

## ТРОПОНИНОВЫЙ КОМПЛЕКС СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

©2013 г.

И. А. КАТРУХА

*Кафедра биохимии биологического факультета  
Московского государственного университета  
им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Особенности экспрессии белков, входящих в состав тропонинового комплекса. III. Строение компонентов тропонинового комплекса сердца человека. IV. Роль тропонинового комплекса в регуляции сердечного сокращения. V. Влияние посттрансляционных модификаций компонентов тропонинового комплекса на регуляцию мышечного сокращения. VI. Тропониновый комплекс и заболевания сердца. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Сокращение сердечной мускулатуры представляет собой сложный процесс, в котором стимуляция кардиомиоцита, происходящая при деполяризации мембраны клетки и последующем повышении внутриклеточной концентрации ионов кальция, сопряжена с развитием механического движения. Ключевую роль в регуляции сердечного сокращения играет один из компонентов тонкого актинового филамента кардиомиоцита – тропониновый комплекс, состоящий из трех субъединиц: тропонина С (ТнС), способного связывать ионы  $Ca^{2+}$ , тропонина Т (ТнТ), взаимодействующего с тропомиозином, и тропонина I (ТнI), ингибирующего АТФазную активность актомиозинового комплекса. Сложные структурные изменения, происходящие

---

*Принятые сокращения:* ИД – ингибиторный домен тропонина I; МД – мобильный домен тропонина I; РД – регуляторный домен тропонина I; с/мсТнС – сердечная/медленная скелетная изоформа тропонина С человека; ТнI – тропонин I; ТнС – тропонин С; ТнТ – тропонин Т; чсТнI – сердечная изоформа тропонина I человека; чсТнТ – сердечная изоформа тропонина Т человека; ЯМР – ядерно-магнитный резонанс; сМуВР-С – сердечный связанный с миозином С-белок; DCM – дилатационная кардиомиопатия; FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии; HCM – гипертрофическая кардиомиопатия; РКА – протеинкиназа А; РКС – протеинкиназа С; PP1, PP2 – протеинфосфатазы 1 и 2; RCM – рестриктивная кардиомиопатия; SDSL-EPR – сайт-направленная модификация ЭПР-метками (site-directed spin labeling EPR).

*Адрес для корреспонденции:* [katrukhai@gmail.com](mailto:katrukhai@gmail.com)

в тропониновом комплексе при повышении внутриклеточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ , обеспечивают возможность АТФ-зависимого связывания миозина с актином и развитие мышечного сокращения. Смена изоформ в процессе онтогенеза, альтернативный сплайсинг, а также особенности строения и различные посттрансляционные модификации белков, входящих в состав тропонинового комплекса, позволяют осуществлять тонкую регуляцию сокращения сердечной мускулатуры.

Тропониновый комплекс имеет важное медицинское значение. Так, например, тропонин является мишенью для кардиотонических лекарственных средств, используемых при терапии сердечной недостаточности. Ряд мутаций в генах белков тропонинового комплекса приводит к развитию различных типов кардиомиопатий. Помимо этого, на протяжении последних 25 лет специфичные для сердечной ткани изоформы ТnI и ТnT используются для диагностики патологий, связанных с некрозом кардиомиоцитов (инфаркт миокарда, травматическое повреждение миокарда и др.).

Данный обзор обобщает существующую на сегодняшний день информацию о строении и свойствах компонентов тропонинового комплекса, и их роли в регуляции сократительной активности сердца.

## **II. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ТРОПОНИНОВОГО КОМПЛЕКСА**

### **ТРОПОНИН I**

Тропонин I представлен в организме человека тремя изоформами: быстрой и медленной скелетными изоформами, а также специфичной сердечной изоформой [1–3]. Гены всех трех изоформ ТnI расположены в тандеме с генами ТnT и являются паралогами, образованными путем трипликации локуса, содержащего родительскую пару генов ТnI/ТnT [4, 5]. У человека в процессе эмбрионального развития быстрая и медленная скелетные изