту в центральной части молекулы, что хорошо видно из электрофореграммы, приведенной на рис. 20 (препарат G126R/D137L/C190A). Приведенные результаты протеолитического расщепления препаратов с аминокислотными заменами G126R и D137L однозначно указывают на значительную стабилизацию центральной части молекулы Trm этими заменами.

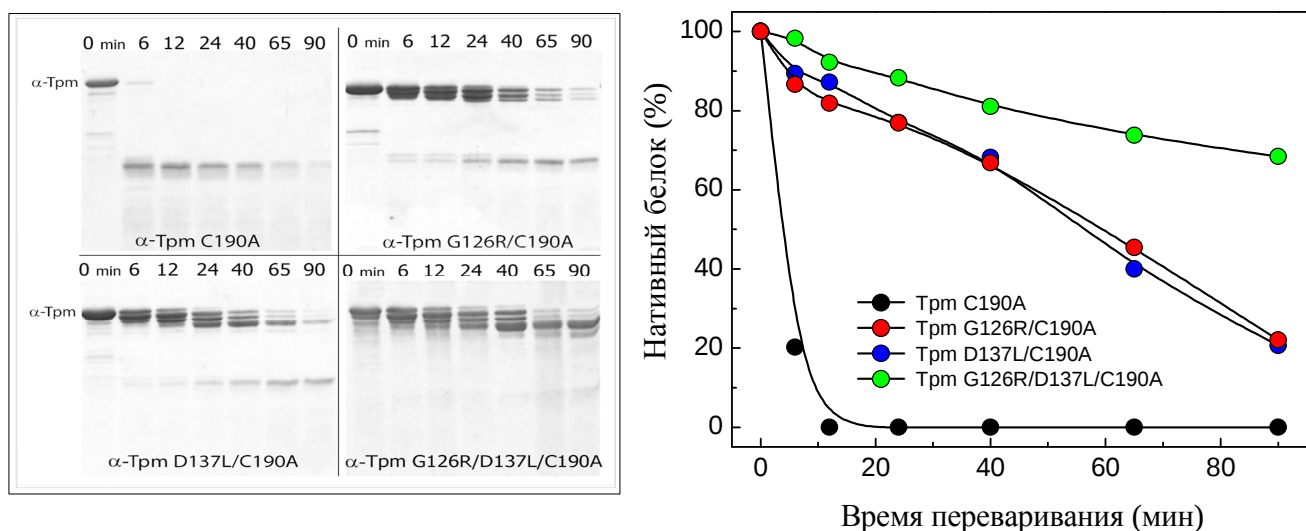


Рис. 20. Ограниченный протеолиз трипсином препаратов Трпм с аминокислотными заменами в центральной части молекулы: G126R (красная кривая), D137L (синяя кривая) и G126R/D137L (зеленая кривая). Черная кривая – контрольный препарат Трпм С190А. Эксперименты проводили при 30°C при весовом соотношении трипсина к Трпм, равном 1:150. На электрофореграмме (слева) цифры соответствуют минутам, при которых отбирались пробы для анализа методом SDS-электрофореза. Справа представлена кинетика протеолитического расщепления Трпм трипсином.

Более подробная информация о структурных изменениях в молекуле Трпм, вызываемых заменами G126R и D137L в ее центральной части, была получена при исследованиях тепловой денатурации Трпм методом ДСК. Эти замены заметно сказываются на характере тепловой денатурации молекулы, что свидетельствует об изменении ее стабильности. Хорошо видно, что все препараты Трпм с заменами в центральной части молекулы становятся стабильнее по сравнению с исходным препаратом Трпм С190А. Это отражается в смещении их калориметрических пиков в сторону более высокой температуры (рис. 21). Помимо этого, из данных ДСК видно, что эти препараты Трпм сильно отличаются друг от друга по характеру тепловой денатурации (рис. 21). Так, у Трпм с заменой G126R на кривой теплопоглощения появляется основной пик и два минорных, в то время как у Трпм с заменой D137L отчетливо видны два пика. Что касается препарата Трпм С190А/G126R/D137L, в котором обе замены в центральной части молекулы присутствуют одновременно, то в этом случае на кривой теплопоглощения наблюдались три отчетливых пика, причем температура максимума самого высокотемпературного из них достигала 64°C, что ранее никогда не наблюдалось при исследованиях тепловой денатурации разных препаратов Трпм методом ДСК. Для получения более подробной информации необходимо было провести деконволюцию кривых теплопоглощения на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), которая применима только для обратимо денатурирующих белков.

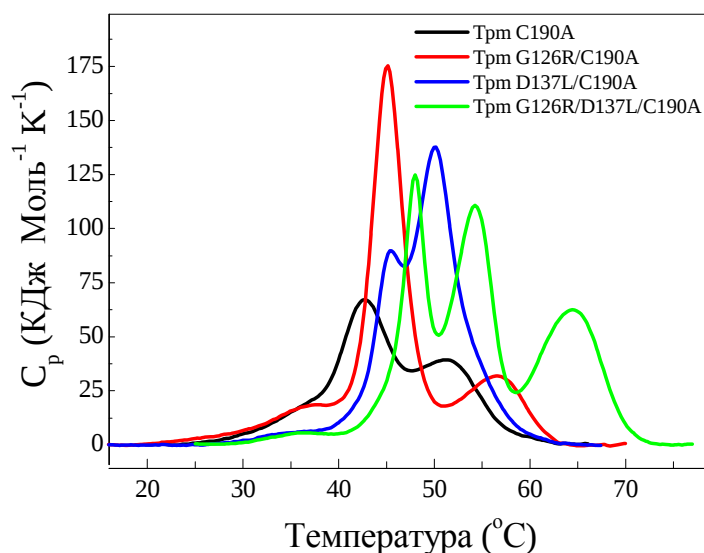


Рис. 21. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения, полученные методом ДСК для препаратов Трм С190А (черная кривая), Трм С190А/Г126R (красная кривая), Трм С190А/Д137L (синяя кривая) и Трм С190А/Г126R/Д137L (зеленая кривая).

Тепловая денатурация препаратов Трм С190А, Трм С190А/Г126R и Трм С190А/Д137L являлась полностью обратимой (т.е. кривые ДСК, полученные при первом и втором прогревах образцов, были полностью идентичны), в то время как для препарата Трм С190А/Г126R/Д137L наблюдалась неполная обратимость. Это выразалось в том, что при втором прогреве на термограмме этого белка исчезал острый пик с максимумом при ~48°C (рис. 21). При этом два других калориметрических пика (с максимумами при 54°C и 64°C) полностью воспроизводились при повторном прогреве. Заметим, однако, что при последующих (3-м и 4-м) прогревах препарата Трм С190А/Г126R/Д137L наблюдалось практически полное воспроизведение кривой ДСК, полученной при 2-м прогреве, т.е. полная обратимость тепловой денатурации. Таким образом, необратимыми являлись лишь изменения, происходящие после первого прогрева образца. Стоит отметить, что данное явление никогда ранее не наблюдалось для препаратов Трм. Мы предположили, что при одновременном внесении двух аминокислотных замен (G126R и D137L) в структуре Трм может возникать дополнительное конформационное напряжение, вследствие которого участок в центральной части молекулы Трм не может полностью ренатурировать после первого прогрева образца. Мы также предположили, что подобные изменения могут затрагивать вторичную структуру белка, поэтому решили воспользоваться методом КД. Как видно из рис. 22, спектры КД для всех исследованных препаратов (в том числе – и для препарата Трм С190А/Г126R/Д137L), полученные после прогрева образцов до 75°C и последующего охлаждения до 5°C, очень похожи на исходные спектры, полученные до прогрева. Видно, конечно, что после прогрева содержание α -спиралей в препаратах Трм

немного падает, но это, возможно, связано с тем, что ренатурация – это равновесный процесс, который не может проходить на 100%. Неизменной, однако, остается форма спектров, что свидетельствует в пользу того, что не изменяется вторичная структура молекулы Трм.

Важно отметить, что спектр КД восстанавливался после прогрева даже в случае препарата Трм C190A/G126R/D137L (рис. 22 В). Это значит, что исчезновение острого пика при 48°C на кривых ДСК, полученных при повторном прогреве этого препарата, не связано с изменением общего содержания α -спиралей в белке, т.е. изменения затрагивают, по всей видимости, только третичную структуру СС, т.е. характер взаимодействия двух α -спиралей.

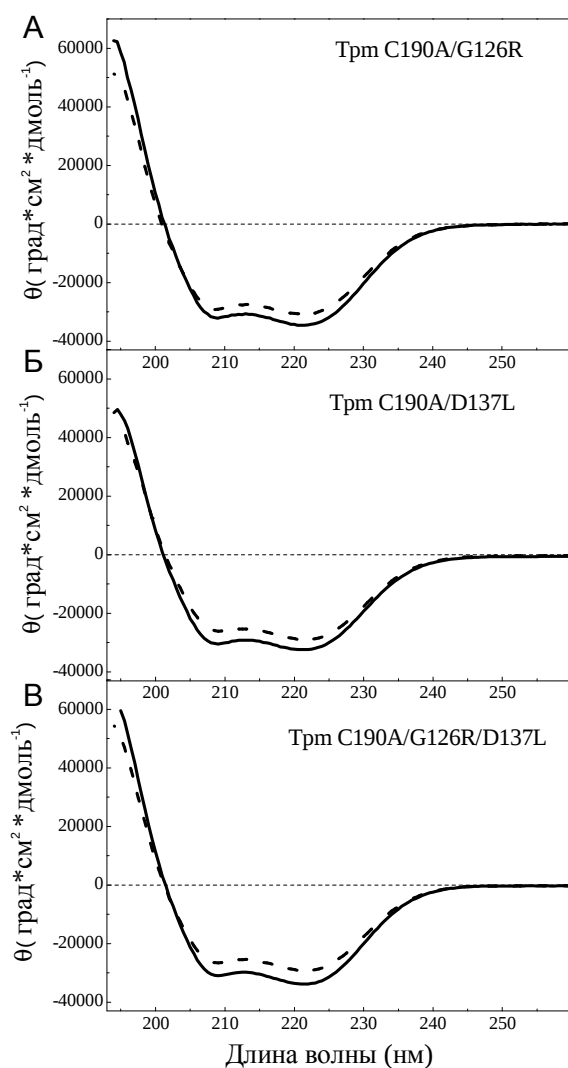


Рис. 22. Спектры КД препаратов Трм C190А с аминокислотными заменами в центральной части молекулы – G126R (А), D137L (Б) и G126R/D137L (В), полученные при 5°C до (сплошные кривые) и после (пунктир) прогрева образцов до 75°C со скоростью 1°C/мин. Концентрация белка для всех препаратов Трм составляла 2 мг/мл.

В результате проведенного анализа обратимости тепловой денатурации становится очевидным, что применение метода компьютерной деконволюции кривых теплопоглощения на отдельные калориметрические домены возможно практически для всех исследуемых препаратов Трм. Спорным является лишь вопрос о применении данного метода к препарату Трм C190A/G126R/D137L, точнее к результатам его первого прогрева. Тем не менее, мы применили деконволюцию во всех случаях, несмотря на то что в случае 1-го прогрева препарата Трм C190A/G126R/D137L это может быть не совсем корректно. Результаты подобного разложения представлены на рис. 23 и 24 и в таблице 4.

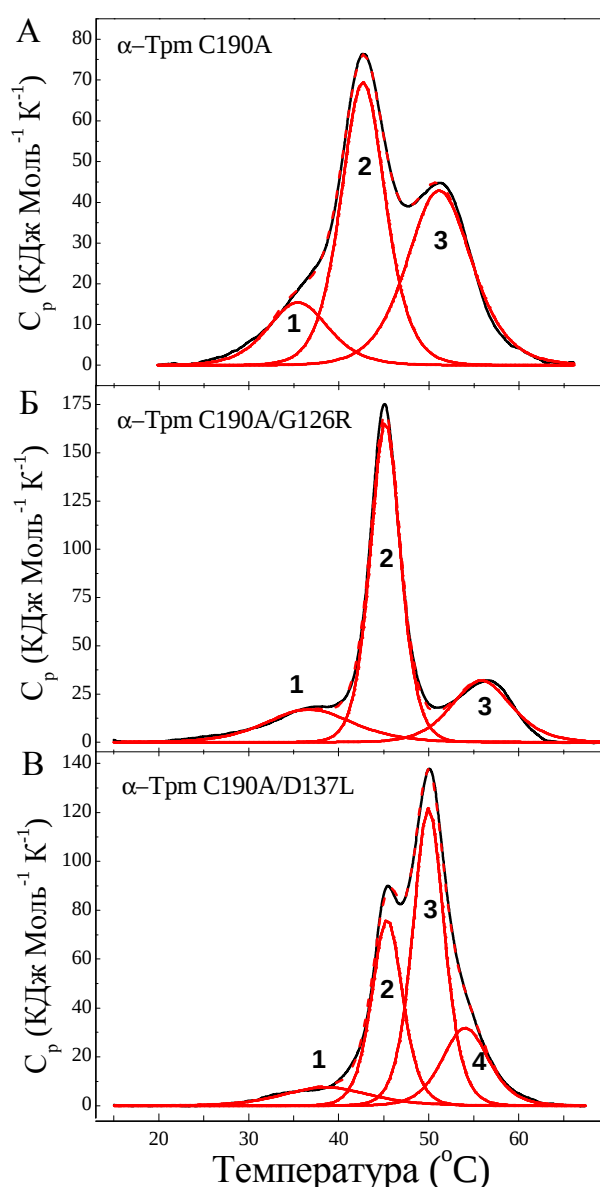


Рис. 23. Деконволюция кривых избыточного теплопоглощения для препаратов Трм с заменами C190A (А), C190A/G126R (Б) и C190A/D137L (В). Цифрами обозначены калориметрические домены, полученные при разложении (в порядке слева направо, по мере повышения температуры).

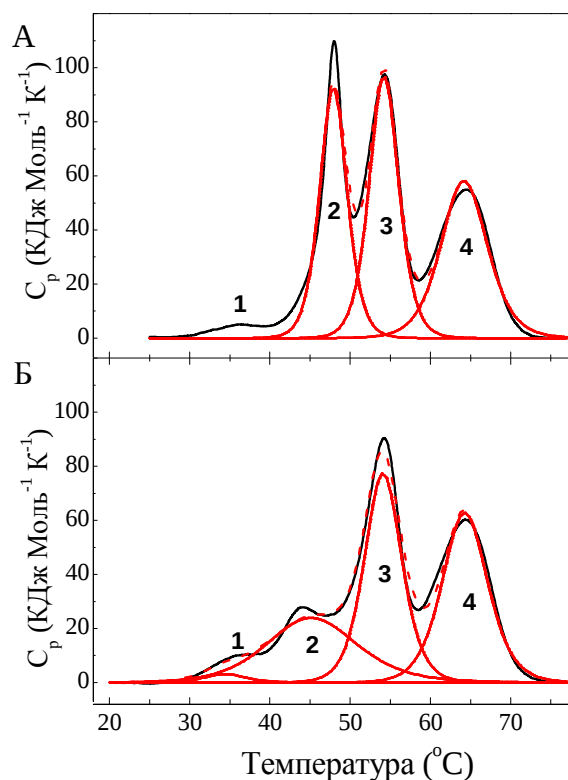


Рис. 24. Деконволюция кривых избыточного теплопоглощения для препарата Трп с заменами С190А/Г126R/Д137L, полученных при первом (А) и втором (Б) прогревах образца. Цифрами обозначены калориметрические домены, полученные при разложении (в порядке слева направо, по мере повышения температуры).

Как видно из представленных данных, результаты деконволюции для препарата Трп С190А/Г126R (рис. 23Б) хорошо согласуются с опубликованными ранее данными, полученными для Трп с заменой Г126R [103]. Хорошо видно, что происходит увеличение энтальпии домена 2, а энтальпия домена 3 существенно снижается (см. таблицу 4). Ранее в молекуле Трп выделяли наиболее термостабильный N-концевой домен (домен 3 для препарата Трп С190А на рис. 23А) и менее термостабильный С-концевой домен (домен 2 для Трп С190А на рис. 23А), которые были идентифицированы для молекулы Трп WT [129]. Поскольку в случае препарата Трп с заменой Г126R количество калориметрических доменов не увеличивается и по характеру тепловой денатурации он наиболее похож на контрольный препарат Трп С190А (рис. 23А,Б), то можно предположить, что и в этом случае домен 2 соответствует С-концевой части молекулы Трп, а домен 3 – N-концевой части молекулы. Если так, то замена Г126R стабилизирует, по-видимому, не только центральную часть молекулы Трп, но оказывает влияние и на другие участки молекулы. В случае препаратов Трп С190А/Д137L и С190А/Г126R/Д137L результаты не вполне очевидны; т.к. полученные кривые теплопоглощения удается разложить на 4 калориметрических домена (рис. 23В и рис. 25). Появление новых

калориметрических доменов в случае этих препаратов может говорить о том, что в молекуле Трм присутствуют как минимум 3 области, которые денатурируют независимо и кооперативно. Вполне возможно, что одна из них может соответствовать центральной части Трм.

Таблица 4. Калориметрические параметры препаратов Трм с аминокислотными заменами С190А, С190А/Г126R, С190А/Д137L и С190А/Г126R/Д137L.

Замена в препарате Трм	Домен	T _m (°C)	ΔH _{cal} , кДж/моль	ΣΔH _{cal} , кДж/моль
С190А	1	35,5	140	1000
	2	42,7	450	
	3	51,2	410	
С190А/Г126R	1	36,8	220	1245
	2	45,2	740	
	3	55,9	285	
С190А/Д137L	1	38,7	97	1232
	2	45,4	350	
	3	50	565	
	4	54,1	220	
С190А/Г126R/Д137L 1-й прогрев	1	-	-	1335
	2	47,9	420	
	3	54,2	470	
	4	64,2	445	
С190А/Г126R/Д137L 2-й прогрев	1	34,4	18	1318
	2	45,3	355	
	3	54,1	475	
	4	64,3	470	

Особое внимание стоит уделить препарату Трм С190А/Г126R/Д137L, у которого в центральной части молекулы присутствуют две замены одновременно. Такая замена Г126R/Д137L приводит к смещению всех тепловых переходов в сторону более высоких температур, что говорит о стабилизации всей молекулы Трм. Более того, для этого препарата наблюдается появление нового высокотемпературного пика (домен 4 на рис. 24) с максимумом при 64,2–64,3 °С (таблица 4), которого ранее никогда не наблюдалось при исследованиях тепловой денатурации препаратов Трм методом ДСК.

Если провести сравнение результатов 1-го и 2-го прогревов препарата Trp C190A/G126R/D137L (рис. 24), то хорошо видно, что домен 2 после первого прогрева не исчезает полностью; более того, энтальпия этого домена остается вполне сопоставимой с энтальпией, рассчитанной при первом прогреве образца (таблица 4). Резко изменяется лишь кооперативность плавления этого домена: на рис. 24Б хорошо видно, что его тепловой переход становится более «растянутым» в широком температурном диапазоне (от 30°C до 60°C), что определенно говорит об изменениях в структуре этого домена, но не о его исчезновении. Возможно, это связано с тем, что он не может полностью «свернуться» при ренатурации в силу конформационного напряжения, как это уже обсуждалось выше. Параметры остальных калориметрических доменов остаются при повторном прогреве образца практически неизменными (таблица 4).

Особое внимание хочется также уделить калориметрическому домену 1, который присутствует у всех препаратов Trp (рис. 23, 24; таблица 4). Хорошо заметно, что при внесении аминокислотных замен G126R и D137L в центральную часть молекулы Trp (особенно в случае двойной замены G126R/D137L) происходит значительное уменьшение энтальпии этого домена (таблица 4). Поскольку замены были внесены в центральную часть Trp, то кажется вполне вероятным, что именно этот домен может соответствовать ее плавлению. Кроме того, обращает на себя внимание увеличение суммарной энтальпии для всех исследованных препаратов с аминокислотными заменами в центральной части молекулы Trp (таблица 4). Подобное увеличение энтальпии говорит о том, что при стабилизации структуры Trp этими заменами происходит, по всей видимости, образование новых связей, которые дают дополнительный вклад в суммарную энтальпию плавления всей молекулы.

Итак, основываясь на полученных данных, можно прийти к выводу о том, что все исследованные аминокислотные замены в центральной части Trp приводят к стабилизации молекулы и с большой долей вероятности охватывают не только ее центральную часть. Кроме того, несмотря на одинаковое поведение препаратов Trp с заменами G126R и D137L при протеолитическом расщеплении (рис. 20), они заметно различаются по характеру тепловой денатурации. Чтобы более подробно разобраться в том, что происходит с молекулой Trp при внесении аминокислотных замен G126R, D137L и G126R/D137L в ее центральную часть, было решено провести идентификацию калориметрических доменов для препаратов Trp с этими заменами, т.е. выявить соответствие этих доменов определенным участками молекулы. Для этого были получены мутантные формы Trp, содержащие остаток цистеина в разных частях молекулы: в N-

концевой (Trp с аминокислотными заменами S36C/C190A), в центральной (с заменами S123C/C190A), и в С-концевой части (Trp WT, содержащий остаток Cys190) (рис. 25).

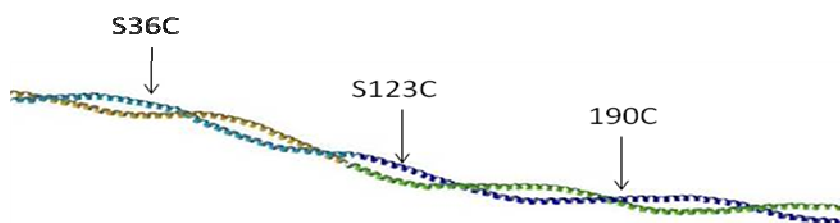


Рис. 25. Молекула Trp с указанием примерного местоположения остатков цистеина, используемых для структурного анализа.

Для каждой серии исследований, соответствующей идентификации N- и С-концевых участков и центральной части Trp, необходимо было получить препараты, в которых бы содержалась только одна SH группа, что позволяло однозначно интерпретировать результаты. В итоге, нам удалось получить целый набор препаратов, который схематично представлен на рис. 26. Таким образом, при идентификации N-концевой части мы использовали препараты с заменами S36C/C190A, S36C/C190A/G126R, S36C/C190A/D137L и S36C/C190A/G126R/D137L; для идентификации С-концевой части – препараты Trp WT (содержащий остаток Cys190) с заменами G126R, D137L и G126R/D137L; для идентификации центральной части Trp – препараты с заменами S123C/C190A, S123C/C190A/G126R, S123C/C190A/D137L и S123C/C190A/G126R/D137L, соответственно.

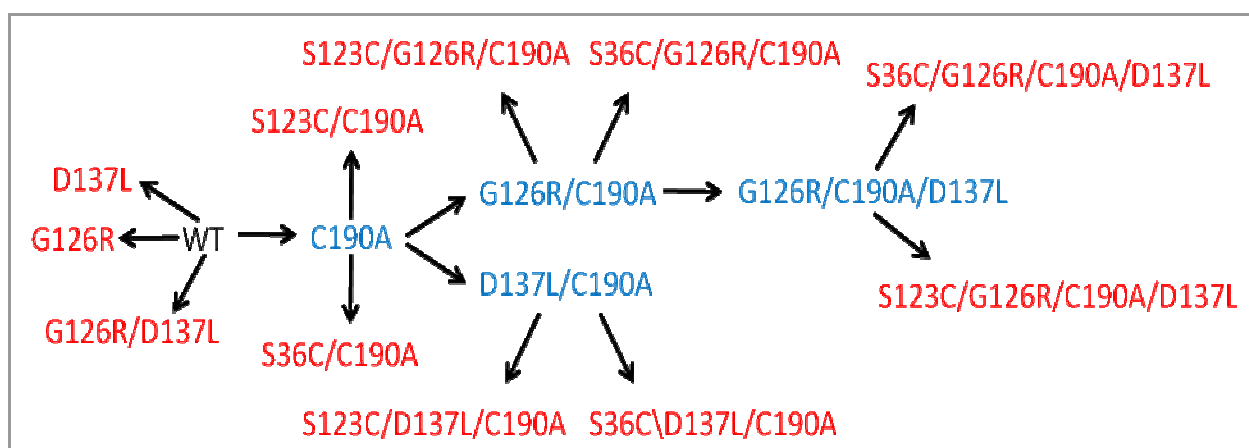


Рис. 26. Полученные и использованные в работе рекомбинантные препараты Trp с точечными заменами аминокислотных остатков. Черным цветом выделен α-Trp дикого типа (WT), синим – белки, для которых проводилась идентификация калориметрических доменов, красным – препараты, полученные специально для идентификации калориметрических доменов Trp.

Все перечисленные препараты Трм использовали для идентификации калориметрических доменов с использованием двух подходов. Один из этих подходов – исследование температурной зависимости тушения эксимерной флуоресценции пиреновой метки, присоединенной к остатку Cys в молекуле Трм, и ее сопоставление с соответствующей кривой ДСК, а другой – образование дисульфидной связи между двумя цепями молекулы Трм, которое приводит к значительной стабилизации той части молекулы, где находится остаток цистеина. На рисунках 27 и 29 приведены примеры применения этих подходов для идентификации калориметрического домена, соответствующего плавлению N-концевой части молекулы Трм, где был локализован остаток Cys36. Тушение флуоресценции эксимеров пирена коррелировало с тепловой денатурацией самого термостабильного калориметрического домена 3 (рис. 27). Следовательно, этот домен соответствует плавлению N-концевой части молекулы Трм, где локализован остаток Cys36.

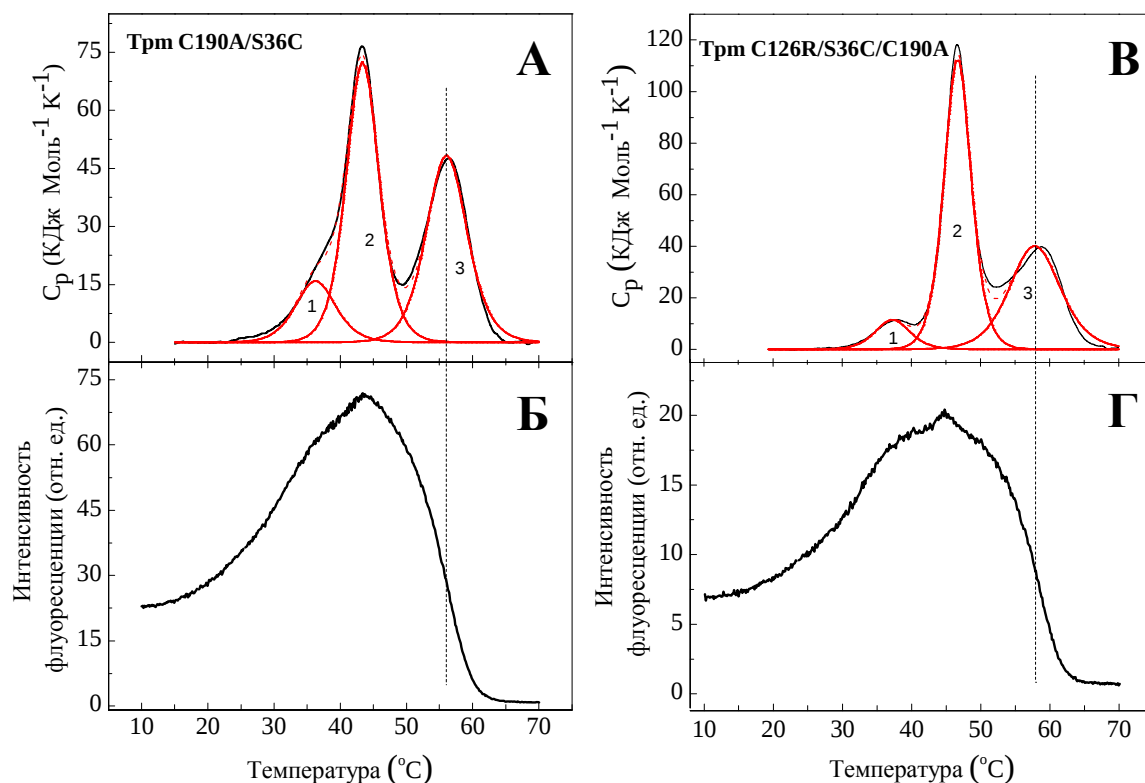


Рис. 27. Сравнение результатов деконволюции кривых избыточного теплопоглощения, полученных методом ДСК (А,В), и температурных зависимостей эксимерной пиреновой флуоресценции (Б, Г) для препаратов Трм S36C/C190A (А, Б) и Трм S36C/G126R/C190A (В, Г). Полупереходы на температурных зависимостях падения интенсивности эксимерной флуоресценции соответствуют максимуму наиболее термостабильного калориметрического домена 3 на кривых ДСК.

Стоит обратить внимание на характер кривых температурных зависимостей эксимерной флуоресценции (рис. 27 Б,Г). При тепловой денатурации молекулы Трм ее полипептидные цепи расходятся друг от друга в участке плавления, что должно

выражаться в падении эксимерной флуоресценции, но перед снижением интенсивности флуоресценции наблюдается ее повышение. Для объяснения этого факта ранее в нашей лаборатории И.А. Невзоровым [177] была предложена гипотеза о том, что изначально эксимерная метка находится в малоупорядоченном состоянии, а при нагревании происходит более эффективное взаимодействие между мономерами пирена, которое приводит к увеличению интенсивности эксимерной флуоресценции (первая стадия на рис. 28). Затем, когда температура достигает необходимого порога для денатурации той части Трм, в которой расположена метка, флуоресценция резко падает из-за расхождения цепей и уменьшения доли эксимера (вторая стадия на рис. 28). Стоит отметить, что наблюдаемые нами изменения эксимерной флуоресценции и предложенная гипотеза хорошо согласуются с моделью двустадийной денатурации Трм, предложенной Y. Ishii и S. Lehrer еще в 1991 году [178].

Параллельно с измерениями температурных зависимостей флуоресценции эксимера пирена проводили также измерения мономерной флуоресценции пирена при 390 нм. Эти измерения были необходимы для того, чтобы оценить влияние температурного тушения флуоресценции. В этих экспериментах флуоресценция мономера падала линейно, что соответствует температурному тушению. В то же время тушение эксимерной флуоресценции носит нелинейный характер (рис. 27 Б,Г), что говорит о том, что она вызвана диссоциацией полипептидных цепей Трм.

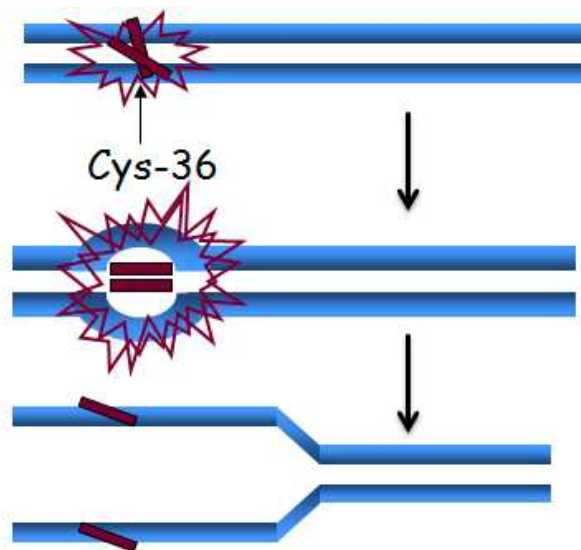


Рис. 28. Схема, иллюстрирующая гипотезу о характере температурной зависимости эксимерной флуоресценции пиренил-меченого Трм. Синим цветом на рисунке обозначены полипептидные цепи Трм, темно-красным – момеры пирена.

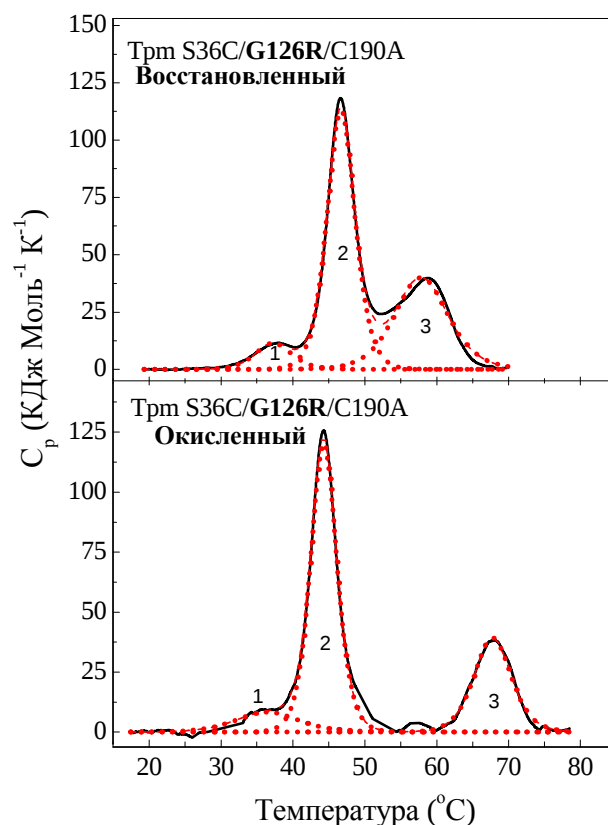


Рис. 29. Деконволюция кривых избыточного теплопоглощения, полученных методом ДСК для препарата Trp S36C/G126R/C190A. Сверху приведены данные для препарата с восстановленными SH-группами остатков Cys36, а снизу – для препарата с дисульфидной связью между этими остатками. Цифрами обозначены номера калориметрических 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.

При использовании другого подхода было показано, что образование дисульфидной связи между остатками Cys36 в двух цепях молекулы Trp резко повышает термостабильность домена 3 (рис. 29), что хорошо согласуется с результатами, полученными методом регистрации тушения эксимерной флуоресценции (рис. 27). Как видно из данных, приведенных на рис. 29, при образовании дисульфидной связи происходит резкое смещение одного из калориметрических пиков в сторону более высокой температуры. Это особенно хорошо заметно при сравнении верхнего (с восстановленными SH-группами) и нижнего (с SH-группами, «сшитыми» дисульфидной связью) плотов на рис. 29. Такое смещение отражает стабилизацию N-концевого домена молекулы Trp, т.к. образование сшивки возможно только в этом районе.

С использованием двух описанных выше подходов нам удалось идентифицировать калориметрические домены, соответствующие N- и C-концевой части молекулы, для всех препаратов Trp со стабилизированной центральной частью. В случае с N-концевой

частью Trm, ей всегда соответствовал наиболее термостабильный домен, С-концевой части Trm соответствовали домен 2 для препаратов C190A, C190A/G126R, C190A/D137L (рис. 23) и домены 2 и 3 для препарата C190A/G126R/D137L (рис. 24). 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-концевой 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.

В тоже время, к сожалению, данные для препаратов Trm, содержащих остаток Cys123 в центральной части молекулы, оказались чрезвычайно сложны для интерпретации из-за множества артефактов, выявленных при измерениях. Вследствие этого нам не удалось выявить отдельного калориметрического домена, соответствующего центральной части Trm. Поэтому мы сделали вывод о том, что она вряд ли существует в виде отдельного калориметрического домена, а денатурирует, скорее всего, вместе с N- или С-концевой частью молекулы – в зависимости от рассматриваемого препарата.

Функциональные исследования

Мы предположили, что столь сильные структурные изменения в молекуле Trm должны оказывать достаточно серьезное влияние на его функциональные свойства.

В первую очередь мы решили оценить влияние стабилизирующих аминокислотных замен на сродство Trm к F-актину, применив для этого метод соосаждения Trm с F-актином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение стабилизирующих замен в центральную часть молекулы Trm не оказывает особого влияния на взаимодействие Trm с актином (рис. 30), и доказывают несостоятельность гипотезы о том, что дестабилизация центральной части Trm является необходимым условием для его связывания с актиновым филаментом. В то же время эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее для препаратов Trm с заменами D137L/C190A [102] и G126R [103].

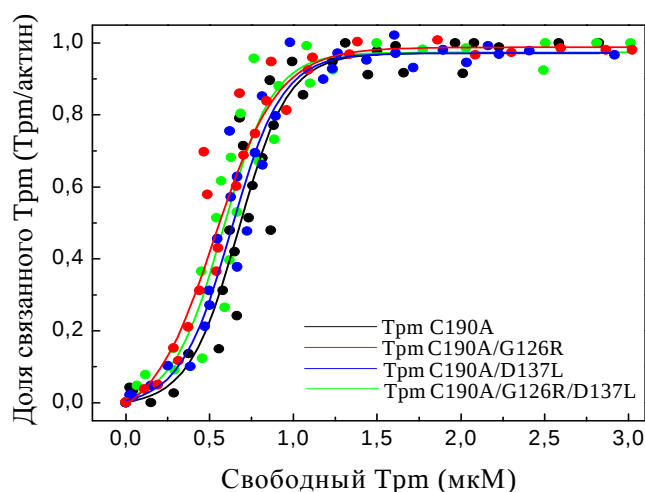


Рис. 30. Связывание различных препаратов Trpm с F-актином в экспериментах по соосаждению. Представлены зависимости степени насыщения актинового филамента молекулами Trpm от концентрации свободного Trpm, остающегося в супернатанте после центрифугирования комплексов Trpm с F-актином. Видно, что стабилизирующие замены G126R, D137L и G126R/D137L не оказывают заметного влияния на взаимодействие Trpm с F-актином.

С другой стороны, стабилизация центральной части молекулы Trpm 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. 31). Как видно из этого рисунка, аминокислотные замены D137L и G126R (и особенно двойная замена D137L/G126R) в центральной части Trpm значительно повышают температуру диссоциации комплексов Trpm с F-актином по сравнению с контрольным Trpm C190A, что свидетельствует об увеличении их прочности.

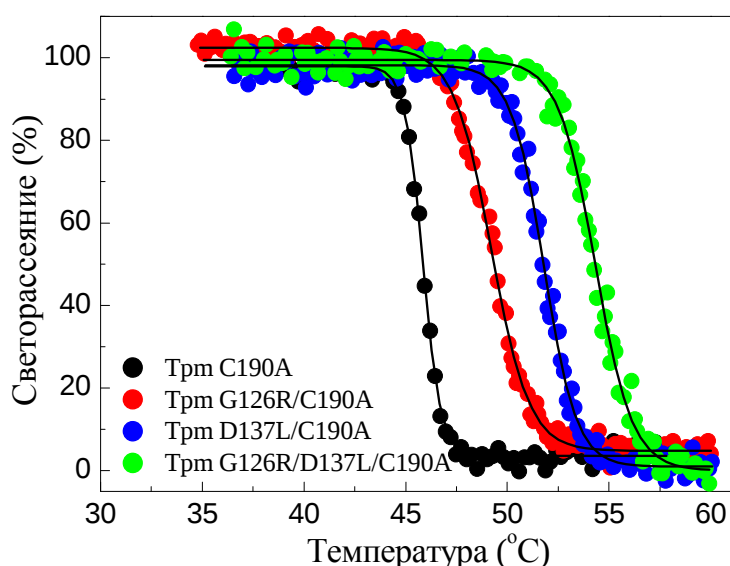


Рис.31. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Trpm с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Черная кривая соответствует контрольному препарату Trpm C190A, зеленая – Trpm G126R, синяя – Trpm D137L и красная – Trpm G126R/D137L. Концентрация F-актина составляла 20 μ М, Trpm – 10 μ М. Скорость прогрева – 1°C/мин.

Подобные результаты могут объясняться несколькими причинами: либо тем, что введение аминокислотных замен в центральную часть Трп приводит к стабилизации всей его молекулы, поэтому более высокие температуры диссоциации Трп с поверхности F-актина могут являться следствием стабилизации структуры самого Трп, либо тем, что молекулы Трп, содержащие стабилизирующие замены, более прочно взаимодействуют с поверхностью актинового филамента. С помощью описанного выше подхода невозможно оценить, какая из этих причин является определяющей; тем не менее, повышение температуры диссоциации комплексов Трп с F-актином указывает на изменение свойств этих комплексов, т.е. на повышение их стабильности. Таким образом, замены в центральной части молекулы Трп не только не ослабляют прочность комплексов, образуемых им с F-актином, но даже усиливают ее.

Более того, подобное увеличение прочности комплексов Трп с F-актином приводит не только к изменению их свойств, но и к увеличению жесткости всего тонкого филамента (т.е. филамента, состоящего из актина, Трп и тропонина), что было установлено при измерениях изгибной жесткости таких филаментов методом оптической ловушки (таблица 5). Как видно из результатов, приведенных в этой таблице, стабилизация центральной части молекулы Трп вследствие замены G126R/D137L приводит к практически двукратному увеличению жесткости тонкого филамента, тем самым значительно изменяя его биофизические свойства

Таблица 5. Изгибная жесткость, измеренная методом оптической ловушки для F-актина и реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и контрольный Трп C190A или Трп 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 ± 0.7	
Тонкий филамент, содержащий Трп и тропонин	+Ca²⁺	-Ca²⁺
Трп C190A (контроль)	5.4 ± 0.6	4.9 ± 0.8
Трп G126R/D137L/C190A	9.3 ± 1.0	8.3 ± 1.3

Стоит также обратить внимание на то, что появление в системе Трп и тропонинового комплекса также заметно сказывается на жесткости актинового филамента, хоть и в меньшей степени, чем стабилизация центральной части Трп (таблица

5). Это хорошо согласуется с полученными ранее результатами и дополнительно подтверждает представления о том, что Трп способен регулировать жесткость актинового филамента [24, 25]. Ценность этих данных еще и в том, что они получены на полностью реконструированном тонком филаменте и указывают на то, что структурные изменения в молекуле Трп могут, по всей видимости, распространяться не только на его структуру, но и на весь тонкий филамент в целом. Вполне возможно, что изменения в структуре Трп могут сопровождаться структурными перестройками в актиновой нити, как это наблюдалось ранее [20].

В последующих экспериментах мы исследовали влияние стабилизации центральной части Трп 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 Трп приводила к значительному увеличению АТФазной активности субфрагмента 1 миозина (S1) в присутствии реконструированных тонких филаментов (рис. 32). Как видно на рис. 32, АТФазная активность S1 при высоких концентрациях Ca^{2+} значительно выше в случае препаратов Трп, содержащих аминокислотные замены в центральной части молекулы, чем в случае Трп С190А, используемого нами в качестве белка «дикого типа». Подобный эффект говорит о том, что стабилизация центральной части Трп каким-то образом влияет на ферментативную реакцию расщепления АТФ головкой миозина, которая лежит в основе молекулярного механизма мышечного сокращения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что стабилизирующие мутации в центральной части Трп оказывают существенное влияние на его регуляторные свойства, описанные в обзоре литературы, – в частности, возможно, на переход Трп из состояния “closed” в состояние “open”, приводящий к активному взаимодействию миозиновых головок с актиновыми филаментами (см. рис. 6). Стоит также отметить, что подобный эффект (рис. 32) 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. 33) и в экспериментах, проведенных на реконструированных миофибриллах, содержащих рекомбинантные препараты Трп со стабилизирующими аминокислотными заменами в центральной части молекулы (рис. 37).

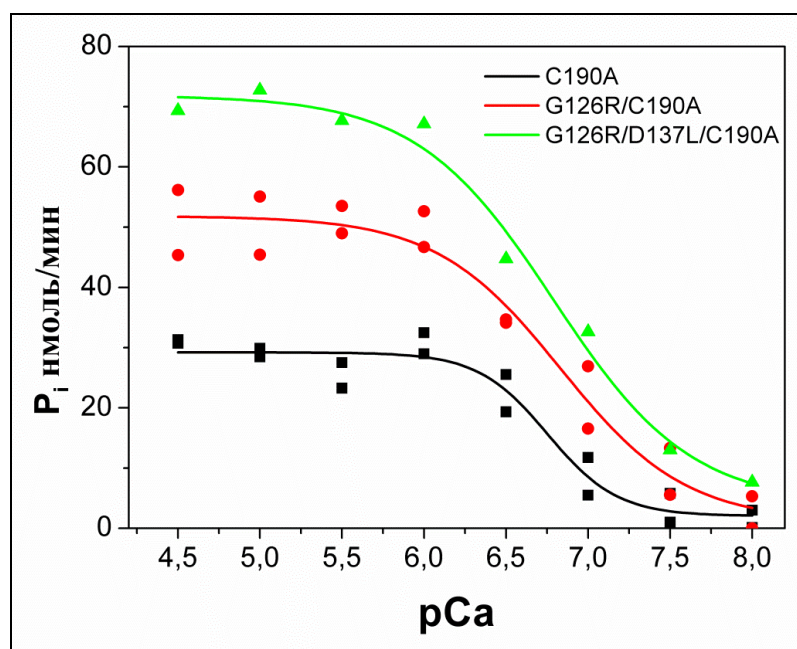


Рис. 32. Влияние замен G126R и G126R/D137L в центральной части молекулы Trpm на АТФазную активность S1 в присутствии реконструированных тонких филаментов при разных концентрациях свободного Ca^{2+} . Зеленым цветом на рисунке представлена Ca^{2+} -зависимость АТФазы S1 для препарата Trpm с заменами G126R/D137L/C190A, красным – с заменами G126R/C190A, черным – для контрольного Trpm C190A.

В экспериментах, проведенных в ИПС, было показано, что стабилизация центральной части Trpm приводит к увеличению скорости перемещения (скольжения) тонких филаментов (рис. 33А) и повышает Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение (рис. 33Б). Увеличение параметра pCa_{50} для препарата Trpm, содержащего стабилизирующие замены в центральной части молекулы, по сравнению с Trpm C190A, выражено в смещении экспериментальных кривых влево, в сторону более низких концентраций Ca^{2+} (рис. 33Б), в то время как увеличение максимальной скорости скольжения у тонких филаментов, содержащих Trpm с этими заменами, отражается в заметном увеличении амплитуды кривых при высоких концентрациях Ca^{2+} (рис. 33А). Благодаря результатам этого исследования можно утверждать, что дестабилизация центральной части Trpm модулирует его функции при регуляции мышечного сокращения. Полученные данные можно объяснить тем, что, вероятно, такая дестабилизация Trpm необходима для тонкой регуляции взаимодействия актинового филамента с миозином при мышечном сокращении.

Интересно отметить, что колебания концентрации Ca^{2+} в клетке лежат в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-6} молей. Зона перегиба кривой зависимости максимальной скорости от pCa_{50} для всех исследованных препаратов Trpm также лежит именно в этом диапазоне. Стоит, однако, отметить, что в случае препарата Trpm с заменами C190A/G126R/D137L

насыщение достигается значительно раньше, чем в случае Трп C190A (рис. 33), а это, в свою очередь, должно сказываться на регуляции мышечного сокращения. Так, в случае, если центральная часть Трп дестабилизирована, то максимальная скорость достигается только при концентрации кальция 10^{-6} М, в то время как в случае препарата Трп со стабилизированным центром максимальная скорость в этих условиях будет уже достигнута (рис. 33).

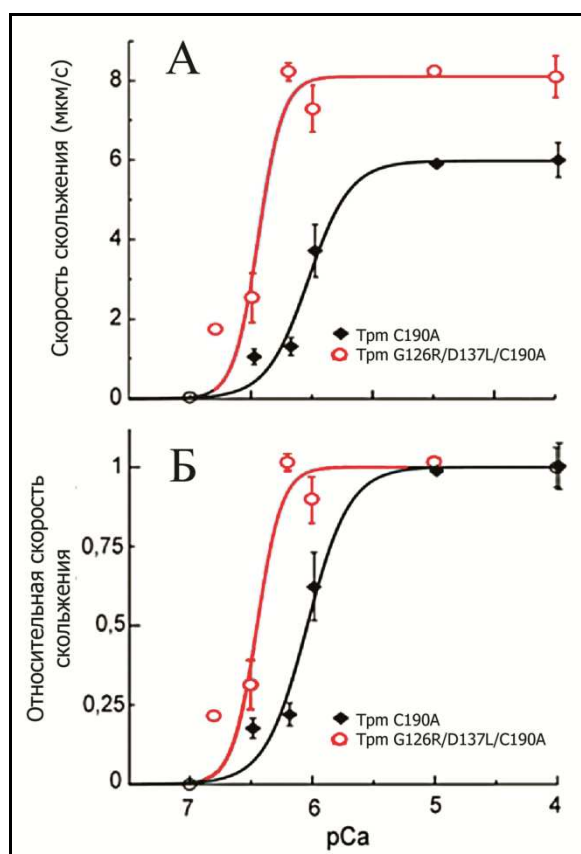


Рис. 33. Влияние стабилизирующих замен в центральной части молекулы Трп на Ca^{2+} -зависимую скорость перемещения («скольжения») реконструированных тонких филаментов в искусственной подвижной системе (ИПС, *in vitro* motility assay). Красная кривая соответствует препарату Трп с заменами G126R/D137L/C190A, черная кривая – контрольному препарату Трп C190A. **А** – ненормализованные данные, скорость представлена в мкм/с; **Б** – данные, нормализованные по максимальной скорости.

Также любопытен тот факт, что аминокислотные замены, стабилизирующие центральную часть молекулы Трп, не влияют на взаимодействие Трп с актином (рис. 30), но при этом оказывают заметное влияние на осуществляемую Трп регуляцию взаимодействия миозина с актином в искусственной системе подвижности, имитирующей в какой-то степени процесс мышечного сокращения. Отсюда можно сделать вывод, что функциональные различия между исследованными препаратами Трп зависят не от их взаимодействия с актином, а от внутренних свойств центральной части молекулы Трп. По

всей видимости, при внесении стабилизирующих аминокислотных замен в центральную часть молекулы Трп происходят структурные изменения, которые позволяют головкам миозина легче связываться с актином.

Для получения более подробной информации мы решили расширить наши исследования в ИПС и провести ряд дополнительных экспериментов – в частности, оценить влияние стабилизирующих аминокислотных замен в центральной части молекулы Трп на кооперативность взаимодействия головок миозина с актиновыми филаментами (рис. 34) и на относительную силу, развиваемую головками при таком взаимодействии (рис. 35).

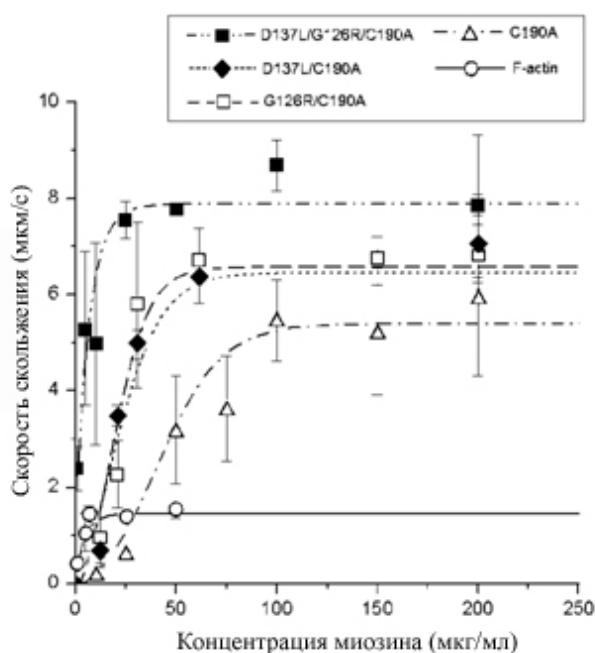


Рис. 34. Зависимость скорости скольжения тонких филаментов, содержащих различные препараты Трп, от концентрации миозина, добавленного в проточную ячейку. Данные были экстраполированы с использованием уравнения Хилла (см. Материалы и методы). Концентрация миозина, необходимая для достижения полумаксимальной скорости скольжения тонких филаментов, составила (в мкг/мл): 3.4 ± 0.5 для F-актина, 40.2 ± 2.1 для Трп C190A, 15.2 ± 1.3 для Трп G126R/C190A, 17.7 ± 1.5 для Трп D137L/C190A и 3.7 ± 0.2 для Трп D137L/G126R/C190A. Для всех препаратов приведено среднее значение $\pm$ S.D.

Как оказалось, стабилизация центральной части Трп приводит к значительному увеличению кооперативности взаимодействия миозиновой головки с тонким филаментом (рис. 34). Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом ДСК. Так, стабилизация молекулы Трп должна приводить к увеличению ее жесткости, что неизбежно должно влиять на количество актиновых мономеров, открываемых для взаимодействия с миоозиновыми головками, иными словами – увеличивать размер кооперативной единицы. Из представленных данных видно, что стабилизация структуры

Трп приводит к значительному уменьшению количества миозиновых головок, необходимых для перемещения тонкого филамента; особенно выразительные результаты были получены для препарата Трп D137L/G126R/C190A (рис. 34). Так, концентрация миозина, необходимая для достижения полумаксимальной скорости перемещения тонкого филамента, была для этого препарата в 10 раз меньше, чем для контрольного препарата Трп C190A.

Результаты экспериментов по измерению относительной силы, развиваемой миозиновыми головками в ИПС, представлены на рисунке 35.

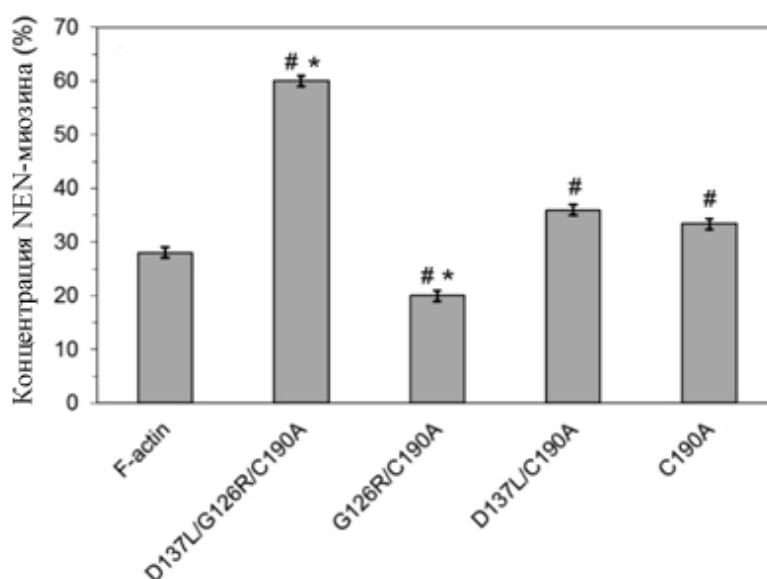


Рис. 35. Относительная сила, развиваемая миозином в ИПС при взаимодействии с тонкими филаментами, содержащими различные препараты Трп. Сила представлена в концентрации NEM-миозина (в процентах от общей концентрации миозина), добавленного в смеси с немодифицированным миозином, необходимой для полной остановки движения тонких филаментов. Символы (#) и (*) показывают достоверные отличия относительно F-актина и контрольного Трп C190A, соответственно; $p < 0.05$.

Результаты, полученные в этих экспериментах, оказались достаточно неожиданными. Так, оказалось, что стабилизация центральной части Трп при внесении двух замен G126R и D137L одновременно, приводят к увеличению сило-генерирующей способности миозиновой головки, в то время как одиночные замены либо практически не влияют на силу, развиваемую миозином (D137L/C190A), либо даже снижают ее (G126R/C190A) (рис. 35). Мы предположили, что это может быть результатом изменения величины кооперативной единицы и силы взаимодействия миозиновой головки с актиновым филаментом. Так, нашим коллегам из Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург) с помощью оптической ловушки удалось показать, что единственным препаратом Трп, способным изменять параметры взаимодействия миозиновой головки с актиновым филаментом, является Трп D137L/G126R/C190A. Как

оказалось, он практически вдвое увеличивал время взаимодействия миозиновой головки с тонким филаментом под нагрузкой, что говорит о более прочном его взаимодействии с актиновым филаментом и объясняет увеличение относительной силы в экспериментах, проведенных в ИПС (рис. 35). Другие препараты Trm (G126R/C190A и D137L/C190A) не приводили к таким изменениям, что в совокупности с повышением кооперативности взаимодействия миозина с актиновым филаментом (рис. 34) могло приводить к обратному эффекту, т.е. к повышению вероятности взаимодействия NEM-миозина с актиновым филаментом, что при неизменной силе единичного взаимодействия приводило бы к остановке движения тонкого филамента в ИПС при меньших концентрациях NEM-миозина.

Для интерпретации результатов нами был избран подход, основанный на анализе данных о структуре комплекса актин-Trm-миозин, полученной с разрешением 8 Å методом крио-электронной микроскопии [92]. Особенностью этой структуры является то, что в ней наблюдаются непосредственные контакты между молекулой Trm, расположенной на поверхности актинового филамента, и определенными участками головки миозина, что позволяет методом молекулярного докинга (подобный анализ осуществлялся совместно с А.К. Цатуряном из Института механики МГУ им. М.В. Ломоносова) предсказать участки взаимодействия между этими структурами. В приведенной статье использовалась структура комплекса F-актин-Trm с немышечным миозином-I. Для построения нашей модели (рис. 36) мы заменили участки головки миозина-I на соответствующие участки головки миозина-II скелетных мышц, использовавшегося в нашей работе. При построении модели обращали внимание на те аминокислотные остатки головки миозина, которые находятся достаточно близко от остатков в положениях 126 и 137 в центральной части Trm, чтобы вступать с ними в потенциальные взаимодействия. Результаты, полученные при наложении структур, приведены на рис. 36. Остаток Gly126 в Trm был не способен к каким-либо взаимодействиям с миозином, однако вследствие замены G126R остаток Arg126 в Trm оказывается вблизи от остатка Lys399 в головке миозина, и между положительно заряженными атомами этих остатков могло возникнуть электростатическое отталкивание (рис. 36 В). В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что замена остатка Gly126 в Trm не на заряженный Arg, а на маленький и гидрофобный Ala не оказывала никакого влияния на АТФазную активность миозина в комплексе с регулирующими актиновыми филаментами [103]. Иная ситуация наблюдалась в области остатка в положении 137 в центральной части Trm. В этом случае отрицательно заряженный остаток Asp137 находится близко от положительно заряженного остатка Arg371 в головке

миозина и вступает с ним в электростатическое взаимодействие (рис. 36 А), которое нарушается вследствие замены остатка Asp137 на остаток лейцина (рис. 36 В).

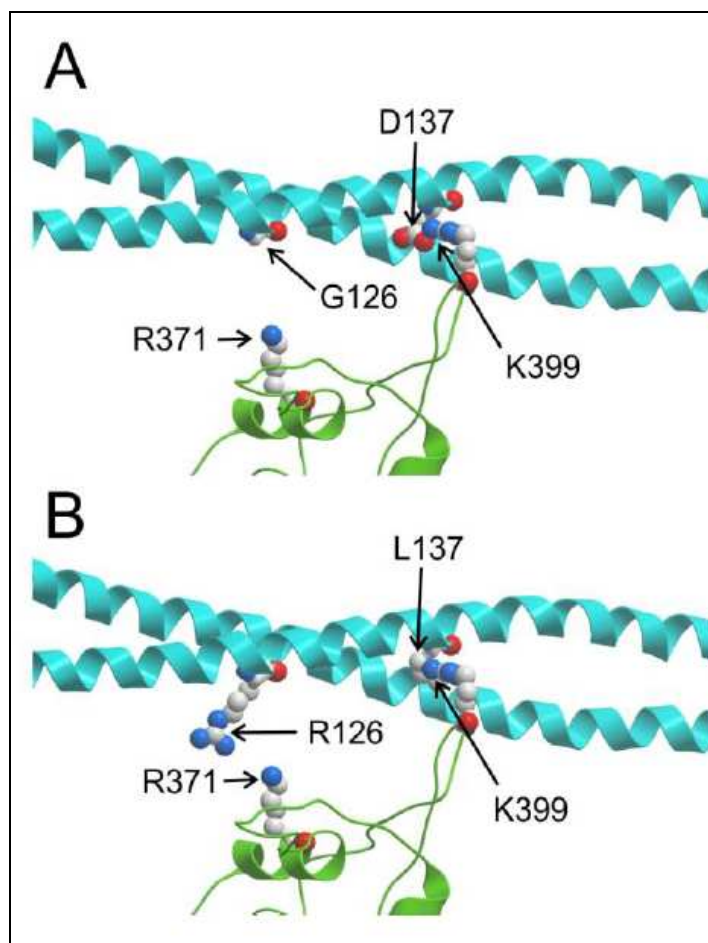


Рис. 36. Структурная модель области контакта миозиновой головки с Трп на поверхности актинового филамента при связывании миозина с актином. Показаны только участки миозиновой головки, прилегающие к остаткам 126 и 137 в центральной части Трп (актин и остальные части миозина и Трп не показаны). Сегменты 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.

Таким образом, исходя из полученной модели, аминокислотные замены в центральной части молекулы Трп способствуют смещению тропомиозинового тяжа по поверхности актинового филамента при переходе из состояния «closed» в состояние «open» в соответствии со схемой, предложенной McKillop & Geeves [19] (рис. 6). Вероятно, именно этим можно объяснить столь заметное влияние этих замен на АТФазную активность S1 в присутствии регулируемых актиновых филаментов (рис. 32) и на подвижность таких филаментов в ИПС (рис. 33). Стоит заметить, однако, что предложенная модель (рис. 36) статична и не учитывает изменений, которые могут

возникать вследствие влияния локального окружения и теплового движения молекул. Если учесть тот факт, что центральная часть молекулы Трп наименее стабильна, то смещения здесь могут быть наиболее заметными, а это может вносить отклонения от нашей модели в определении расстояний между взаимодействующими аминокислотными остатками, что, в свою очередь, может приводить как к усилению взаимодействий, так и к их ослаблению. Тем не менее, в соответствии с этой моделью, подобные взаимодействия представляются потенциально возможными.

Таким образом, центральная часть молекулы Трп модулирует, по-видимому, переход тонкого филамента из состояния «closed» в состояние «open» при мышечном сокращении, тогда как стабилизация этой части Трп может приводить либо к исчезновению состояния «closed», либо к существенному облегчению его перехода в состояние «open», что может негативно сказаться на регуляции мышечного сокращения.

Наконец, венцом наших исследований в этом направлении стали эксперименты на миофибриллах, выполненные в сотрудничестве с нашими итальянскими коллегами с кафедры физиологии Университета Флоренции. В этих экспериментах, проведенных на реконструированных миофибриллах, содержащих различные препараты Трп, было показано, что стабилизация центральной части Трп приводит к значительному ухудшению релаксационных свойств миофибрилл: она заметно увеличивает время их релаксации при снижении концентрации Ca^{2+} (рис. 37) и приводит к снижению длины саркомера (с 1,97 мкм для контрольного Трп С190А до 1,72 мкм для Трп D137L/G126R/C190A).

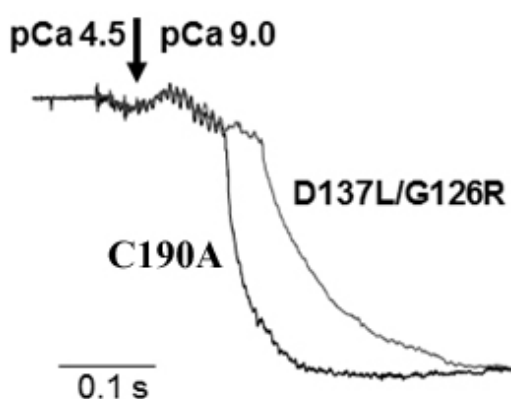


Рис. 37. Кинетика расслабления реконструированных миофибрилл, содержащих рекомбинантные препараты Трп со стабилизирующими аминокислотными заменами G126R/D137L в центральной части молекулы, по сравнению с миофибриллами, содержащими контрольный Трп С190А. Стрелкой на рисунке обозначен момент внесения раствора с низкой концентрацией кальция (pCa 9), соответствующий началу релаксации.

Это однозначно свидетельствует о том, что миофибриллам, содержащим Трп со стабилизирующими заменами в центральной части молекулы, не удастся достигнуть полного расслабления. Данный вид экспериментов очень важен, т.к. он дает представление о том, что все функциональные изменения, вызванные стабилизацией центральной части молекулы Трп, затрагивают не только процесс активации мышечного сокращения, но и влияют на релаксацию миофибрилл.

В завершение этого раздела можно сделать вывод, что дестабилизация центральной части молекулы 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.

----- //

В ходе выполнения исследований, связанных со стабилизацией центральной части молекулы Трп, возникла идея добиться противоположного эффекта – еще больше дестабилизировать эту часть молекулы и оценить, каким образом это может сказаться на функционировании Трп. Так была начата работа по структурно-функциональным исследованиям препаратов Трп с аминокислотными заменами M127A/I130A и M141A/Q144A в центральной части молекулы. Эти замены канонических остатков Met, Ile или Gln, расположенные в положениях **a** и **d** гептады, на неканонические остатки аланина, нарушающие, как правило, структуру двойной спирали Трп, должны были, по нашим предположениям, значительно дестабилизировать центральную часть молекулы Трп и вызывать эффекты, противоположные тем, которые мы наблюдали в случае стабилизирующих замен G126R, D137L и D137L/G126R. Таким образом, мы ожидали, что замены M127A/I130A и M141A/Q144A будут снижать термостабильность молекулы Трп и ухудшать ее функциональные свойства. Однако, вопреки ожиданиям, при исследованиях Трп с заменами M127A/I130A и M141A/Q144A методами спектроскопии КД (рис. 38) и ДСК (рис. 39) было показано, что эти замены не оказывают сколько-нибудь заметного влияния на характер тепловой денатурации Трп. Мы предположили, что данные замены, которые по определению должны нарушать структуру двойной спирали в центральной части Трп, оказывают влияние лишь на стабильность этой части молекулы, но при этом, в отличие от стабилизирующих замен G126R, D137L и D137L/G126R, не оказывают заметного влияния на доменную структуру всей молекулы Трп.

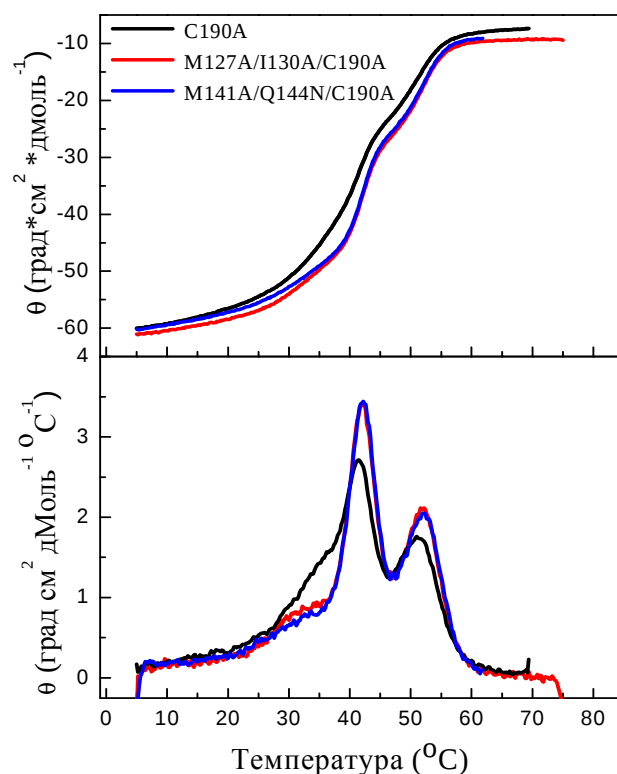


Рис. 38. Температурные зависимости молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД и демонстрирующие влияние аминокислотных замен М127А/І130А и М141А/Q144А в центральной части Трп С190А на его тепловую денатурацию. Вверху – температурные зависимости разворачивания двойной α -спирали Трп; снизу – первые производные температурных зависимостей, представленных сверху. Хорошо видно, что замены М127А/І130А и М141А/Q144А в центральной части молекулы Трп не оказывают заметного влияния на тепловую денатурацию Трп.

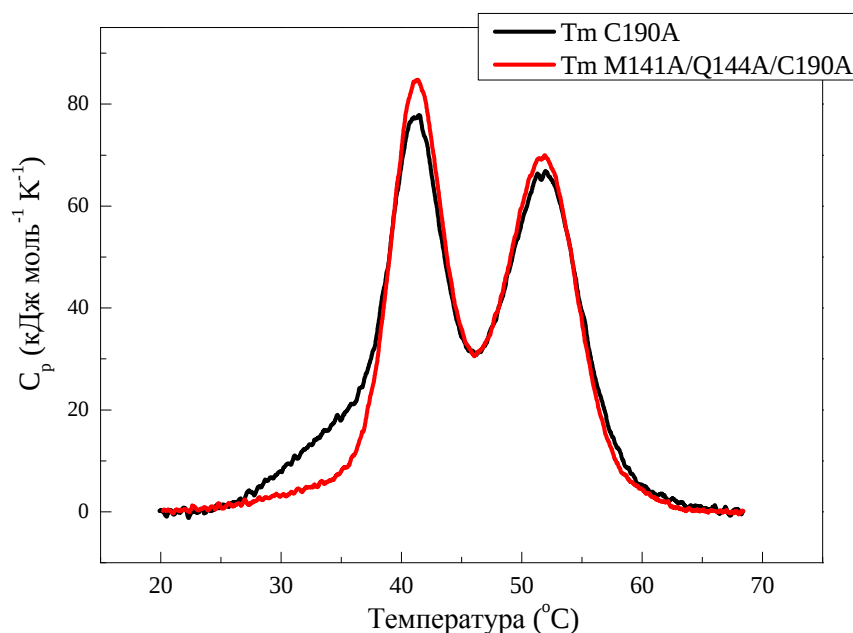


Рис. 39. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения, полученные методом ДСК для препаратов Трп С190А (черная кривая) и Трп С190А/М141А/Q144А (красная кривая). Хорошо видно, что аминокислотные замены М141А/Q144А в центральной части молекулы Трп не оказывают заметного влияния на тепловую денатурацию и доменную структуру Трп.

Это предположение косвенно подтверждается тем, что все изменения, которые мы наблюдаем при структурных исследованиях, затрагивают лишь некооперативный переход в низкотемпературной области, соответствующий, по-видимому, плавлению центральной части молекулы Трм, но не затрагивают при этом два главных тепловых перехода, соответствующих плавлению N- и C-концевых доменов молекулы (рис. 38, 39). При этом видно, что вносимые нами аминокислотные замены приводят не к дестабилизации, а скорее к стабилизации центральной части Трм. Подобный результат может быть объяснен тем, что удаление канонических остатков Met, Ile или Gln путем их замены на остатки Ala сопровождается смыканием полости, обнаруженной ранее в центральной части Трм [62]. Для того, чтобы оценить, насколько верно наше предположение, совместно с А.К. Цатуряном было решено провести подробный компьютерный анализ структуры центральной части молекулы Трм, в которой расположены остатки M127, I130, M141 и Q144. Результаты этого анализа указывают на то, что четыре объемных гидрофобных остатка в этой части молекулы (M127, I130, M141 и Q144), взаимодействуя друг с другом, образуют «распорки», которые «расталкивают» две α -спирали двойной спирали Трм, создавая в ней доступные для воды полости и нарушая тем самым структуру СС в этой области (рис. 40). Более наглядно эти результаты представлены на схеме, изображенной на рис. 41. Аминокислотные замены M127A/I130A и M141A/Q144A разрушают такие распорки, что, по-видимому, и приводит к частичному закрытию этих полостей и, как следствие, к частичному восстановлению структуры СС в этой области (рис. 41). Таким образом, канонические остатки Трм, которые обычно стабилизируют структуру СС, в данном случае приводят, по-видимому, к противоположному эффекту – дестабилизации, открывая полости между двумя α -спиралями для взаимодействия с молекулами воды.

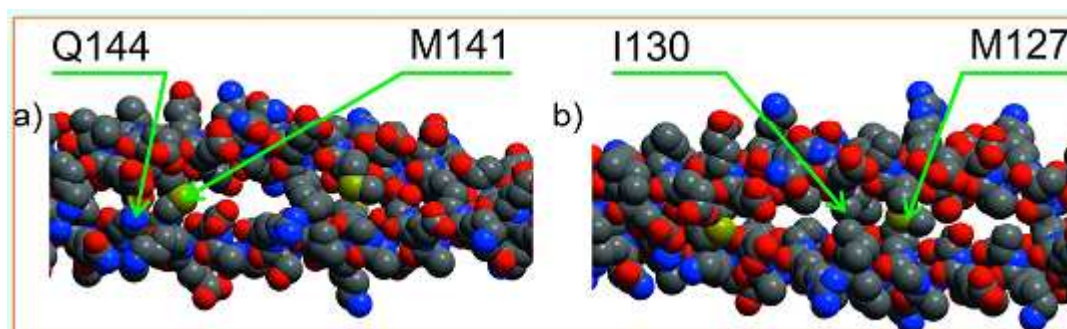


Рис. 40. Структура центральной части молекулы Трм с указанием объемных радикалов остатков Q144 и M141 (a) и I130 и M127 (b). Хорошо видно, что эти гидрофобные радикалы образуют «распорки», приводящие к образованию полостей, доступных для молекул воды.

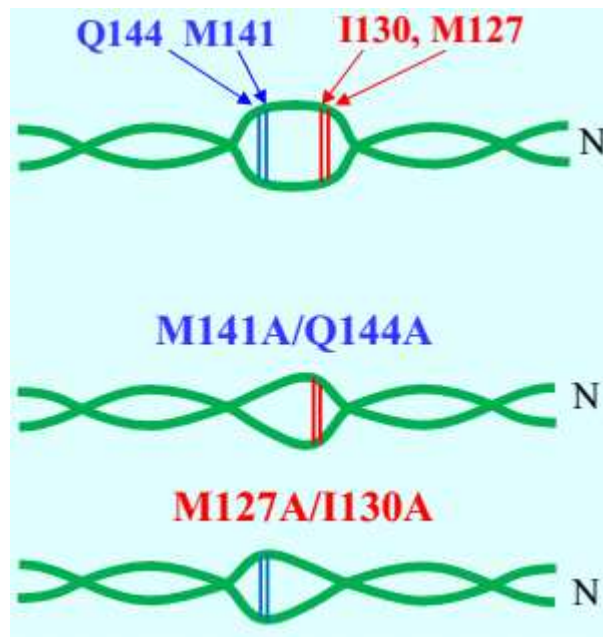


Рис. 41. Схематическое изображение структурных изменений, происходящих в центральной части молекулы Trp при внесении в нее аминокислотных замен M127A/I130A и M141A/Q144A. Эти замены разрушают «распорки», образуемые объемными гидрофобными радикалами остатков M127, I130, M141 и Q144 в центральной части Trp, что, по-видимому, приводит к частичному закрытию полостей, доступных для контакта с водой и восстановлению структуры coiled-coil в этой области.

Выдвинутое нами предположение также хорошо согласуется с функциональными данными, полученными в ИПС. Оказалось, что эти аминокислотные замены в центральной части Trp (M127A/I130A и M141A/Q144A) заметно (в 1,3–1,5 раза) увеличивают максимальную скорость скольжения по поверхности с иммобилизованным миозином регулируемых актиновых филаментов, содержащих Trp и тропонин; более того, они повышают чувствительность такого скольжения к концентрации кальция, сдвигая кривую зависимости скорости от pCa на 0,2 единицы, с 6,2 до 6,4, в сторону более низких концентраций кальция (рис. 42). Эти эффекты замен M127A/I130A и M141A/Q144A очень похожи на те, которые мы наблюдали для стабилизирующих замен D137L/G126R (рис. 33), что хорошо согласуется с нашей гипотезой о стабилизации центральной части Trp аминокислотными заменами M127A/I130A и M141A/Q144A.

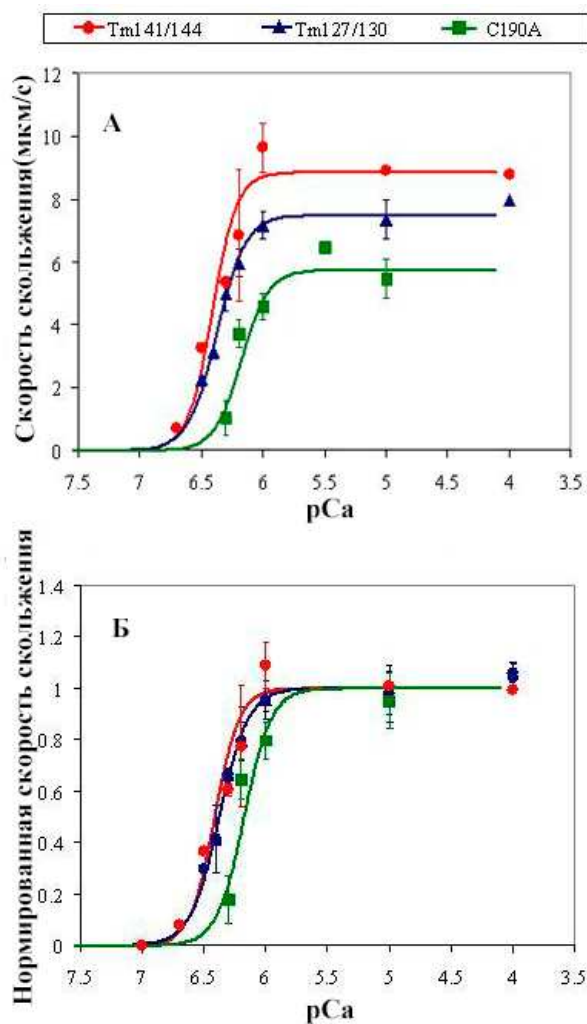


Рис. 42. Влияние аминокислотных замен M127A/I130A и M141A/Q144A в центральной части молекулы Trp на Ca^{2+} -зависимую скорость перемещения («скольжения») реконструированных тонких филаментов в ИПС. Красная кривая соответствует препарату Trp с заменами M141A/Q144A, синяя кривая – препарату Trp с заменами M127A/I130A и зеленая кривая – контрольному препарату Trp C190A. **А** – ненормализованные данные, скорость представлена в $\mu\text{m/s}$; **Б** – данные, нормализованные по максимальной скорости.

Полученные данные снова указывают на важность дестабилизации центральной части молекулы Trp. Кроме того, данная дестабилизация и образование полостей в центральной части Trp важны, вероятно, для правильного взаимодействия головок миозина с Trp на поверхности актинового филамента, поскольку стабилизация центральной части Trp или более тесное смыкание α -спиралей в этой области его молекулы приводит к изменениям актин-миозинового взаимодействия.

3.2. Структурно-функциональные исследования рекомбинантных препаратов Трм с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим и миопатическим мутациям в генах Трм.

Существует множество мутаций в генах Трм, которые могут приводить к тяжелым наследственным заболеваниям. В нашей работе мы сосредоточили свое внимание на изучении тех из них, которые ассоциированы как с кардиомиопатиями, так и с миопатиями. В данной работе исследования проводились на двух изоформах Трм – Трм 1.1 (α -Трм по старой классификации) и Трм 2.2 (β -Трм). Все исследования, проводимые в рамках изучения мутаций, ассоциированных с развитием кардиомиопатий, были выполнены на препаратах с аминокислотными заменами в изоформе Трм 1.1, т.к. это основная изоформа сердечной ткани. Напротив, исследования, связанные с мутациями, приводящими к различным миопатиям, были выполнены на изоформе Трм 2.2, т.к. подобные заболевания ассоциированы с аминокислотными заменами именно в этой изоформе Трм.

Исследования препаратов Трм с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим мутациям в генах Трм.

В нашей работе мы исследовали свойства препаратов Трм с аминокислотными заменами в области контакта Трм с тропонином Т, вызываемыми такими мутациями (рис. 12). В качестве первых объектов изучения нами были выбраны образцы Трм, содержащие аминокислотные замены в области остатка Cys190. Чтобы показать, какие структурные изменения вносят подобные замены, мы использовали метод КД. На температурных зависимостях плавления Трм, полученных этим методом, хорошо видно, что все изменения затрагивают лишь первый, наименее термостабильный пик, который соответствует плавлению С-концевой части молекулы Трм (рис. 43). При этом аминокислотная замена E180V стабилизирует эту часть молекулы Трм, тогда как замены E180G и I172T дестабилизируют ее, а замена L185R не оказывает влияния на стабильность молекулы Трм. 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 Трм 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.

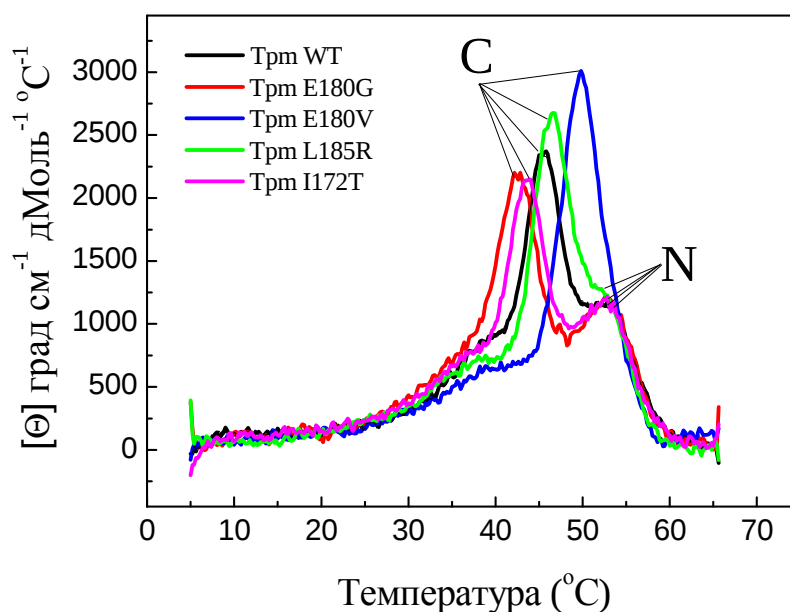


Рис. 43. Первые производные температурных зависимостей молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для препаратов Trm с заменами в области остатка Cys190. Черная кривая соответствует препарату Trm WT, красная – Trm с заменой E180G, синяя – E180V, зеленая – L185R, фиолетовая – I172T. Буквами 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. Самые яркие результаты подобных экспериментов представлены на рис. 44. Опыт был проведен в условиях повышенной концентрации NaCl (200 мМ NaCl), что позволило нам наблюдать некоторый эффект этих мутаций на сродство Trm к актину. Видно, что в этих условиях аминокислотные замены E180V и I172T незначительно снижают сродство Trm к F-актину (рис. 44). Эксперименты, проведенные при более низких концентрациях NaCl (100 мМ NaCl), эффектов не выявили.

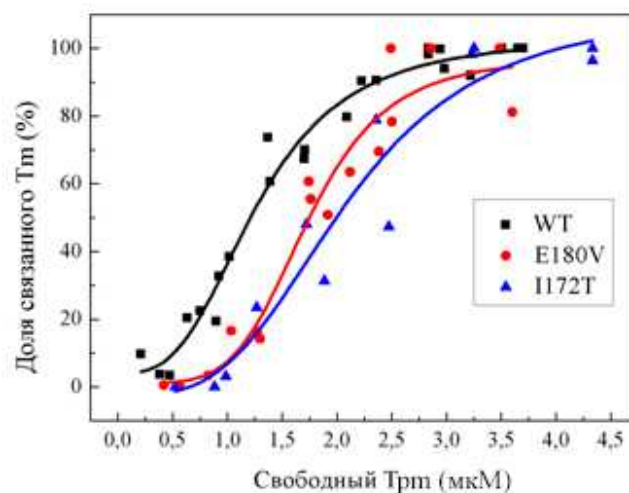


Рис. 44. Связывание различных препаратов Trpm с F-актином в экспериментах по соосаждению. Представлены зависимости степени насыщения актинового филамента молекулами Trpm от концентрации свободного Trpm, остающегося в супернатанте после центрифугирования комплексов Trpm с F-актином. Видно, что аминокислотные замены E180V и I172T незначительно снижают сродство Trpm к F-актину.

Снижение аффинности для препаратов Trpm с аминокислотными заменами в положениях 180 и 172 можно объяснить тем, что эти замены расположены недалеко от остатков, принимающих участие во взаимодействии Trpm с актином. Так, в положении 180 у молекулы Trpm WT расположен остаток глутаминовой кислоты, который может быть вовлечен в ионные взаимодействия с положительно заряженными остатками лизина (Lys326 и Lys328) на поверхности актинового филамента [76]. Замена остатка глутаминовой кислоты на незаряженные остатки глицина или валина приводит, по всей видимости, к ослаблению таких взаимодействий. Остаток Ile172 в молекуле Trpm также расположен недалеко от остатка Pro333 на актиновом филаменте, участвующего в формировании гидрофобных связей с Trpm (он образует пару с остатком Val170 в Trpm [76]). Таким образом, локальные структурные изменения в молекуле Trpm при внесении замены I172T могут приводить к нарушению гидрофобных взаимодействий Trpm с актиновым филаментом.

Замены в области остатка Cys190 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. 45). Замены E180G и I172T дестабилизировали комплексы Trpm 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 Trpm C190A. Как и при

изучении тепловой денатурации препаратов Трм (рис. 43), 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. 45). Это хорошо коррелирует с большой разницей между этими препаратами по термостабильности С-концевого домена молекулы Трм (рис. 43). Из этого можно сделать вывод, что стабильность комплексов Трм с актином может зависеть от стабильности С-концевой части молекулы Трм.

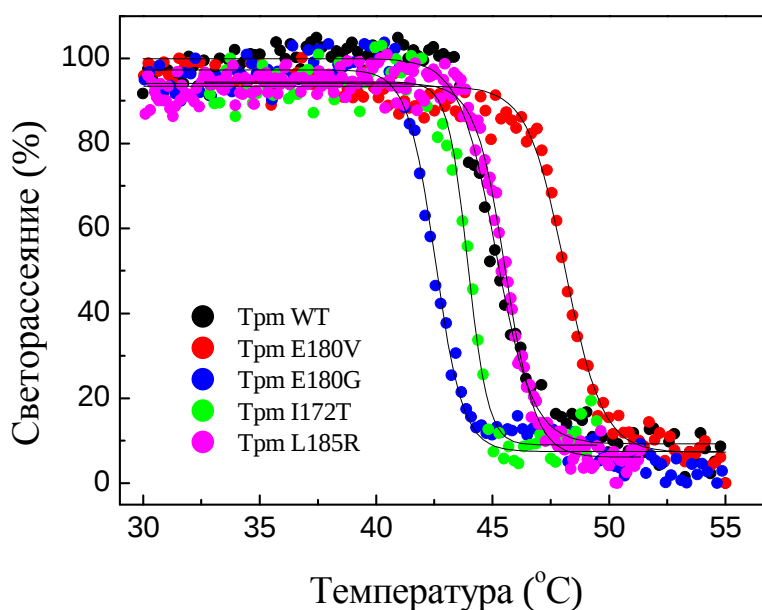


Рис. 45. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трм с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Черная кривая соответствует препарату Трм WT, красная – Трм E180V, синяя – Трм E180G, зеленая – Трм I172T и фиолетовая – Трм L185R. Концентрация F-актина составляла 20 μ M, Трм – 10 μ M. 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. 46). 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. 46), 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.

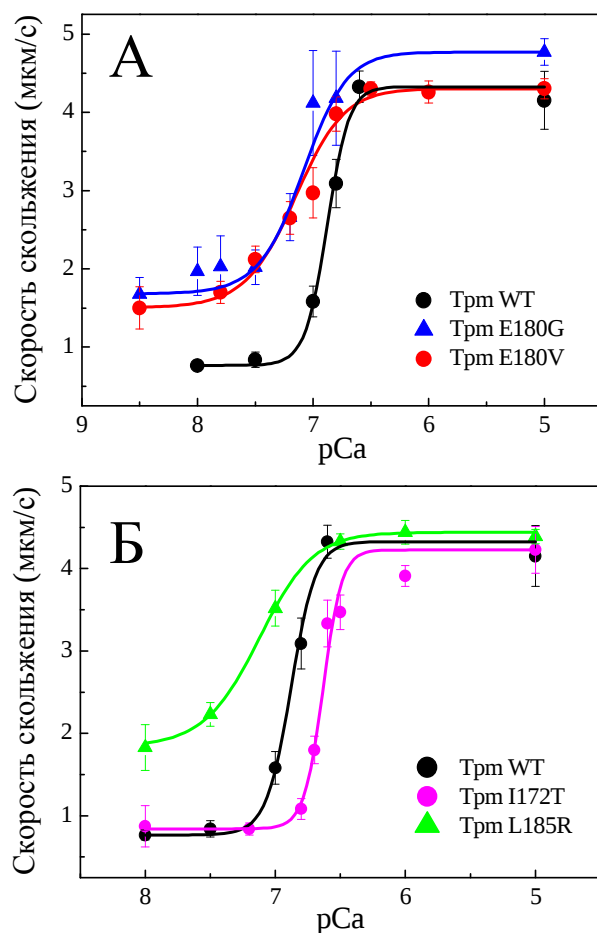


Рис. 46. Влияние аминокислотных замен в области остатка Cys190 молекулы Trpm на зависимость скорости перемещения («скольжения») реконструированных тонких филаментов в ИПС от концентрации кальция. Черная кривая соответствует контрольному препарату Trpm WT, синяя – Trpm E180G, красная – Trpm E180V, зеленая – Trpm L185R и фиолетовая – Trpm 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 Trpm WT, I172T, L185R, E180G и E180V, соответственно.

Подобные эксперименты были проведены и для препаратов Trpm с аминокислотными заменами в области перекрытия N- и C-концов двух соседних молекул Trpm на поверхности актинового филамента, причем как в N-концевой части молекулы Trpm (замены M8R и K15N), так и в ее C-концевой части (замены A277V, M281T и I284V) (см. рис. 12). Методом КД было показано, что все эти аминокислотные замены не оказывали заметного влияния на характер тепловой денатурации Trpm и на доменную структуру его молекулы, за исключением замены A277V, которая приводила к некоторой стабилизации C-концевого домена Trpm. Тем не менее, эти замены приводили к существенным изменениям функциональных свойств Trpm. Так, например, замены, расположенные поблизости от N-конца молекулы Trpm (M8R и K15N), сильно снижали

сродство Трм к актину (рис. 47). Особенно ярко этот эффект проявлялся в случае Трм с заменой М8R, который практически утрачивал способность связываться с актиновым филаментом (рис. 47). Замены в С-концевой области молекулы Трм (A277V, M281T и I284V) также снижали сродство Трм к актину, но в значительно меньшей степени.

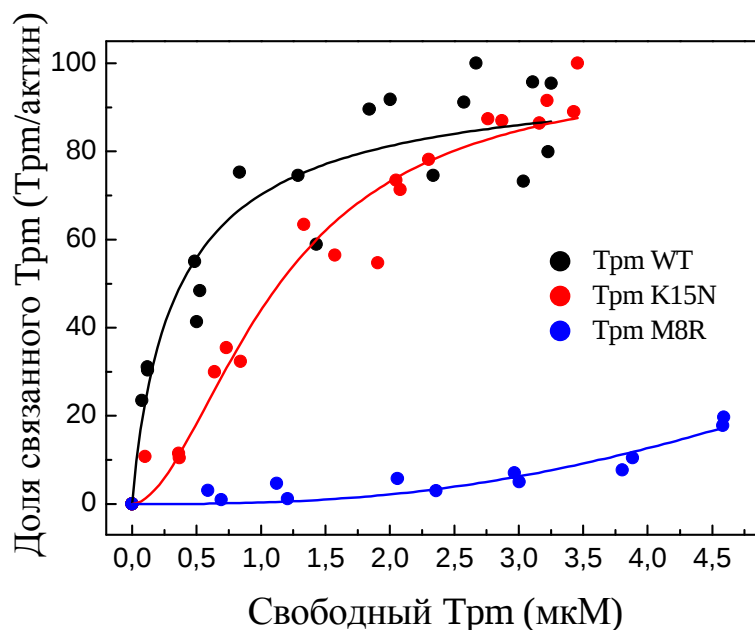


Рис. 47. Связывание с F-актином препаратов Трм, несущих замены М8R или К15N в N-концевой области молекулы. Результаты экспериментов по соосаждению Трм с F-актином представлены в виде зависимостей степени насыщения актинового филамента молекулами Трм от концентрации свободного Трм, остающегося в супернатанте после центрифугирования комплексов Трм с F-актином. Черным цветом показаны данные для контрольного Трм WT, синим – для Трм с заменой М8R, красной – для Трм с заменой К15N. Видно, что замена К15N значительно снижает сродство Трм к F-актину, а Трм с заменой М8R практически утрачивает способность связываться с F-актином.

Удивительно, что наиболее выраженным эффектом обладают аминокислотные замены, расположенные в N-концевом сегменте Трм. Это можно объяснить тем, что оба этих остатка, Lys15 и Met8, очень важны для взаимодействий между N- и С-концами молекул Трм. В работе Murakami с соавторами [87] были подробно описаны особенности такого взаимодействия как в отсутствие, так и присутствии тропонина Т. Согласно этим данным, Lys15 является одним из очень важных остатков, ответственных за расширение N-концевого сегмента Трм, внутри которого располагается плотно упакованный С-конец соседней молекулы Трм. Поэтому мутация по этому остатку может приводить к нарушению взаимодействий между концами молекул Трм, что в свою очередь может сильно снижать сродство Трм к актину. В случае с аминокислотной заменой М8R мы нарушаем гидрофобные взаимодействия, в которые, согласно статье Murakami с соавторами [87], вовлечен остаток Met8, что и приводит, видимо, к практически полной потере сродства Трм к актину (рис. 47).

Итак, 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 С-концами его молекул. Наше предположение полностью подтвердилось. Было показано, что замены в области N- и С-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. 48). Примечательно, что данные вискозиметрии (рис. 48) хорошо согласуются с результатами экспериментов по соосаждению (рис. 47); это свидетельствует о том, что именно ослабление концевых взаимодействий, вызываемое аминокислотными заменами в С- и особенно в N-концевой области Трм, приводит, видимо, к снижению сродства препаратов Трм к актину.

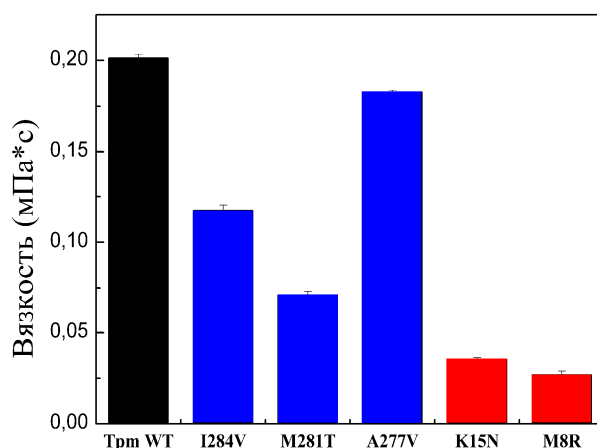


Рис. 48. Значения вязкости раствора для препаратов Трм с аминокислотными заменами в области N- и С-концов молекул Трм. Черный столбец на диаграмме соответствует вязкости препарата Трм WT, синие – Трм с заменами в С-концевой области, красные – Трм с заменами в N-концевой области молекулы. Значения вязкости 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.

Более того, результаты экспериментов по вискозиметрии (рис. 48) 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 (рис. 49). Так, оказалось, что аминокислотные замены K15N и M281T снижают стабильность таких комплексов, а замена I284V на нее практически не влияет. На рисунке 49 не приведена кривая для препарата Трм с заменой M8R, т.к. в условиях этого эксперимента мы вообще не наблюдали температурного

перехода для этого препарата, что связано с его крайне низким сродством к F-актину (рис. 47). Стоит отметить, что исключение составлял лишь препарат Трп с заменой A277V, которая не оказывала заметного влияния ни на вязкость раствора Трп (рис. 48), ни на сродство Трп к актину, однако повышала стабильность комплексов Трп с актином (рис. 49). Эти данные хорошо согласуются с результатами экспериментов методом КД, в которых было показано, что замена A277V увеличивает стабильность С-концевой части молекулы Трп. Таким образом, стабильность комплексов Трп с F-актином может, по-видимому, зависеть от двух факторов – от стабильности С-концевой области молекулы Трп и от силы взаимодействий между N- и С-концами молекул Трп.

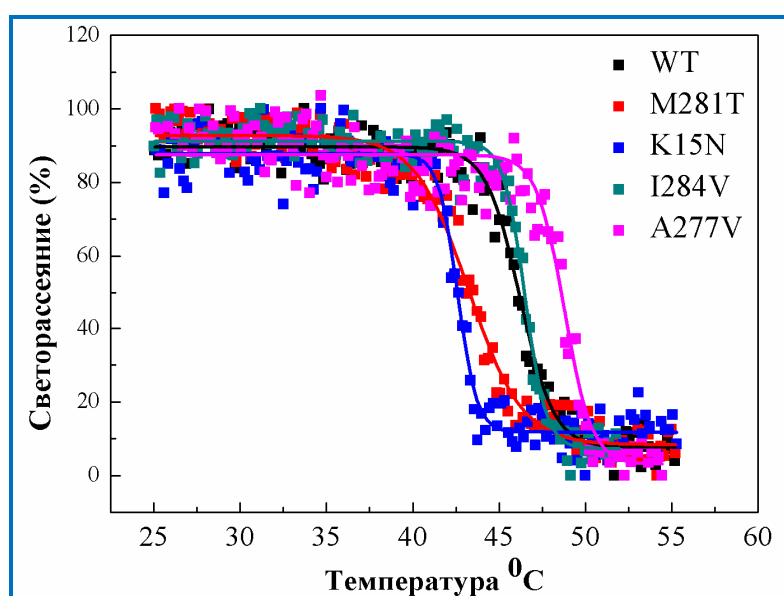


Рис. 49. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трп с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Черная кривая соответствует препарату Трп WT, красная – Трп с заменой M281T, синяя – Трп K15N, зеленая – Трп I284V и фиолетовая – Трп A277V. Концентрация F-актина составляла 20 μM , Трп – 10 μM . Скорость прогрева – 1 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

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

практически в 2 раза (рис. 50). В то же время С-концевая замена A277V не оказывала влияния на характеристики зависимости «pCa-скорость». Замены, находящиеся на N-конце молекулы Трп (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. 50). 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. 50), т.е. в условиях расслабления сердечной мышцы. Подобные замены в Трп могут оказывать серьезное влияние на регуляцию сокращения сердечной мышцы, предотвращая ее полное расслабление при кардиомиопатии.

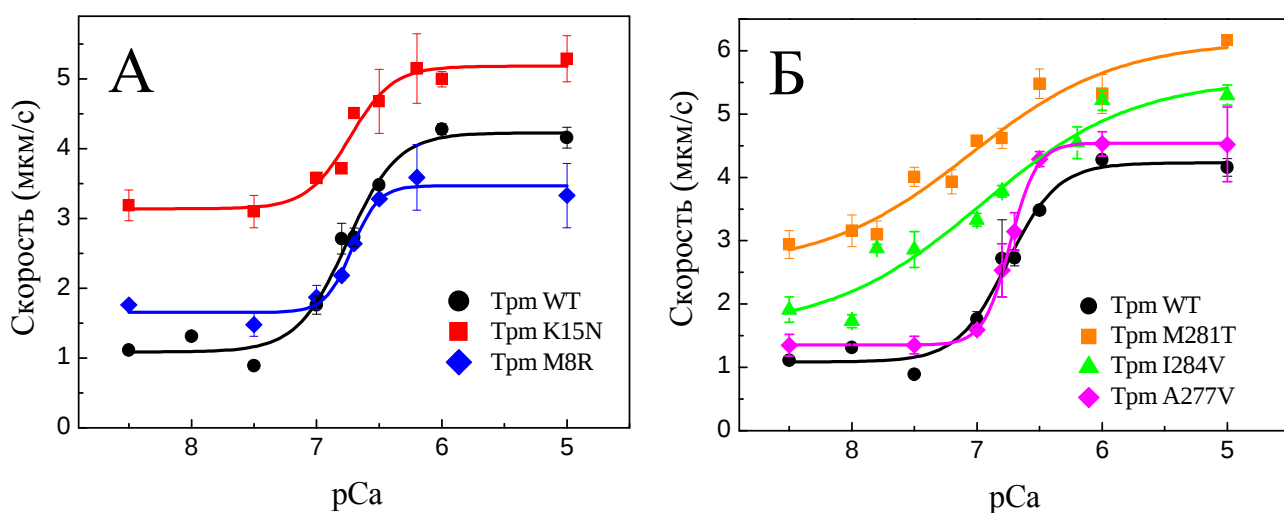


Рис. 50. Влияние аминокислотных замен в области С- и N-концов молекулы Трп на зависимость скорости скольжения реконструированных тонких филаментов в ИПС от концентрации кальция. Черная кривая соответствует контрольному препарату Трп WT, синяя – Трп с заменой M8R, красная – Трп R15N, зеленая – Трп I284V и рыжая – Трп M281T.

Завершая этот раздел, можно заключить, что в результате проведенных экспериментов нами было накоплено большое количество данных о влиянии кардиомиопатических мутаций в генах Трп 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 Трп такими мутациями, обладала своими индивидуальными характеристиками, что, по-видимому, говорит о многообразии причин и механизмов развития кардиомиопатий. Однако нам удалось отметить и ряд тенденций. Так,

большинство мутаций приводило к нарушению регуляции перемещения тонкого филамента при низкой концентрации кальция, что может являться причиной гиперчувствительности тонкого филамента к Ca^{2+} и приводить к неполной релаксации сердечной мышцы. Большинство мутаций в большей или меньшей степени снижало сродство Трп к актину, что может приводить к неполному декорированию актинового филамента молекулами Трп и негативно сказываться на регуляции сокращения сердечной мышцы. В случае с мутациями, расположенными в области остатка Cys190, были найдены изменения в структуре молекулы Трп, которые могут изменять в том числе и параметры взаимодействия Трп с актином и тропонином. В пользу такого предположения свидетельствуют данные о том, что вызываемые кардиомиопатическими мутациями аминокислотные замены в молекуле Трп могут приводить к структурным изменениям в тропонине С [131]. В случае с мутациями в концевых областях Трп, существенных изменений в структуре молекулы Трп не наблюдалось, однако наблюдались существенные изменения в силе взаимодействий между молекулами Трп, что не менее важно для выполняемых им функций. Тем не менее, несмотря на все изложенное выше, говорить об установлении какой-то общей характеристики, которая объединяла бы все исследованные кардиомиопатические мутации, мы пока не можем.

Исследования препаратов Трп с аминокислотными заменами, соответствующими миопатическим мутациям в генах Трп.

В нашей работе в качестве модельных объектов для исследования структурно-функциональных эффектов аминокислотных замен, ассоциированных с развитием наследственных заболеваний скелетных мышц, были выбраны препараты Трп с заменами R133W и N202K. Это связано как с тем, что эффекты этих аминокислотных замен практически еще не изучены, так и с тем, что мутации, приводящие к заменам этих остатков, ассоциированы с двумя разными типами заболеваний мышц: дистальным артрогриппозом 2В типа (N202K) и «кэповым заболеванием» (R133W). Сравнение эффектов двух этих мутаций интересно тем, что одно из таких заболеваний, вызываемое заменой N202K, не сопровождается видимыми морфологическими изменениями в мышечной ткани, а другое, вызываемое заменой R133W, приводит к образованию так называемых «кэп» структур в саркомере.

Наши исследования мы начали с использования метода спектроскопии КД для оценки влияния замен R133W и N202K на вторичную структуру молекулы Трп 2.2. Спектры КД, полученные для Трп с этими заменами, не отличались от спектра Трп WT.

Таким образом, ни одна из этих аминокислотных замен не приводила к изменению вторичной структуры белка. Мы также исследовали методом КД влияние замен R133W и N202K на термостабильность Трм, регистрируя температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм. Ни одна из этих замен не оказывала заметного влияния на тепловую денатурацию Трм: не было обнаружено никаких заметных различий между температурными зависимостями этих препаратов Трм, представленными как в интегральном, так и в дифференциальном виде (рис. 51). В последнем случае хорошо видно, что все зависимости представлены единственным пиком с максимумом при 40,6°C для Трм WT и Трм N202K и при 40,0°C для Трм R133W. Отсутствие видимых структурных эффектов может быть объяснено тем, что эти замены расположены в положениях **f** (N202K) и **g** (R133W) гептады Трм, не принимающих особого участия в формировании структуры СС. Стоит лишь заметить, что в случае аминокислотной замены R133W может иметь место нарушение ионных взаимодействий в структуре СС, и именно для Трм с этой заменой было выявлено незначительное снижение термостабильности.

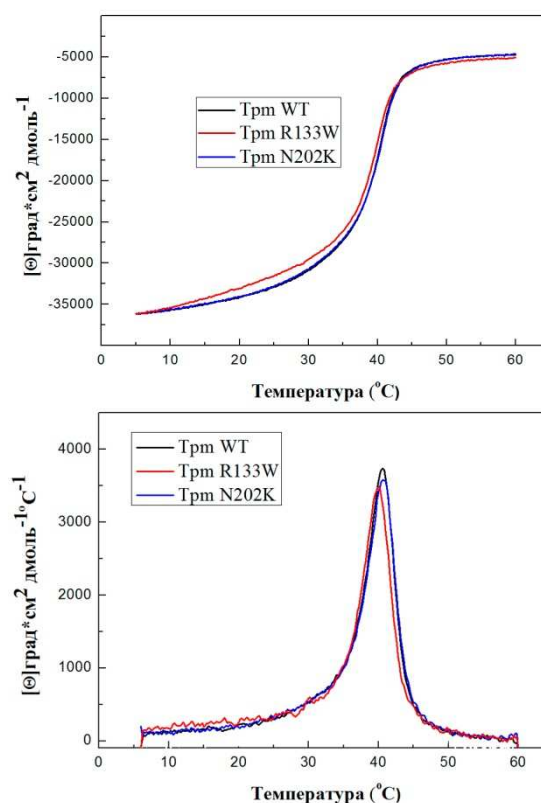


Рис. 51. Вверху – температурные зависимости молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для Трм WT (черная кривая), Трм R133W (красная кривая) и Трм N202K (синяя кривая). Концентрация белка– 1 мг/мл, скорость прогрева– 1°C/мин. На нижнем плоте представлены первые производные от зависимостей, представленных на верхнем плоте. Хорошо видно, что вносимые аминокислотные замены не оказывают особого влияния на структуру Трм.

Также мы исследовали влияние замен R133W и N202K в Трм 2.2 на взаимодействие Трм с F-актином методом соосаждения. Результаты этих экспериментов

показали, что обе эти замены существенно снижают сродство Трм к F-актину (рис. 52), причем особенно ярко этот эффект проявляется в случае замены R133W: значение концентрации Трм, необходимой для полунасыщения актинового филамента молекулами Трм, практически в 3 раза превышает в этом случае значение, наблюдаемое для препарата Трм WT. Стоит заметить, что наблюдаемые изменения сродства Трм к F-актину, вызываемые заменами N202K и R133W, в какой-то степени соответствуют фенотипическим проявлениям заболеваний, вызываемых соответствующими мутациями. Так, в случае аминокислотной замены R133W удастся обнаружить структурные изменения в тонком филаменте [123], что определенно может сопровождаться уменьшением сродства Трм к актину, в то время как для замены N202K подобных изменений не наблюдается и она, в свою очередь, приводит к менее значительному снижению сродства Трм к актину (рис. 52). Стоит отметить, что обе эти аминокислотные замены расположены близко к аминокислотным остаткам в Трм, участвующим во взаимодействии с актином [76], и поэтому локальные изменения, вносимые этими заменами в структуру Трм, могут нарушать взаимодействие Трм с актиновым филаментом.

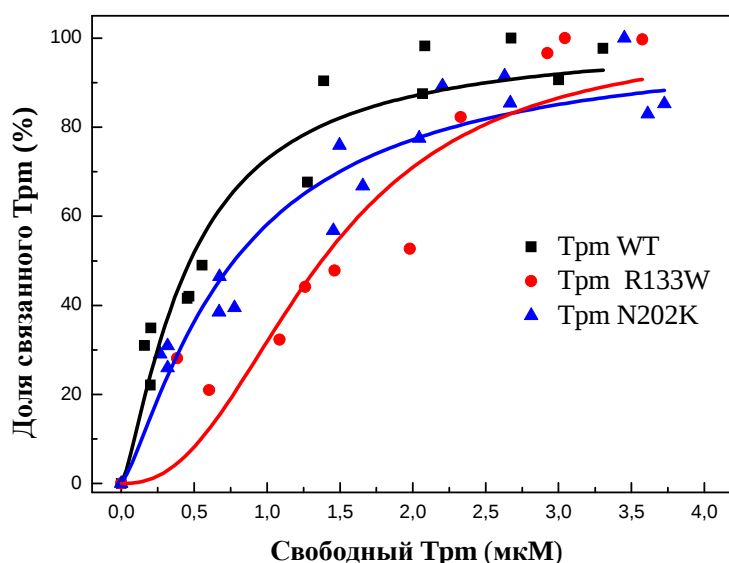


Рис. 52. Зависимость насыщения F-актина молекулами Трм от концентрации свободного Трм, полученная методом соосаждения Трм с F-актином. Зависимости представлены для препаратов Трм WT (черная кривая), Трм R133W (красная кривая) и Трм N202K (синяя кривая). Концентрация Трм, при которой насыщение F-актина молекулами Трм достигало 50% ($K_{50\%}$), составила $0,47 \pm 0,05$ μM для Трм WT, $0,77 \pm 0,07$ μM для Трм N202K и $1,37 \pm 0,13$ для Трм R133W (значения $K_{50\%}$ приведены как средние из 3 экспериментов $\pm$ SD).

Не менее яркие результаты были получены при исследованиях стабильности комплексов Трм с F-актином, образуемых препаратами Трм с заменами R133W и N202K. Результаты этих экспериментов показали, что аминокислотная замена N202K в Трм не

оказывает влияния на стабильность таких комплексов (рис. 53). Температурная зависимость диссоциации комплекса Трм N202K с F-актином не отличалась от зависимости для Трм WT; значения T_{diss} составляли 43°C для Трм WT и 42.9°C для Трм N202K, соответственно. Совершенно иная картина наблюдалась для Трм с заменой R133W, который диссоциировал с поверхности актиновых филаментов при значительно более низкой температуре ($T_{\text{diss}} = 40.7^\circ\text{C}$), чем Трм WT и Трм N202K (рис. 53). Таким образом, в этих экспериментах нам удалось обнаружить заметную разницу между эффектами двух миопатических мутаций в Трм, R133W и N202K, из которых только одна (R133W) заметно снижала стабильность комплексов Трм с F-актином. Стоит обратить внимание на температуру диссоциации Трм R133W с поверхности актинового филамента, т.к. она находится в пределах физиологических значений. Так, повышение температуры тела до 40°C может в этом случае приводить к диссоциации Трм с поверхности актинового филамента, что, в свою очередь, может приводить к образованию участков актинового филамента, не содержащих Трм. Можно предположить, что подобные участки могут быть подвержены действию актин-связывающих белков, дестабилизирующих актиновый филамент и приводящих к его разборке, тем самым делая возможным появление «кэп» структур, наблюдаемых при этом заболевании, ассоциированном с мутацией R133W в гене TPM2.

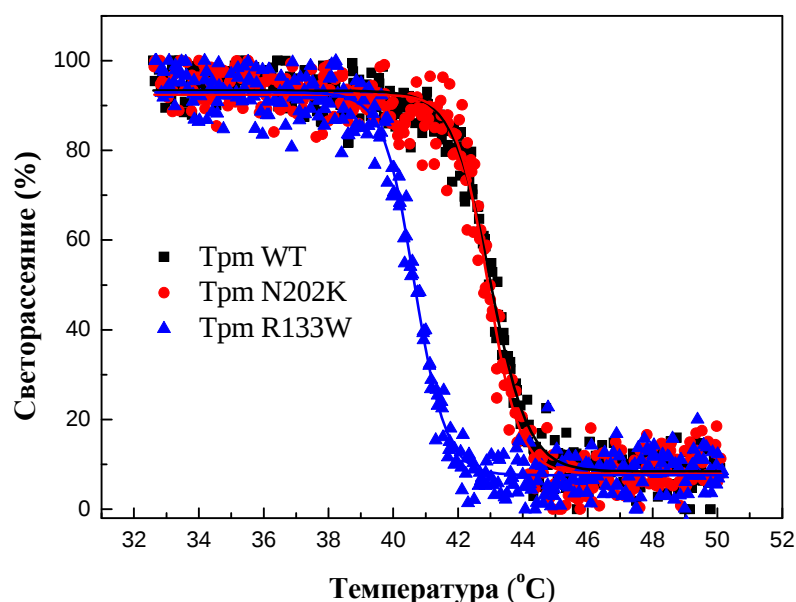


Рис. 53. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трм с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Приведены данные для Трм WT (черная кривая), Трм N202K (красная кривая) и Трм R133W (синяя кривая). Концентрация F-актина составляла 20 μM , Трм – 10 μM . Скорость прогрева – 1 $^\circ\text{C}/\text{мин}$. Температура диссоциации (T_{diss}), т.е. та температура, при которой интенсивность светорассеяния снижалась на 50%, составила $43 \pm 0,04^\circ\text{C}$ для Трм WT, $42,9 \pm 0,02^\circ\text{C}$ для Трм N202K и $40,6 \pm 0,03^\circ\text{C}$ для Трм R133W (значения T_{diss} приведены как средние из четырех экспериментов $\pm$ SD).

Таким образом, эти результаты также кажутся интересными в контексте фенотипических проявлений, ассоциированных с мутациями R133W и N202K. Снова лишь одна из исследуемых аминокислотных замен, R133W, приводит к существенным изменениям в стабильности комплекса Трп с F-актином, что может иметь некоторое отношение к тем изменениям в тонком филаменте, которые наблюдались при проявлении соответствующего наследственного заболевания. [123]

Весьма интересные результаты были также получены в экспериментах, проведенных в ИПС при изучении функциональных свойств препаратов Трп с аминокислотными заменами, вызванными миопатическими мутациями R133W и N202K. Так, было показано, что обе эти аминокислотные замены резко снижают скорость скольжения реконструированных тонких филаментов, содержащих Трп с этими заменами. Максимальная скорость скольжения в этих экспериментах для препаратов Трп с аминокислотными заменами R133W и N202K составила 2,0–2,6 мкм/сек, т.е. была в 2 раза ниже, чем у филаментов, содержащих Трп WT (5,2 мкм/сек) (Таблица 6).

Таблица 6. Значения максимальной скорости скольжения в ИПС при высоких концентрациях кальция (pCa 4), полученные для реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и различные препараты Трп – Трп с аминокислотными заменами R133W и N202K, а также контрольный Трп WT. Для каждого из исследуемых препаратов Трп представлены средние значения максимальной скорости скольжения ($V_{\max}$), полученные из 2–3 серий экспериментов, и стандартные отклонения от этих значений.

Препарат Трп	$V_{\max}$ (мкм/с) $\pm$ SD
Трп 2.2 WT	5,20 $\pm$ 0,40
Трп 2.2 с заменой N202K	2,08 $\pm$ 0,23
Трп 2.2 с заменой R133W	2,66 $\pm$ 0,025

Снижение скорости перемещения тонких филаментов в ИПС может иметь физиологическое значение, т.к. оно неплохо соотносится с мышечной слабостью, наблюдаемой при наследственных заболеваниях, ассоциированных с рассматриваемыми мутациями. Так, можно предположить, что снижение скорости перемещения тонкого филамента в саркомере может приводить к недостаточно быстрому сокращению скелетной мускулатуры, что, в конечном итоге, может приводить к слабости и быстрой утомляемости мышцы. Стоит также отметить, что эффект, обнаруженный в ИПС для препарата Трп с заменой N202K, является пока единственной особенностью этого препарата, отличающей его от Трп WT. Это также неплохо соотносится с фенотипом заболевания – дистального артрогриппоза. Кажется вполне логичным, что заболевание,

которое не имеет яркого фенотипического проявления, не сопровождается нарушением взаимодействия Трп с F-актином, однако приводит к изменениям регулируемого тропомиозином взаимодействия головок миозина с актиновым филаментом, лежащего в основе мышечного сокращения.

В завершение этого раздела хотелось бы отметить, что полученные результаты вряд ли способны детально объяснить механизм развития миопатий. Тем не менее, в результате проведенных экспериментов обнаружены различия в функциональных свойствах между препаратами Трп с заменами R133W и N202K, что может хотя бы отчасти объяснить различия в фенотипических проявлениях двух разных типов наследственных заболеваний мышц («кэповым заболеванием» и дистальным артрогриппозом 2В типа), вызываемых соответствующими мутациями в гене TPM2.

3.3. Исследования гетеродимеров и гомодимеров Трп с аминокислотными заменами в одной из двух цепей молекулы.

В данной работе исследования проводились с использованием двух изоформ Трп – Трп 1.1 (α -Трп) и Трп 2.2 (β -Трп). Использование именно этих изоформ обусловлено тем, что они являются основными изоформами быстрых скелетных мышц и поэтому могут служить идеальными объектами для исследования изменений в структуре и функциональных (в т.ч. и регуляторных) свойствах Трп, вызываемых аминокислотными заменами в его молекуле. Существенным отличием описанных ниже экспериментов от всех тех, которые были описаны в предыдущих разделах, является то, что они были выполнены как на $\alpha\beta$ -гетеродимерах Трп, несущих аминокислотные замены лишь в одной из двух цепей (либо в α -цепи, либо в β -цепи), так и на $\alpha\alpha$ -гомодимерах Трп с аминокислотными заменами лишь в одной из двух α -цепей молекулы Трп. Как уже отмечалось в соответствующей главе обзора литературы, образование $\alpha\beta$ -гетеродимеров и $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп с аминокислотными заменами лишь в одной из цепей наблюдается непосредственно в мышечной ткани. Кроме того, $\alpha\beta$ -гетеродимеры составляют значительную часть от всего Трп в мышце, а образование $\alpha\alpha$ -гомодимеров с аминокислотными заменами лишь в одной из цепей вполне может наблюдаться при патологиях в сердечной мышце. Образование таких молекул может, видимо, существенным образом изменять свойства Трп; именно это мы и решили проверить в экспериментах, приведенных в данной главе диссертации.

Структурно-функциональные исследования $\alpha\beta$ -гетеродимеров Trp с аминокислотными заменами в α -цепи и $\alpha\alpha$ -гомомодимеров Trp с заменами лишь в одной из двух α -цепей.

Для этих исследований мы снова решили использовать аминокислотные замены, расположенные в центральной части молекулы Trp 1.1 (G126R, D137L и G126R/D137L). Выбор данных объектов исследования не случаен. Дело в том, что, во-первых, структурные и функциональные свойства $\alpha\alpha$ -гомомодимеров Trp, несущих такие замены в обеих цепях молекулы, были нами уже всесторонне изучены (см. главу 3.1), что, на наш взгляд могло существенно упростить интерпретацию данных, полученных на $\alpha\beta$ -гетеродимерах и $\alpha\alpha$ -гомомодимерах Trp с аминокислотными заменами лишь в одной из цепей. Во-вторых, данные замены одновременно в двух цепях $\alpha\alpha$ -гомомодимеров Trp демонстрировали очень яркие эффекты на их структуру и функциональные свойства, что могло способствовать получению не менее ярких данных для $\alpha\beta$ -гетеродимеров и $\alpha\alpha$ -гомомодимеров Trp с такими заменами лишь в одной из цепей. И, наконец, в-третьих, было интересно оценить, вызваны ли структурные и функциональные эффекты стабилизации центральной части молекулы Trp исключительно одновременным и согласованным действием этих аминокислотных замен сразу в двух цепях молекулы или для их проявления достаточно введения этих замен только в одну из двух цепей.

Перед тем как перейти непосредственно к описанию полученных результатов, надо отметить, что в качестве α -изоформы Trp WT во всех экспериментах мы использовали препарат Trp с заменой C190A. Это было нужно для того, чтобы избежать образования дисульфидной связи между остатками Cys190 в двух цепях димера Trp, которое могло существенно сказаться на результатах исследования (в норме Trp в клетке присутствует в восстановленном состоянии [179,180]).

В начале наших исследований мы оценили стабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров Trp, полученных из β -Trp и α -Trp C190A, не несущего стабилизирующих аминокислотных замен в центральной части. В результате экспериментов, проведенных методом КД, было установлено, что термостабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров Trp заметно выше, чем у $\beta\beta$ -гомомодимеров, но при этом несколько (хотя и незначительно) ниже, чем у $\alpha\alpha$ -гомомодимеров (рис. 54). Кроме того, $\alpha\beta$ -гетеродимеры обладают собственными уникальными свойствами, отличающими их от $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомомодимеров Trp, что видно из сравнения кривых плавления $\alpha\beta$ -гетеродимеров (синяя кривая на рис 54Б) и эквимольярной смеси $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомомодимеров, (красная кривая на рис. 54Б). Хорошо видно, что красная кривая является суперпозицией двух кривых, соответствующих плавлению $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомомодимеров Trp (черная и зеленая

кривые рис. 54Б), в то время как синяя кривая, соответствующая плавлению $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трт, лишена низкотемпературного плеча, отражающего плавление $\beta\beta$ -гомомеров (рис.54Б). Стоит заметить, что эти данные находятся в хорошем соответствии с результатами, полученными ранее в лаборатории М. Дживса (M. Geeves) [156].

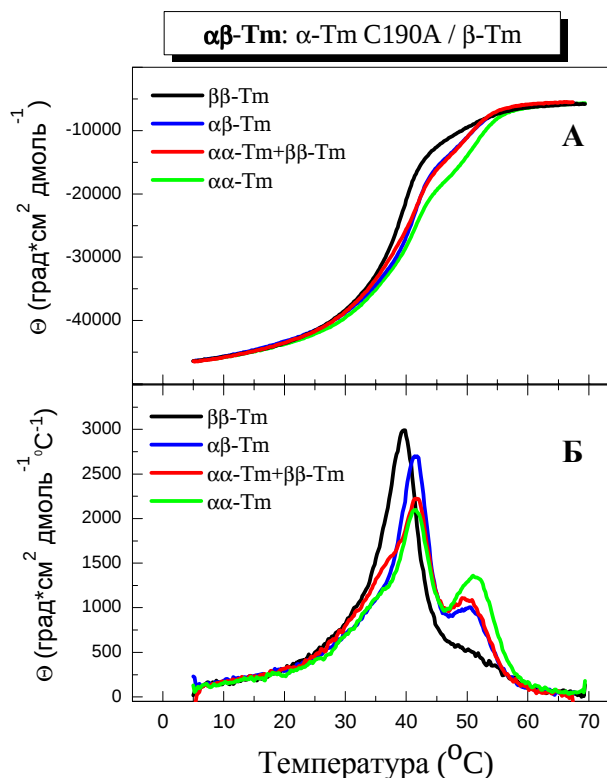


Рис. 54. (А) – Температурные зависимости молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для $\alpha\alpha$ -гомомеров Трт С190А (зеленая кривая), $\beta\beta$ -гомомеров Трт (черная кривая) $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трт (синяя кривая) и эквимольной смеси $\alpha\alpha$ -гомомеров Трт С190А и $\beta\beta$ -гомомеров (красная кривая). Концентрация белка – 1 мг/мл, скорость прогрева – 1°C/мин. (Б) – Первые производные от зависимостей, представленных на (А).

Однако отличия $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трт 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. 55). 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 Трт стабилизируют не только $\alpha\alpha$ -гомомеры Трт, но и $\alpha\beta$ -гетеродимеры.

Аналогичные результаты были получены для препаратов $\alpha\alpha$ -гомомеров Трт с аминокислотными заменами только в одной из цепей молекулы. Термостабильность $\alpha\alpha$ -гомомеров Трт, несущих замены D137L/G126R в центральной части лишь одной из

двух α -цепей, существенно выше, чем у $\alpha\alpha$ -гомодимеров, не несущих таких замен, но при этом все-таки заметно ниже, чем у $\alpha\alpha$ -гомодимеров, несущих эти замены в обеих α -цепях (рис. 56). Таким образом, эти замены стабилизируют $\alpha\alpha$ -гомодимеры Trp даже тогда, когда они расположены лишь в одной из двух α -цепей (хотя и в меньшей степени, чем в случае $\alpha\alpha$ -гомодимеров, несущих эти замены в обеих цепях молекулы Trp).

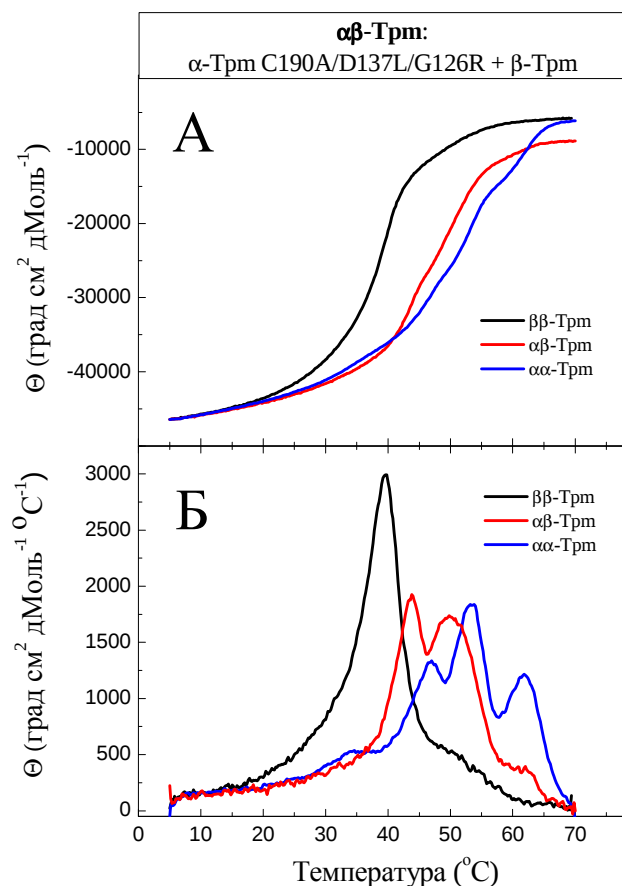


Рис. 55. (А) Температурные зависимости молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для $\alpha\alpha$ -гомодимеров Trp с заменами C190A/D137L/G126R в обеих α -цепях (синяя кривая), $\beta\beta$ -гомодимеров Trp (черная кривая) и $\alpha\beta$ -гетеродимеров Trp, полученных из α -Trp с заменами C190A/D137L/G126R и β -Trp (красная кривая). Концентрация белка – 1 мг/мл, скорость прогрева – 1°C/мин. (Б) – Первые производные от зависимостей, представленных на (А).

Подобные результаты говорят о том, что стабилизирующий эффект этих аминокислотных замен связан не только с формированием эффективной пары в структуре СС, которое, безусловно, приводит к увеличению стабильности (препараты, содержащие замены одновременно в обеих цепях, были тем не менее стабильнее, чем $\alpha\beta$ -гетеродимеры или $\alpha\alpha$ -гомодимеры с заменами лишь в одной цепи), но, по всей видимости, и о стабилизации структуры самой α -цепи, которая также вносит существенный вклад в общую стабильность молекулы.

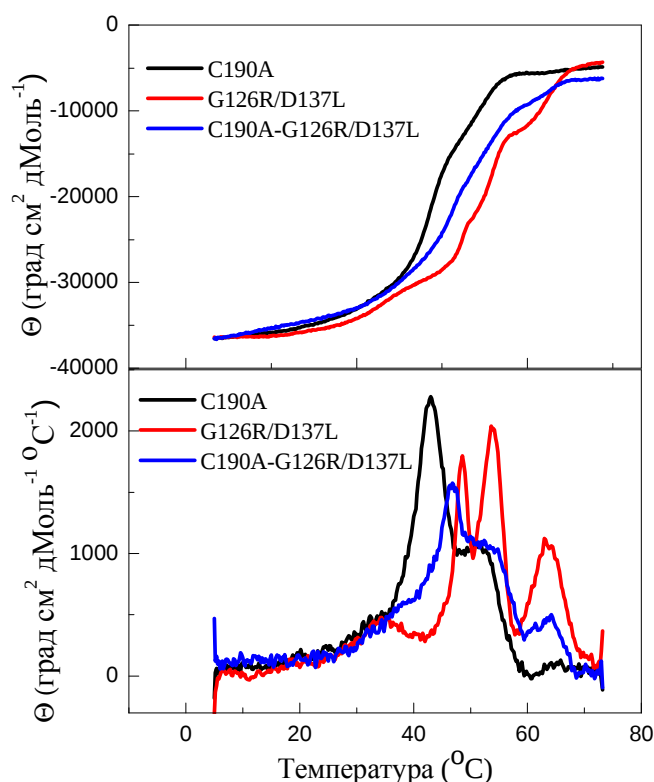


Рис. 56. Сверху – Температурные зависимости молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп C190A (C190A, черная кривая), $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп C190A, несущих замену G126R/D137L в обеих α -цепях (G126R/D137L, красная кривая), и $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп C190A, несущих замену G126R/D137L лишь одной из двух α -цепей (C190A–G126R/D137L, синяя кривая). Концентрация белка – 1 мг/мл, скорость прогрева – 1°C/мин. **Снизу** приведены первые производные от зависимостей, представленных на верхнем поле.

Мы также оценили стабильность комплексов, образуемых $\alpha\beta$ -гетеродимерами Трп с F-актином, анализируя температурные зависимости их диссоциации, регистрируемой по снижению светорассеяния. И в этом случае комплексы, образуемые F-актином с $\alpha\beta$ -гетеродимерами Трп, были более стабильны, чем комплексы с $\beta\beta$ -гомодимерами, но менее стабильны, чем комплексы с $\alpha\alpha$ -гомодимерами. Как и в случае с термостабильностью $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп (рис. 55), этот эффект особенно ярко проявлялся для $\alpha\beta$ -гетеродимеров с заменой D137L/G126R в центральной части α -цепи молекулы (рис. 57). Таким образом, замены D137L, G126R и особенно двойная замена D137L/G126R в центральной части α -цепи Трп стабилизируют комплексы Трп с F-актином не только в случае $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп, но и в случае его $\alpha\beta$ -гетеродимеров. Абсолютно аналогичные результаты были получены для препаратов $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трп с аминокислотными заменами лишь в одной из α -цепей. Результаты этих экспериментов показали, что $\alpha\alpha$ -гомодимеры Трп, несущие замены D137L, G126R или D137L/G126R в центральной части лишь одной из двух α -цепей, диссоциировали с поверхности актиновых филаментов при значительно более высокой температуре, чем контрольный α -Трп C190A, но все-таки при более низкой

температуре, чем $\alpha\alpha$ -гомомеры Трп со стабилизирующими заменами D137L, G126R или D137L/G126R в обеих α -цепях (данные не представлены).

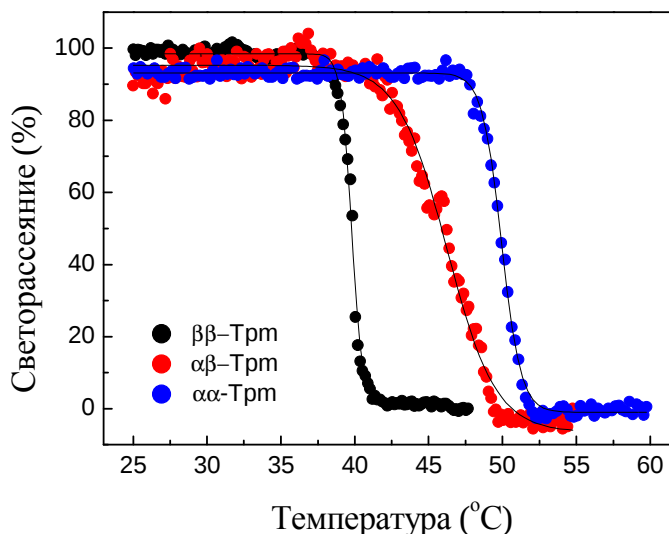


Рис. 57. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трп с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Приведены данные для $\alpha\alpha$ -гомомеров Трп с заменами S190A/D137L/G126R в обеих цепях (синяя кривая), $\beta\beta$ -гомомеров Трп (черная кривая) и $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп, полученных из α -Трп с заменами S190A/D137L/G126R и β -Трп (красная кривая). Концентрация F-актина составляла 20 μ M, Трп – 5 μ M. Скорость прогрева – 1°C/мин.

Наиболее любопытные данные были получены при исследованиях $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп в ИПС. Нам удалось показать, что замены G126R и D137L в α -цепи $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп не только не увеличивают скорость перемещения реконструированных тонких филаментов в этой системе, как это было показано для $\alpha\alpha$ -гомомеров Трп с такими заменами (рис. 33), но, напротив, заметно снижают ее (Таблица 7). Эти данные впервые указывают на то, что $\alpha\beta$ -гетеродимеры Трп могут очень сильно отличаться по своим свойствам от $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомомеров, что делает их чрезвычайно актуальной моделью для изучения наследственных заболеваний мышц, вызываемых мутациями в генах Трп.

Совершенно удивительным также кажется тот факт, что аминокислотные замены в одной из цепей молекулы Трп, которые мало отличаются по характеру их влияния на структуру молекулы от замен в обеих ее цепях (в обоих случаях наблюдается стабилизация молекулы Трп, только несколько более слабая при замене лишь в одной из цепей) (рис. 55, 56), в функциональном плане вызывают совершенно противоположные эффекты (таблица 7). Данное противоречие может объясняться тем, что для эффективного изменения функциональных свойств (к примеру, для увеличения скорости перемещения

тонких филаментов в ИПС) недостаточно аминокислотных замен в одной цепи, т.к. это не приводит к стабилизации всей структуры СС, а лишь увеличивает стабильность одной α -цепи. В то же время стабилизация лишь одной из двух цепей димерной молекулы Трп приводит, видимо, к дополнительному конформационному напряжению в структуре молекулы, изменяя биофизические свойства одной из α -спиралей (ее коформационную лабильность и возможность изгибаться), что в свою очередь приводит к несогласованным изменениям в двух цепях Трп и, в конечном итоге, выражается в противоположном функциональном эффекте (снижение скорости перемещения тонкого филамента в ИПС).

Таблица 7. Значения максимальной скорости скольжения в ИПС ($V_{\max}$) при высоких концентрациях кальция (pCa 4), полученные для реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и различные препараты Трп ($\beta\beta$ -гомодинмеры, $\alpha\alpha$ -гомодинмеры и $\alpha\beta$ -гетеродинмеры с заменами C190A, G126R, D137L и D137L/G126R в α -цепи).

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

В заключение следует отметить, что полученные нами данные наводят на мысль о том, что функциональные свойства $\alpha\beta$ -гетеродинмеров Трп с заменами остатков в α -цепи могут очень сильно отличаться от свойств $\alpha\alpha$ -гомодинмеров Трп с такими заменами – вплоть до того, что функциональные эффекты подобных замен даже могут быть прямо противоположными, приводя к появлению у гетеродинмеров 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 $\beta\beta$ -гомодинмеров Трп с заменами в обеих цепях молекулы. Особенно актуальным представляется в дальнейшем использование гетеродинмеров Трп в качестве наиболее адекватной модели для исследования эффектов аминокислотных замен, вызванных миопатическими мутациями в генах Трп.

Структурно-функциональные исследования $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами в β -цепи.

Аналогично описанным выше экспериментам, проведенным на $\alpha\beta$ -гетеродимерах Трм с заменами лишь в α -цепи, мы решили провести подобные исследования для $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами только в β -цепи. Актуальность данного исследования дополнительно подкрепляется тем фактом, что $\beta\beta$ -гомомодимеры Трм из-за их низкой стабильности практически не встречаются в мышечной ткани. Следовательно, все эффекты мутаций в гене ТРМ2, приводящих к аминокислотным заменам в β -цепи Трм, имеет смысл изучать именно на $\alpha\beta$ -гетеродимерах Трм. Мы исследовали свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами N202K и R133W в β -цепи, поскольку $\beta\beta$ -гомомодимеры Трм с такими заменами в обеих цепях уже использовались нами в этой работе и их свойства были описаны выше (см. рис. 51–53 и таблицу 6).

Прежде всего мы оценили стабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами R133W и N202K в β -цепи методом КД. Оказалось, что они не отличались по стабильности и характеру тепловой денатурации от $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм, полученных из β -Трм WT и α -Трм C190A (см. рис. 54). Таким образом, замены R133W и N202K в β -цепи Трм не оказывают, видимо, заметного влияния на структуру $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм. Это хорошо согласуется с результатами экспериментов, проведенных на $\beta\beta$ -гомомодимерах Трм с такими заменами в обеих цепях одновременно (рис. 51), в которых тоже не наблюдалось значительных структурных эффектов.

Гораздо более интересные данные были получены методом соосаждения Трм с F-актином (рис. 58). В этих экспериментах было показано, что $\beta\beta$ -гомомодимеры Трм обладают значительно более высоким сродством к F-актину, чем $\alpha\alpha$ -гомомодимеры, что хорошо согласуется с литературными данными [156]. Однако сродство к актину для $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм было ниже, чем для $\beta\beta$ -гомомодимеров, но выше, чем для $\alpha\alpha$ -гомомодимеров Трм, что отличается от ранее полученных данных, согласно которым сродство $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм к F-актину было ниже, чем у $\alpha\alpha$ -гомомодимеров [156]. Вполне возможно, что подобные различия могут быть вызваны тем, что в цитируемой работе использовался препарат Трм WT, а в наших экспериментах – препарат Трм с заменой C190A. К сожалению, нами не было изучено, как наличие или отсутствие остатка Cys190 в α -цепи может сказаться на структуре $\alpha\beta$ -гетеродимера Трм; не исключено, например, что в этом случае замена C190A может оказывать большее влияние, чем в случае $\alpha\alpha$ -гомомодимеров Трм с такими заменами в обеих α -цепях, когда не наблюдалось особых изменений в структуре Трм (см. рис. 17–19 и таблицу 3). Кроме того, в

цитируемой работе [156] не указано, в каком состоянии – восстановленном или «сшитом» находились SH-группы молекулы Трм, что может значительным образом сказываться на сродстве Трм к актину.

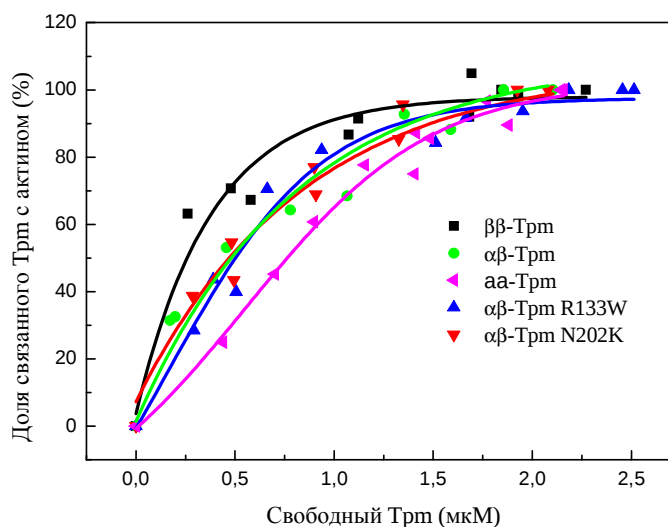


Рис. 58. Зависимость насыщения F-актина молекулами Трм от концентрации свободного Трм, полученная методом соосаждения Трм с F-актином. Зависимости представлены для препаратов ββ-гомомеров Трм (черная кривая), αα-гомомеров Трм С190А (фиолетовая кривая), и для αβ-гетеродимеров Трм без замен в β-цепи (зеленая кривая) или с заменами в β-цепи – R133W (синяя кривая) и N202K (красная кривая). Концентрация Трм, при которой насыщение F-актина молекулами Трм достигало 50% ($K_{50\%}$), составила $0,25 \pm 0,05$ мкМ для ββ-Трм, $0,77 \pm 0,12$ мкМ для αα-Трм и $0,48 \pm 0,15$ для всех препаратов αβ-гетеродимеров Трм (значения $K_{50\%}$ приведены как средние из 3-х экспериментов $\pm$ SD).

Тем не менее, на рис. 58 хорошо видно, что все исследуемые препараты αβ-гетеродимеров Трм связываются с F-актином хуже, чем ββ-гомомеры Трм, но при этом не различаются между собой по сродству к F-актину. Таким образом, аминокислотные замены R133W и N202K не оказывают влияния на сродство αβ-гетеродимеров Трм к F-актину, хотя обе эти замены (особенно R133W) существенно снижают сродство к F-актину ββ-гомомеров Трм (см. рис. 52). По-видимому, взаимодействие α- и β-цепей в αβ-гетеродимерах Трм предотвращает влияние этих замен на связывание Трм с F-актином, которое ярко проявляется в случае ββ-гомомеров. Это говорит о том, что сродство Трм к F-актину не играет, вероятно, ключевой роли в развитии наследственных заболеваний, вызванных заменами R133W и N202K в β-Трм.

Не менее интересные данные были получены при оценке стабильности комплексов, образуемых αβ-гетеродимерами Трм с F-актином. На рисунке 59 представлены температурные зависимости диссоциации различных препаратов Трм с поверхности актинового филамента, регистрируемой по снижению светорассеяния. Хорошо видно, что стабильность комплексов с F-актином для препаратов αα-гомомеров Трм выше чем, для

препаратов $\beta\beta$ -гомомеров, а кривые диссоциации для $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм занимают промежуточное положение, что хорошо согласуется с ранее полученными данными. При этом замены R133W и N202K в β -цепях (красная и синяя кривые на рис. 59) приводили к снижению стабильности комплексов $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с F-актином до уровня $\beta\beta$ -гомомеров Трм (в случае замены N202K) или даже ниже (в случае замены R133W). Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными для $\beta\beta$ -гомомеров Трм с такими заменами (рис. 53). В обоих случаях наблюдается существенная разница в стабильности комплексов с F-актином препаратов Трм с заменами R133W и N202K в β -цепях – как для $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм, так и для $\beta\beta$ -гомомеров. Все это говорит о том, что, в отличие от сродства Трм к F-актину, изменения в стабильности образуемых комплексов, вызываемые заменами R133W и N202K в β -цепях $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм, могут являться одной из причин развития наследственных мышечных заболеваний, ассоциированных с соответствующими мутациями в гене TPM2.

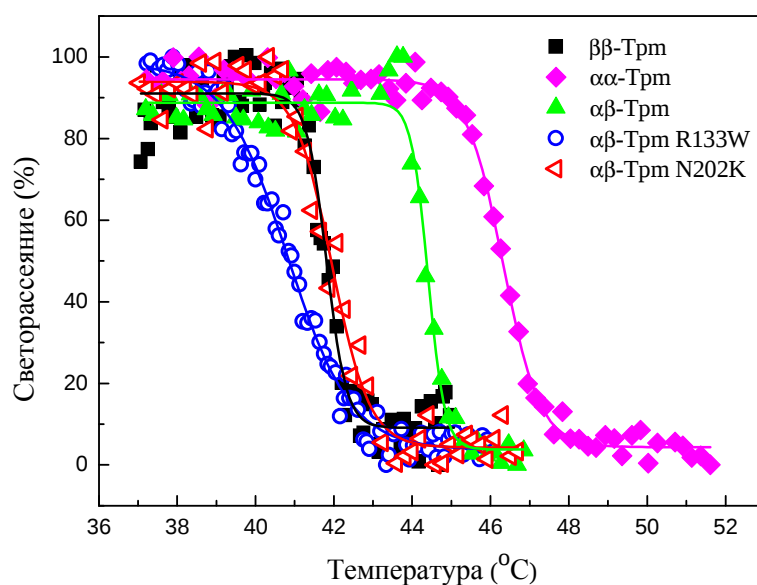


Рис. 59. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трм с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Приведены данные для $\alpha\alpha$ -гомомеров Трм C190A (фиолетовая кривая), $\beta\beta$ -гомомеров Трм (черная кривая) и для $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм без замен в β -цепи (зеленая кривая) или с заменами в β -цепи – R133W (синяя кривая) и N202K (красная кривая). Концентрация F-актина составляла 20 μ M, Трм – 5 μ M. Скорость прогрева – 1°C/мин.

Важные данные были также получены в ИПС при исследованиях влияния аминокислотных замен R133W и N202K в β -цепях $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм на максимальную скорость перемещения реконструированных тонких филаментов, измеряемую при высоких концентрациях кальция (при pCa 4). Оказалось, что как и в

случае $\beta\beta$ -гомодимеров Трп с такими заменами в обеих цепях (таблица 6), аминокислотные замены R133W и N202K в β -цепях $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп также приводят к снижению скорости перемещения в ИПС тонких филаментов, содержащих Трп с этими заменами (таблица 8). Данное снижение скорости наблюдается при сравнении как с $\beta\beta$ - и $\alpha\alpha$ -гомодимерами Трп, так и с $\alpha\beta$ -гетеродимерами, в которых отсутствовали изучаемые нами аминокислотные замены. Стоит отметить, что эти данные также указывают на то, что наблюдаемые в ИПС изменения параметров взаимодействия миозиновых головок с актиновыми филаментами могут лежать в основе патогенеза наследственных заболеваний мышц, т.к. они наблюдаются как для препаратов $\beta\beta$ -гомодимеров Трп с аминокислотными заменами R133W и N202K в обеих цепях, так и для препаратов $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп с этими заменами в β -цепи.

Таблица 8. Значения максимальной скорости скольжения в ИПС при высоких концентрациях кальция (pCa 4), полученные для реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и различные препараты Трп ($\beta\beta$ -гомодимеры, $\alpha\alpha$ -гомодимеры и $\alpha\beta$ -гетеродимеры с аминокислотными заменами R133W и N202K в β -цепи Трп). Для каждого из исследуемых препаратов Трп представлены средние значения максимальной скорости скольжения ($V_{\max}$), полученные из 2–3 серий экспериментов, и стандартные отклонения от этих значений.

Препараты Трп	$V_{\max}$ ($\mu\text{m/s}$) $\pm$ SD
$\beta\beta$ -Трп	$5,20 \pm 0,40$
$\alpha\alpha$ -Трп	$4,5 \pm 0,18$
$\alpha\beta$ -Трп (β -Трп – α -Трп C190A)	$5,52 \pm 0,41$
$\alpha\beta$ -Трп (β -Трп R133W – α -Трп C190A)	$3,23 \pm 0,46$
$\alpha\beta$ -Трп (β -Трп N202K – α -Трп C190A)	$2,63 \pm 0,41$

В заключение следует отметить, что полученные нами данные свидетельствуют о том, что изучение миопатических мутаций, приводящих к точечным аминокислотным заменам в структуре β -Трп, следует проводить только на препаратах $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп, т.к. полученные на них данные могут отличаться от тех, которые получены на $\beta\beta$ -гомодимерах Трп, отсутствующих в мышечной ткани.

Заключение

Результаты наших исследований расширяют представления о функционировании молекулы Трп и осуществляемой им регуляции мышечного сокращения как в норме, так и при патологиях. Так, в нашей работе была подробно изучена роль центральной части молекулы Трп в функционировании Трп. Нами было показано, что стабилизация центральной части Трп аминокислотными заменами G126R и D137L приводит к структурным изменениям не только в центре молекулы, но и распространяется на все другие ее части. Кроме того, подобные изменения находят отражение не только в изменении структуры Трп, но и всего тонкого филамента, увеличивая его жесткость. Особое внимание в нашей работе было уделено изменениям функциональных свойств Трп, вызванных стабилизацией центральной части его молекулы, т.к. до этого не было понятно, какое значение имеет такая дестабилизация в функционировании Трп. Так, было показано, что стабилизация центральной части Трп влияет на чувствительность тонкого филамента к ионам кальция, снижает скорость и степень релаксации миофибрилл, а также изменяет параметры взаимодействия миозина с актиновым филаментом. Все изменения, которые нам удалось обнаружить, так или иначе касались регуляции взаимодействия миозиновых головок с поверхностью актинового филамента, лежащего в основе молекулярного механизма мышечного сокращения. Таким образом, все выше перечисленное позволяет заключить, что дестабилизация молекулы Трп, вызываемая неканоническими аминокислотными остатками, расположенными в ее центральной части, необходима для тонкой регуляции мышечного сокращения в физиологическом диапазоне концентраций кальция.

Другая часть нашей работы была посвящена изучению мутаций в генах Трп, приводящих к точечным аминокислотным заменам в структуре молекулы Трп. Так, в ходе выполнения работы нами было накоплено большое количество данных о влиянии кардиомиопатических мутаций в генах Трп на структуру и свойства его молекулы, которые, как нам кажется, 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 Трп такими мутациями, обладала своими индивидуальными характеристиками, что, по-видимому, говорит о многообразии причин и механизмов развития кардиомиопатий. Также 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. Еще хотелось бы отметить, что помимо изучения кардиомиопатических мутаций нами были также получены новые данные о влиянии на структуру и свойства Трм двух аминокислотных замен – R133W и N202K, вызываемых мутациями в гене TPM2, ассоциированными с развитием тяжелых наследственных заболеваний скелетных мышц. В результате этих исследований были получены данные, которые впервые указывают на серьезные различия в функциональных свойствах между препаратами Трм с заменами R133W и N202K, что может хотя бы отчасти объяснить различия в фенотипических проявлениях двух разных типов наследственных заболеваний скелетных мышц, вызываемых соответствующими мутациями в гене TPM2.

Наконец, в ходе выполнения работы были изучены свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров и $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трм с аминокислотными заменами лишь в одной из двух цепей молекулы. Получены данные, которые впервые наводят на мысль о том, что функциональные свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров или гомодимеров Трм с заменами остатков только в одной из двух цепей димера Трм (α - или β -цепи) могут очень сильно отличаться от свойств $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеров Трм с такими заменами в обеих цепях – вплоть до того, что функциональные эффекты подобных замен даже могут быть прямо противоположными, приводя к появлению совершенно новых свойств у молекул Трм с заменой лишь в одной цепи. Это в дальнейшем необходимо учитывать при исследованиях влияния различных аминокислотных замен в Трм на его свойства, которые до настоящего времени проводились почти исключительно с использованием $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеров Трм с заменами в обеих цепях молекулы. Особенно актуальным представляется в дальнейшем использование гетеродимеров Трм в качестве наиболее адекватной модели для исследования эффектов аминокислотных замен, вызванных миопатическими мутациями в генах Трм.

Полученные результаты исследований позволяют сделать следующие **выводы**:

- 1) Показано, что замены неканонических остатков Asp137 и Gly126 в центральной части молекулы Трм 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 Тpm существенно увеличивает изгибную жесткость тонкого филамента (актинового филамента, содержащего тропомиозин и тропонин).
- 3) Стабилизация молекулы Тpm 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 Тpm оказывают заметное влияние на функциональные свойства рекомбинантных препаратов Тpm, 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 Тpm, так и $\alpha\alpha$ -гомодимеры, 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 используемой литературы

1. Gunning, P., O'Neill, G., Hardeman, E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space // *Physiological Reviews*. – 2008. – V. 88, No 1. – P. 35.
2. Schevzov, G., Vrhovski, B., Bryce, N. S., Elmir, S., Qiu, M. R., O'Neill G, M., Yang, N., Verrills, N. M., Kavallaris, M., Gunning, P. W. Tissue-specific tropomyosin isoform composition // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. – 2005. – V. 53. – P. 557-570.
3. Gunning, P., Gordon, M., Wade, R., Gahlmann, R., Lin, C. S., Hardeman, E. Differential control of tropomyosin mRNA levels during myogenesis suggests the existence of an isoform competition-autoregulatory compensation control mechanism // *Developmental Biology*. – 1990. – V. 138. – P. 443-453.
4. Schevzov, G., Kee, A. J., Wang, B., Sequeira, V. B., Hook, J., Coombes, J. D., Lucas, C. A., Stehn, J. R., Musgrove, E. A., Cretu, A., Assoian, R., Fath, T., Hanoch, T., Seger, R., Pleines, I., Kile, B. T., Hardeman, E. C., Gunning, P. W. Regulation of cell proliferation by ERK and signal-dependent nuclear translocation of ERK is dependent on Tm5NM1-containing actin filaments // *Molecular Biology of the Cell*. – 2015. – V. 26. – P. 2475-2490.
5. Grieshaber, N. A., Ko, C., Grieshaber, S. S., Ji, I., Ji, T. H. Follicle-stimulating hormone-responsive cytoskeletal genes in rat granulosa cells: class I beta-tubulin, tropomyosin-4, and kinesin heavy chain // *Endocrinology*. – 2003. – V. 144. – P.29-39.
6. Weinberger, R. P., Henke, R. C., Tolhurst, O., Jeffrey, P. L., Gunning, P. Induction of neuron-specific tropomyosin mRNAs by nerve growth factor is dependent on morphological differentiation // *The Journal of Cell Biology*. – 2003. – V. 120. – P. 205-215.
7. Novy, R. E., Lin, J. L., Lin, C. S., Lin, J. J. Human fibroblast tropomyosin isoforms: characterization of cDNA clones and analysis of tropomyosin isoform expression in human tissues and in normal and transformed cells // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 1993. – V. 25. – P. 267-281.
8. Thoms, J. A., Loch, H. M., Bamberg, J. R., Gunning, P. W., Weinberger, R. P. A tropomyosin 1 induced defect in cytokinesis can be rescued by elevated expression of cofilin // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2008. – V. 65. – P. 979-990.

9. Dalby-Payne, J. R., O'Loughlin, E. V., Gunning, P. Polarization of specific tropomyosin isoforms in gastrointestinal epithelial cells and their impact on CFTR at the apical surface // *Molecular Biology of the Cell*. – 2003. – V.14. – P. 4365-4375.
10. Pelham, R. J., Jr., Lin, J. J., Wang, Y. L. A high molecular mass non-muscle tropomyosin isoform stimulates retrograde organelle transport // *Journal of Cell Science*. – 1996. – V. 109 (Pt 5). – P. 981-989.
11. Pruyne, D. W., Schott, D. H., Bretscher, A. Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast // *The Journal of Cell Biology*. – 1998. – V. 143. – P. 1931-1945.
12. Ralphs, J. R., Waggett, A. D., Benjamin, M. Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro // *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. – 2002. – V. 21. – P. 67-74.
13. McMichael, B. K., Lee, B. S. Tropomyosin 4 regulates adhesion structures and resorptive capacity in osteoclasts // *Experimental Cell Research*. – 2008. – V. 314. – P. 564-573.
14. O'Neill, G. M. The coordination between actin filaments and adhesion in mesenchymal migration // *Cell Adhesion and Migration*. – 2009. – V. 3. – P. 355-357.
15. Caldwell, B. J., Lucas, C., Kee, A. J., Gaus, K., Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Yap, A. S., Gomez, G. A. Tropomyosin isoforms support actomyosin biogenesis to generate contractile tension at the epithelial zonula adherens // *Cytoskeleton*. – 2014. – V. 71. – P. 663-676.
16. al-Khayat, H. A., Yagi, N., Squire, J. M. Structural changes in actin-tropomyosin during muscle regulation: computer modelling of low-angle X-ray diffraction data // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 252. – P. 611-632.
17. Craig, R., Lehman, W. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – V. 311. – P. 1027-1036.
18. Bacchiocchi, C., Lehrer, S. S. Ca(2+)-induced movement of tropomyosin in skeletal muscle thin filaments observed by multi-site FRET // *Biophysical Journal*. – 2002. – V. 82. – P. 1524-1536.

19. McKillop, D. F., Geeves, M. A. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament // *Biophysical Journal*. – 1993. – V. 65. – P. 693-701.
20. Khaitlina, S. Y. Tropomyosin as a Regulator of Actin Dynamics // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2015. – V. 318. – P. 255-291.
21. Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P., Mulvihill, D. P. Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton // *Journal of Cell Science*. – 2015. – V. 128. – P. 2965-2974.
22. Manstein, D. J., Mulvihill, D. P. Tropomyosin-Mediated Regulation of Cytoplasmic Myosins // *Traffic*. – 2016. – V. 17. – P. 872-877.
23. Kawamura, M., Maruyama, K. Electron microscopic particle length of F-actin polymerized in vitro // *Journal of Biochemistry*. – 1970. – V. 67. – P. 437-457.
24. Goldmann, W. H. Binding of tropomyosin-troponin to actin increases filament bending stiffness // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2000. – V. 276. – P. 1225-1228.
25. Kojima, H., Ishijima, A., Yanagida, T. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation // *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. – 1994. – V. 91. – P. 12962-12966.
26. Broschat, K. O. Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – P. 21323-21329.
27. Weigt, C., Schoepper, B., Wegner, A. Tropomyosin-troponin complex stabilizes the pointed ends of actin filaments against polymerization and depolymerization, // *FEBS Letters*. – 1990. – V. 260. – P. 266-268.
28. Wawro, B., Greenfield, N. J., Wear, M. A., Cooper, J. A., Higgs, H. N., Hitchcock-DeGregori, S. E. Tropomyosin regulates elongation by formin at the fast-growing end of the actin filament // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – P. 8146-8155.
29. Maciver, S. K., Ternent, D., McLaughlin, P. J. Domain 2 of gelsolin binds directly to tropomyosin // *FEBS Letters*. – 2000. – V. 473. – P. 71-75.
30. Watson, M. H., Kuhn, A. E., Novy, R. E., Lin, J. J., Mak, A. S. Caldesmon-binding sites on tropomyosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – P. 18860-18866.
31. Kostyukova, A. S., Choy, A., Rapp, B. A. Tropomodulin binds two tropomyosins: a novel model for actin filament capping // *Biochemistry*. – 2006. – V. 45. – P. 12068-12075.

32. Kimura-Sakiyama, C., Ueno, Y., Wakabayashi, K., Miki, M. Fluorescence resonance energy transfer between residues on troponin and tropomyosin in the reconstituted thin filament: modeling the troponin-tropomyosin complex // *Journal of Molecular Biology*. – 2008. – V. 376. – P. 80-91.
33. Blanchoin, L., Pollard, T. D., Hitchcock-DeGregori, S. E. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin // *Current biology: CB*. – 2001. – V. 11. – P. 1300-1304.
34. Ono, S., Ono, K. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics // *The Journal of Cell Biology*. – 2002. – V. 156. – P. 1065-1076.
35. Lees, J. G., Bach, C. T., O'Neill, G. M. Interior decoration: tropomyosin in actin dynamics and cell migration // *Cell Adhesion and Migration*. – 2011. – V. 5. – P. 181-186.
36. Bach, C. T., Schevzov, G., Bryce, N. S., Gunning, P. W., O'Neill, G. M. Tropomyosin isoform modulation of focal adhesion structure and cell migration // *Cell Adhesion and Migration*. – 2010. – V. 4. – P. 226-234.
37. Dube, S., Yalamanchili, S., Lachant, J., Abbott, L., Benz, P., Mitschow, C., Dube, D. K., Poiesz, B. J. Expression of Tropomyosin 1 Gene Isoforms in Human Breast Cancer Cell Lines // *International Journal of Breast Cancer*. – 2015. – P. 859427.
38. Lees-Miller, J. P., Helfman, D. M. The molecular basis for tropomyosin isoform diversity // *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. – 1991. – V. 13. – P. 429-437.
39. Geeves, M. A., Hitchcock-DeGregori, S. E., Gunning, P. W. A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2015. – V. 36. – P. 147-153.
40. Невзоров И. А., Левицкий Д. И. Тропомиозин: двойная спираль из мира белков. // *Успехи биологической химии*. – 2011. – С. 283-334.
41. Oe, M., Ohnishi-Kameyama, M., Nakajima, I., Muroya, S., Chikuni, K. Muscle type specific expression of tropomyosin isoforms in bovine skeletal muscles // *Meat science*. – 2007. – V. 75. – P. 558-563.
42. Pieples, K., Wieczorek, D. F. Tropomyosin 3 increases striated muscle isoform diversity // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P. 8291-8297.
43. Lehrer, S. S., Stafford, W. F., 3rd. Preferential assembly of the tropomyosin heterodimer: equilibrium studies // *Biochemistry*. – 1991. – V. 30. – P. 5682-5688.

44. Hvidt, S., Lehrer, S. S. Thermally induced chain exchange of frog alpha beta-tropomyosin // *Biophysical Chemistry*. – 1992. – V. 45. – P. 51-59.
45. Muthuchamy, M., Pajak, L., Howles, P., Doetschman, T., Wieczorek, D. F. Developmental analysis of tropomyosin gene expression in embryonic stem cells and mouse embryos // *Molecular and Cellular Biology*. – 1993. – V. 13. – P. 3311-3323.
46. Muthuchamy, M., Grupp, I. L., Grupp, G., O'Toole, B. A., Kier, A. B., Boivin, G. P., Neumann, J., Wieczorek, D. F. Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270. – P. 30593-30603.
47. Perry, S. V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2001. – V. 22. – P. 5-49.
48. Mason, J. M., Arndt, K. M. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications // *Chembiochem*. – 2004. – V. 5. – P. 170-176.
49. Zhou, N. E., Kay, C. M., Hodges, R. S. The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded alpha-helical coiled-coils // *Journal of Molecular Biology*. – 1994. – V. 237. – P. 500-512.
50. Barua, B., Winkelmann, D. A., White, H. D., Hitchcock-DeGregori, S. E. Regulation of actin-myosin interaction by conserved periodic sites of tropomyosin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2012. – V. 109. – P. 18425-18430.
51. Mak, A. S., Smillie, L. B. Non-polymerizable tropomyosin: preparation, some properties and F-actin binding // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1981. – V. 101. – P. 208-214.
52. Dabrowska, R., Nowak, E., Drabikowski, W. Some functional properties of nonpolymerizable and polymerizable tropomyosin // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1983. – V. 4. – P. 143-161.
53. Whitby, F. G., Phillips, G. N., Jr. Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution // *Proteins*. – 2000. – V. 38. – P. 49-59.
54. Brown, J. H., Kim, K. H., Jun, G., Greenfield, N. J., Dominguez, R., Volkmann, N., Hitchcock-DeGregori, S. E., Cohen, C. Deciphering the design of the tropomyosin molecule // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2001. – V. 98. – P. 8496-8501.

55. Kwok, S. C., Hodges, R. S. Clustering of large hydrophobes in the hydrophobic core of two-stranded alpha-helical coiled-coils controls protein folding and stability // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – P. 35248-35254.
56. Kwok, S. C., Hodges, R. S. Stabilizing and destabilizing clusters in the hydrophobic core of long two-stranded alpha-helical coiled-coils // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – P. 21576-21588.
57. Li, X. E., Lehman, W., Fischer, S., Holmes, K. C. Curvature variation along the tropomyosin molecule // *Journal of Structural Biology*. – 2010. – V. 170. – P. 307-312.
58. Li, X. E., Lehman, W., Fischer, S. The relationship between curvature, flexibility and persistence length in the tropomyosin coiled-coil // *Journal of Structural Biology*. – 2010. – V. 170. – P. 313-318.
59. Holmes, K. C., Lehman, W. Gestalt-binding of tropomyosin to actin filaments // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2008. V/ 29. – P. 213-219.
60. Li, X. E., Holmes, K. C., Lehman, W., Jung, H., Fischer, S. The shape and flexibility of tropomyosin coiled coils: implications for actin filament assembly and regulation // *Journal of Molecular Biology*. – 2010. – V. 395. – P. 327-339.
61. Lehman, W., Orzechowski, M., Li, X. E., Fischer, S., Raunser, S. Gestalt-binding of tropomyosin on actin during thin filament activation // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2013. – V. 34. – P. 155-163.
62. Brown, J. H., Zhou, Z., Reshetnikova, L., Robinson, H., Yammani, R. D., Tobacman, L. S., Cohen, C. Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2005. – V. 102. – P. 18878-18883.
63. Nitnai, Y., Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Maeda, Y. Crystal structures of tropomyosin: flexible coiled-coil // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2007. – V. 592. – P. 137-151.
64. Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Wakabayashi, K., Nitnai, Y., Maeda, Y. Two-crystal structures of tropomyosin C-terminal fragment 176-273: exposure of the hydrophobic core to the solvent destabilizes the tropomyosin molecule // *Biophysical Journal*. – 2008. – V. 95. – P. 710-719.
65. Warren, R. H. TGF-alpha-induced breakdown of stress fibers and degradation of tropomyosin in NRK cells is blocked by a proteasome inhibitor // *Experimental Cell Research*. – 1997. – V/ 236. – P. 294-303.

66. Hitchcock-DeGregori, S. E. Tropomyosin: function follows structure // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 60-72.
67. Lorenz, M., Poole, K. J., Popp, D., Rosenbaum, G., Holmes, K. C. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 246. – P. 108-119.
68. Hitchcock-DeGregori, S. E., Singh, A. What makes tropomyosin an actin binding protein? A perspective // *Journal of Structural Biology*. – 2010. – V. 170. – P. 319-324.
69. Barua, B., Pamula, M. C., Hitchcock-DeGregori, S. E. Evolutionarily conserved surface residues constitute actin binding sites of tropomyosin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2011. – V. 108. – P. 10150-10155.
70. Yang, Y. Z., Gordon, D. J., Korn, E. D., Eisenberg, E. Interaction between *Acanthamoeba* actin and rabbit skeletal muscle tropomyosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1977. – V. 252. – P. 3374-3378.
71. McLachlan, A. D., Stewart, M., Smillie, L. B. Sequence repeats in alpha-tropomyosin // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – V. 98. – P. 281-291.
72. Hitchcock-DeGregori, S. E., Song, Y., Moraczewska, J. Importance of internal regions and the overall length of tropomyosin for actin binding and regulatory function // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – P. 2104-2112.
73. McLachlan, A. D., Stewart, M. The 14-fold periodicity in alpha-tropomyosin and the interaction with actin // *Journal of Molecular Biology*. – 1976. – V. 103. – P. 271-298.
74. Landis, C., Back, N., Homsher, E., Tobacman, L. S. Effects of tropomyosin internal deletions on thin filament function // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. P. 31279-31285.
75. Sakuma, A., Kimura-Sakiyama, C., Onoue, A., Shitaka, Y., Kusakabe, T., Miki, M. The second half of the fourth period of tropomyosin is a key region for Ca(2+)-dependent regulation of striated muscle thin filaments // *Biochemistry*. – 2006. – V. 45. – P. 9550-9558.
76. Li, X. E., Tobacman, L. S., Mun, J. Y., Craig, R., Fischer, S., Lehman, W. Tropomyosin position on F-actin revealed by EM reconstruction and computational chemistry // *Biophysical Journal*. – 2011. – V. 100. – P. 1005-1013.
77. Kirwan, J. P., Hodges, R. S. Critical interactions in the stability control region of tropomyosin // *Journal of Structural Biology*. – 2010. – V. 170. – P. 294-306.

78. Goli, D. E., Suzuki, A., Temple, J., Holmes, G. R. Studies on purified α -actinin. I. Effect of temperature and tropomyosin on the α -actinin-F-actin interaction // *Journal of Molecular Biology*. – 1972. – V. 67. – P. 469-488.
79. von der Ecken, J., Muller, M., Lehman, W., Manstein, D. J., Penczek, P. A., Raunser, S. Structure of the F-actin-tropomyosin complex // *Nature*. – 2015. – V. 519. – P. 114-117.
80. Yang, Y. Z., Korn, E. D., Eisenberg, E. Cooperative binding of tropomyosin to muscle and *Acanthamoeba* actin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1979. – V. 254. – P. 7137-7140.
81. Wegner, A. The interaction of α , α - and α , β -tropomyosin with actin filaments // *FEBS Letters*. – 1980. – V. 119. – P. 245-248.
82. Goonasekara, C. L., Gallivan, L. J., Jackman, D. M., Heeley, D. H. Some binding properties of Omp T digested muscle tropomyosin // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2007. – V. 28. – P. 175-182.
83. Monteiro, P. B., Lataro, R. C., Ferro, J. A., Reinach Fde, C. Functional α -tropomyosin produced in *Escherichia coli*. A dipeptide extension can substitute the amino-terminal acetyl group // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – V. 269. – P. 10461-1046.
84. Tobacman, L. S. Cooperative binding of tropomyosin to actin // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 85-94.
85. Greenfield, N. J., Huang, Y. J., Swapna, G. V., Bhattacharya, A., Rapp, B., Singh, A., Montelione, G. T., Hitchcock-DeGregori, S. E. Solution NMR structure of the junction between tropomyosin molecules: implications for actin binding and regulation // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – V. 364. – P. 80-96.
86. Greenfield, N. J., Palm, T., Hitchcock-DeGregori, S. E. Structure and interactions of the carboxyl terminus of striated muscle α -tropomyosin: it is important to be flexible // *Biophysical Journal*. – 2002. – V. 83. – P. 2754-2766.
87. Murakami, K., Stewart, M., Nozawa, K., Tomii, K., Kudou, N., Igarashi, N., Shirakihara, Y., Wakatsuki, S., Yasunaga, T., Wakabayashi, T. Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin-T // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2008. – V. 105. – P. 7200-7205.
88. Hitchcock-DeGregori, S. E., An, Y. Integral repeats and a continuous coiled coil are required for binding of striated muscle tropomyosin to the regulated actin filament // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – V. 271. – P. 3600-3603.

89. Lehman, W., Li, X. E., Orzechowski, M., Fischer, S. The structural dynamics of alpha-tropomyosin on F-actin shape the overlap complex between adjacent tropomyosin molecules // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2014. – V. 552-553. – P. 68-73.
90. Lehman, W., Vibert, P., Uman, P., Craig, R. Steric-blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments // Journal of Molecular Biology. – 1995. – V. 251. – P. 191-196.
91. Xu, C., Craig, R., Tobacman, L., Horowitz, R., Lehman, W. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy // Biophysical Journal. – 1999. – V. 77. – P. 985-992.
92. Behrmann, E., Muller, M., Penczek, P. A., Mannherz, H. G., Manstein, D. J., Raunser, S. Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex // Cell. – 2012. – V. 150. – P. 327-338.
93. Resetar, A. M., Stephens, J. M., Chalovich, J. M. Troponin-tropomyosin: an allosteric switch or a steric blocker? // Biophysical Journal. – 2002. – V. 83. – P. 1039-1049.
94. Patchell, V. B., Gallon, C. E., Evans, J. S., Gao, Y., Perry, S. V., Levine, B. A. The regulatory effects of tropomyosin and troponin-I on the interaction of myosin loop regions with F-actin // The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280. – P. 14469-14475.
95. Eaton, B. L. Tropomyosin binding to F-actin induced by myosin heads // Science. – 1976. – V. 192. – P. 1337-1339.
96. Ueda, K., Kimura-Sakiyama, C., Aihara, T., Miki, M., Arata, T. Interaction sites of tropomyosin in muscle thin filament as identified by site-directed spin-labeling // Biophysical Journal. – 2011. – V. 100. – P. 2432-2439.
97. Ooi, T. Tryptic hydrolysis of tropomyosin // Biochemistry. – 1967. – V. 6. – P. 2433-8.
98. Gorecka, A., Drabikowski, W. Digestion of tropomyosin with trypsin // FEBS Letters. – 1977. – V. 75. – P. 145-148.
99. Pato, M. D., Mak, A. S., Smillie, L. B. Fragments of rabbit striated muscle alpha-tropomyosin. I. Preparation and characterization // The Journal of Biological Chemistry. – 1981. – V. 256. – P. 593-601.
100. Ueno, H. Local structural changes in tropomyosin detected by a trypsin-probe method // Biochemistry. – 1984. – V. 23. – P. 4791-4798.
101. Betteridge, D. R., Lehrer, S. S. Two conformational states of didansylcystine-labeled rabbit cardiac tropomyosin // Journal of Molecular Biology. – 1983. – V. 167. – P. 481-496.

102. Sumida, J. P., Wu, E., Lehrer, S. S. Conserved Asp-137 imparts flexibility to tropomyosin and affects function // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – P. 6728-6734.
103. Nevzorov, I. A., Nikolaeva, O. P., Kainov, Y. A., Redwood, C. S., Levitsky, D. I. Conserved noncanonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – P. 15766-15772.
104. Yar, S., Chowdhury, S. A., Davis, R. T., 3rd, Kobayashi, M., Monasky, M. M., Rajan, S., Wolska, B. M., Gaponenko, V., Kobayashi, T., Wieczorek, D. F., Solaro, R. J. Conserved Asp-137 is important for both structure and regulatory functions of cardiac alpha-tropomyosin (alpha-TM) in a novel transgenic mouse model expressing alpha-TM-D137L // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – V. 288. – P. 16235-16246.
105. Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M., Gidding, S. S., Kurosaki, T. T., Bild, D. E. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults // *Circulation*. – 1995. – V. 92. – P. 785-789.
106. Redwood, C., Robinson, P. Alpha-tropomyosin mutations in inherited cardiomyopathies // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2013. – V. 34. – P. 285-294.
107. Watkins, H., Ashrafian, H., Redwood, C. Inherited cardiomyopathies // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – V. 364. – P. 1643-1656.
108. Bing, W., Knott, A., Redwood, C., Esposito, G., Purcell, I., Watkins, H., Marston, S. Effect of hypertrophic cardiomyopathy mutations in human cardiac muscle alpha -tropomyosin (Asp175Asn and Glu180Gly) on the regulatory properties of human cardiac troponin determined by in vitro motility assay // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2000. – V. 32. – P. 1489-1498.
109. Heller, M. J., Nili, M., Homsher, E., Tobacman, L. S. Cardiomyopathic tropomyosin mutations that increase thin filament Ca²⁺ sensitivity and tropomyosin N-domain flexibility // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – P. 41742-41748.
110. Wang, F., Brunet, N. M., Grubich, J. R., Bienkiewicz, E. A., Asbury, T. M., Compton, L. A., Mihajlovic, G., Miller, V. F., Chase, P. B. Facilitated cross-bridge interactions with thin filaments by familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2011. – V. 2011. – P. 435271.

111. Michele, D. E., Gomez, C. A., Hong, K. E., Westfall, M. V., Metzger, J. M. Cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy mutant tropomyosin mice is transgene-dependent, hypertrophy-independent, and improved by beta-blockade // *Circulation Research*. – 2002. – V. 91. – P. 255-262.
112. Geisterfer-Lowrance, A. A., Kass, S., Tanigawa, G., Vosberg, H. P., McKenna, W., Seidman, C. E., Seidman, J. G. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation // *Cell*. – 1990. – V. 62. – P. 999-1006.
113. Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Benaiche, A., Isnard, R., Dubourg, O., Burban, M., Gueffet, J. P., Millaire, A., Desnos, M., Schwartz, K., Hainque, B., Komajda, M., Project, E. H. F. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy // *Circulation*. – 2003. – V. 107. – P. 2227-2232.
114. Tardiff, J. C. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes // *Heart Failure Reviews*. – 2005. – V. 10. – P. 237-248.
115. Jaaskelainen, P., Soranta, M., Miettinen, R., Saarinen, L., Pihlajamaki, J., Silvennoinen, K., Tikanoja, T., Laakso, M., Kuusisto, J. The cardiac beta-myosin heavy chain gene is not the predominant gene for hypertrophic cardiomyopathy in the Finnish population // *Journal of the American College of Cardiology*. – 1998. – V. 32. – P. 1709-1716.
116. Jefferies, J. L., Towbin, J. A. Dilated cardiomyopathy // *Lancet*. – 2010. – V. 375. – P. 752-762.
117. Dellefave, L., McNally, E. M. The genetics of dilated cardiomyopathy // *Current Opinion in Cardiology*. – 2010. – V. 25. – P. 198-204.
118. Lakdawala, N. K., Dellefave, L., Redwood, C. S., Sparks, E., Cirino, A. L., Depalma, S., Colan, S. D., Funke, B., Zimmerman, R. S., Robinson, P., Watkins, H., Seidman, C. E., Seidman, J. G., McNally, E. M., Ho, C. Y. Familial dilated cardiomyopathy caused by an alpha-tropomyosin mutation: the distinctive natural history of sarcomeric dilated cardiomyopathy // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2010. – V. 55. – P. 320-329.
119. Chang, A. N., Harada, K., Ackerman, M. J., Potter, J. D. Functional consequences of hypertrophic and dilated cardiomyopathy-causing mutations in alpha-tropomyosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – P. 34343-34349.

120. Marston, S. B. How do mutations in contractile proteins cause the primary familial cardiomyopathies? // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. – 2011. – V. 4. – P. 245-255.
121. Wieczorek, D. F., Jagatheesan, G., Rajan, S. The role of tropomyosin in heart disease // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 132-142.
122. Rodriguez Cruz, P. M., Sewry, C., Beeson, D., Jayawant, S., Squier, W., McWilliam, R., Palace, J. Congenital myopathies with secondary neuromuscular transmission defects; a case report and review of the literature // *Neuromuscular Disorders: NMD*. – 2014. – V. 24. – P. 1103-1110.
123. Tajsharghi, H., Ohlsson, M., Palm, L., Oldfors, A. Myopathies associated with beta-tropomyosin mutations // *Neuromuscular Disorders: NMD*. – 2012. – V. 22. – P. 923-933.
124. Ochala, J. Thin filament proteins mutations associated with skeletal myopathies: defective regulation of muscle contraction // *Journal of Molecular Medicine*. – 2008. – V. 86. – P. 1197-1204.
125. Marttila, M., Lehtokari, V. L., Marston, S., Nyman, T. A., Barnerias, C., Beggs, A. H., Bertini, E., Ceyhan-Birsoy, O., Cintas, P., Gerard, M., Gilbert-Dussardier, B., Hogue, J. S., Longman, C., Eymard, B., Frydman, M., Kang, P. B., Klinge, L., Kolski, H., Lochmuller, H., Magy, L., Manel, V., Mayer, M., Mercuri, E., North, K. N., Peudenier-Robert, S., Pihko, H., Probst, F. J., Reisin, R., Stewart, W., Taratuto, A. L., de Visser, M., Wilichowski, E., Winer, J., Nowak, K., Laing, N. G., Winder, T. L., Monnier, N., Clarke, N. F., Pelin, K., Gronholm, M., Wallgren-Pettersson, C. Mutation update and genotype-phenotype correlations of novel and previously described mutations in TPM2 and TPM3 causing congenital myopathies // *Human Mutation*. – 2014. – V. 35. – P. 779-790.
126. Abicht, A., Dusl, M., Gallenmuller, C., Guergueltcheva, V., Schara, U., Della Marina, A., Wibbeler, E., Almaras, S., Mihaylova, V., von der Hagen, M., Huebner, A., Chaouch, A., Muller, J. S., Lochmuller, H. Congenital myasthenic syndromes: achievements and limitations of phenotype-guided gene-after-gene sequencing in diagnostic practice: a study of 680 patients // *Human Mutation*. – 2012. – V. 33. – P. 1474-1484.
127. Finlayson, S., Beeson, D., Palace, J. Congenital myasthenic syndromes: an update // *Practical Neurology*. – 2013. – V. 13. – P. 80-91.
128. Orzechowski, M., Fischer, S., Moore, J. R., Lehman, W., Farman, G. P. Energy landscapes reveal the myopathic effects of tropomyosin mutations // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – V. 564. – P. 89-99.

129. Kremneva, E., Boussouf, S., Nikolaeva, O., Maytum, R., Geeves, M. A., Levitsky, D. I. Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 87. – P. 3922-3933.
130. Marston, S., Memo, M., Messer, A., Papadaki, M., Nowak, K., McNamara, E., Ong, R., El-Mezgueldi, M., Li, X., Lehman, W. Mutations in repeating structural motifs of tropomyosin cause gain of function in skeletal muscle myopathy patients // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – V. 22. – P. 4978-4987.
131. Gupte, T. M., Haque, F., Gangadharan, B., Sunitha, M. S., Mukherjee, S., Anandhan, S., Rani, D. S., Mukundan, N., Jambekar, A., Thangaraj, K., Sowdhamini, R., Sommesse, R. F., Nag, S., Spudich, J. A., Mercer, J. A. Mechanistic heterogeneity in contractile properties of alpha-tropomyosin (TPM1) mutants associated with inherited cardiomyopathies // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – V. 290. – P. 7003-7015.
132. Hinkle, A., Tobacman, L. S. Folding and function of the troponin tail domain. Effects of cardiomyopathic troponin T mutations // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – V. 278. – P. 506-513.
133. Jagatheesan, G., Rajan, S., Petrashevskaya, N., Schwartz, A., Boivin, G., Arteaga, G., de Tombe, P. P., Solaro, R. J., Wieczorek, D. F. Physiological significance of troponin T binding domains in striated muscle tropomyosin // *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. – 2004. – V. 287. – P. H1484-H1494.
134. Lehrer, S. S., Geeves, M. A. The myosin-activated thin filament regulatory state, M(-)-open: a link to hypertrophic cardiomyopathy (HCM) // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2014. – V. 35. – P. 153-160.
135. Lang, R., Gomes, A. V., Zhao, J., Housmans, P. R., Miller, T., Potter, J. D. Functional analysis of a troponin I (R145G) mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – P. 11670-11678.
136. Kobayashi, T., Solaro, R. J. Increased Ca²⁺ affinity of cardiac thin filaments reconstituted with cardiomyopathy-related mutant cardiac troponin I // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – P. 13471-13477.
137. Ly, S., Lehrer, S. S. Long-Range Effects of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations E180G and D175N on the Properties of Tropomyosin // *Biochemistry*. – V. 51. – P. 6413-6420.

138. Boussouf, S. E., Maytum, R., Jaquet, K., Geeves, M. A. Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2007. – V. 28. – P. 49-58.
139. Colpan, M., Tolkatchev, D., Grover, S., Helms, G. L., Cort, J. R., Moroz, N., Kostyukova, A. S. Localization of the binding interface between leiomodulin-2 and alpha-tropomyosin // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2016. – V. 1864. – P. 523-530.
140. Marttila, M., Hanif, M., Lemola, E., Nowak, K. J., Laitila, J., Gronholm, M., Wallgren-Pettersson, C., Pelin, K. Nebulin interactions with actin and tropomyosin are altered by disease-causing mutations // *Skeletal Muscle*. – 2014. – V. 4. – P. 15.
141. Mirza, M., Robinson, P., Kremneva, E., Copeland, O., Nikolaeva, O., Watkins, H., Levitsky, D., Redwood, C., El-Mezgueldi, M., Marston, S. The effect of mutations in alpha-tropomyosin (E40K and E54K) that cause familial dilated cardiomyopathy on the regulatory mechanism of cardiac muscle thin filaments // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282. – P. 13487-13497.
142. Loong, C. K., Badr, M. A., Chase, P. B. Tropomyosin flexural rigidity and single Ca(2+) regulatory unit dynamics: implications for cooperative regulation of cardiac muscle contraction and cardiomyocyte hypertrophy // *Frontiers in Physiology*. – 2012. – V. 3. – P. 80.
143. Prabhakar, R., Boivin, G. P., Grupp, I. L., Hoit, B., Arteaga, G., Solaro, R. J., Wieczorek, D. F. A familial hypertrophic cardiomyopathy alpha-tropomyosin mutation causes severe cardiac hypertrophy and death in mice // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2001. – V. 33. – P. 1815-1828.
144. Nevzorov, I., Redwood, C., Levitsky, D. Stability of two beta-tropomyosin isoforms: effects of mutation Arg91Gly // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2008. – V. 29. – P. 173-6.
145. Borovikov, Y. S., Avrova, S. V., Rysev, N. A., Sirenko, V. V., Simonyan, A. O., Chernev, A. A., Karpicheva, O. E., Piers, A., Redwood, C. S. Aberrant movement of beta-tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – V. 577-578. – P. 11-23.
146. Palm, T., Graboski, S., Hitchcock-DeGregori, S. E., Greenfield, N. J. Disease-causing mutations in cardiac troponin T: identification of a critical tropomyosin-binding region // *Biophysical Journal*. – 2001. – V. 81. – P. 2827-2837.

147. Heeley, D. H., Golosinska, K., Smillie, L. B. The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – V. 262. – P. 9971-9978.
148. Jin, J. P., Chong, S. M. Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2010. – V. 500. – P. 144-150.
149. Frye, J., Klenchin, V. A., Rayment, I. Structure of the tropomyosin overlap complex from chicken smooth muscle: insight into the diversity of N-terminal recognition // *Biochemistry*. – 2010. – V. 49. – P. 4908-4920.
150. Regitz-Zagrosek, V., Erdmann, J., Wellnhofer, E., Raible, J., Fleck, E. Novel mutation in the alpha-tropomyosin gene and transition from hypertrophic to hypocontractile dilated cardiomyopathy // *Circulation*. – 2000. – V. 102. – P. E112-E116.
151. Hershberger, R. E., Norton, N., Morales, A., Li, D., Siegfried, J. D., Gonzalez-Quintana, J. Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy // *Circulation Cardiovascular genetics*. – 2010. – V. 3. – P. 155-161.
152. Lakdawala, N. K., Funke, B. H., Baxter, S., Cirino, A. L., Roberts, A. E., Judge, D. P., Johnson, N., Mendelsohn, N. J., Morel, C., Care, M., Chung, W. K., Jones, C., Psychogios, A., Duffy, E., Rehm, H. L., White, E., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Ho, C. Y. Genetic testing for dilated cardiomyopathy in clinical practice // *Journal of Cardiac Failure*. – 2012. – V. 18. – P. 296-303.
153. Sequeira, V., Wijnker, P. J., Nijenkamp, L. L., Kuster, D. W., Najafi, A., Witjas-Paalberends, E. R., Regan, J. A., Boontje, N., Ten Cate, F. J., Germans, T., Carrier, L., Sadayappan, S., van Slegtenhorst, M. A., Zaremba, R., Foster, D. B., Murphy, A. M., Poggesi, C., Dos Remedios, C., Stienen, G. J., Ho, C. Y., Michels, M., van der Velden, J. Perturbed length-dependent activation in human hypertrophic cardiomyopathy with missense sarcomeric gene mutations // *Circulation Research*. – 2013. – V. 112. – P. 1491-1505.
154. Abdul-Hussein, S., Rahl, K., Moslemi, A. R., Tajsharghi, H. Phenotypes of myopathy-related beta-tropomyosin mutants in human and mouse tissue cultures // *PLOS ONE*. – 2013. – V. 8. – P. e72396.
155. Ochala, J., Li, M., Tajsharghi, H., Kimber, E., Tulinius, M., Oldfors, A., Larsson, L. Effects of a R133W beta-tropomyosin mutation on regulation of muscle contraction in single human muscle fibres // *The Journal of Physiology*. – 2007. – V. 581. – P. 1283-1292.

156. Kalyva, A., Schmidtman, A., Geeves, M. A. In vitro formation and characterization of the skeletal muscle alpha.beta tropomyosin heterodimers // *Biochemistry*. – 2012. – V. 51. – P. 6388-6399.
157. Lehrer, S. S., Joseph, D. Differences in local conformation around cysteine residues in alpha alpha, alpha beta, and beta beta rabbit skeletal tropomyosin // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1987. – V. 256. – P. 1-9.
158. Bronson, D. D., Schachat, F. H. Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – V. 257. – P. 3937-3944.
159. Bicer, S., Reiser, P. J. Complex tropomyosin and troponin T isoform expression patterns in orbital and global fibers of adult dog and rat extraocular muscles // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2013. – V. 34. – P. 211-231.
160. Lehrer, S. S. Intramolecular crosslinking of tropomyosin via disulfide bond formation: evidence for chain register // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1975. – V. 72. – P. 3377-3381.
161. Janco, M., Kalyva, A., Scellini, B., Piroddi, N., Tesi, C., Poggesi, C., Geeves, M. A. alpha-Tropomyosin with a D175N or E180G mutation in only one chain differs from tropomyosin with mutations in both chains // *Biochemistry*. – 2012. – V. 51. – P. 9880-9890.
162. Spudich, J. A., and Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1971. – V. 246. – P. 4866-4871.
163. Potter, J. D. Preparation of troponin and its subunits // *Methods Enzymol*. – 1982. – 85 (Part B). – P. 241-263.
164. Margossian, S. S., Lowey, S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle // *Methods Enzymol*. – 1982. – 85 (Part B). – P. 55-71.
165. Weeds, A.G., and Taylor, R.S. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin // *Nature*. – 1975. – V. 257. – P. 54-56.
166. Privalov, P. L., Potekhin, S. A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // *Methods Enzymol*. – 1986. – V. 131. – P. 4-51.

167. Biltonen, R. L., Freire, E. Thermodynamic characterization of conformational states of biological macromolecules using differential scanning calorimetry // *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. – 1978. – V. 5. – P. 85-124.
168. Ishii, Y., Lehrer, S. S. Excimer fluorescence of pyrenyliodoacetamide-labeled tropomyosin: a probe of the state of tropomyosin in reconstituted muscle thin filaments // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – P. 1160-1166.
169. Wegner, A. Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction // *Journal of Molecular Biology*. – 1979. – V. 131. – P. 839-853.
170. Panusz, H. T., Graczyk, G., Wilmanska, D., Skarzynski, J. Analysis of orthophosphate-pyrophosphate mixtures resulting from weak pyrophosphatase activities // *Analytical Biochemistry*. – 1970. – V. 35. – P. 494-504.
171. Bing, W., Knott, A., Marston, S. B. A simple method for measuring the relative force exerted by myosin on actin filaments in the in vitro motility assay: evidence that tropomyosin and troponin increase force in single thin filaments // *The Biochemical Journal*. – 2008. – V. 350 Pt 3. – P. 693-699.
172. Никитина Л.В, Копылова Г. В., Щепкин Д.В, Кацнельсон Л.Б. Исследование взаимодействия сократительных и регуляторных белков миокарда кролика методом искусственных подвижных систем // *Биохимия* – 2008. – С. 219-227.
173. Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Nikitina, L. V., Katsnelson, L. B., Bershtsky, S. Y. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an in vitro motility assay // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – V. 401. – P. 159-163.
174. Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Nikitina, L. V. Study of reciprocal effects of cardiac myosin and tropomyosin isoforms on actin-myosin interaction with in vitro motility assay // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – V. 415. – P. 104-108.
175. Nabiev, S. R., Ovsyannikov, D. A., Kopylova, G. V., Shchepkin, D. V., Matyushenko, A. M., Koubassova, N. A., Levitsky, D. I., Tsaturyan, A. K., Bershtsky, S. Y. Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament // *Biophysical Journal*. – 2015. – V. 109. – P. 373-379.
176. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.

177. Невзоров И.А. "Изменения структуры и свойств тропомиозина при стабилизации и дестабилизации различных участков его молекулы". Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 2011.
178. Ishii, Y., Lehrer, S. S. Two-site attachment of troponin to pyrene-labeled tropomyosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – V. 266. – P. 6894-6903.
179. Lehrer, S. S., Ly, S., Fuchs, F. Tropomyosin is in a reduced state in rat cardiac muscle // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2011. – V. 32. – P. 63-64.
180. Lehrer, S. S., Ly, S., Fuchs, F. Tropomyosin is in a reduced state in rabbit psoas muscle // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2011. – V 32. – P. 19-21.

Благодарности

Считаю своим долгом выразить глубокую благодарность моему научному руководителю Д.И. Левицкому за предоставленную возможность заниматься этой темой и чуткое научное руководство, постоянное внимание и заботу.

Выражаю глубокую признательность Н.В. Артемовой и Д.С. Логвиновой за активное участие и помощь в работе, за полезные советы и постоянную поддержку.

Я признателен Н.Н. Случанко за помощь в освоении некоторых методик на ранних стадиях работы.

Я благодарен нашим партнерам в г. Екатеринбурге С.Ю. Бершицкому, Г.В. Копыловой, Д.В. Щепкину и С.Р. Набиеву за продуктивное сотрудничество при проведении совместных исследований.

Также хотелось бы поблагодарить А.К. Цатуряна за помощь в создании компьютерных моделей и анализ их результатов.

Хочу выразить особую благодарность Н.Б. Гусеву за предоставленный препарат тропонинового комплекса и методики его выделения, а также за ценные советы и постоянную поддержку. Хотелось бы также поблагодарить сотрудников кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за приобретенные знания, необходимые для исследовательской работы.

И, наконец, хочу поблагодарить наших итальянских коллег с кафедры физиологии Университета Флоренции – В. Scellini, N. Piroddi, С. Poggesi и С. Tesi за сотрудничество и возможность проведения экспериментов на миофибриллах.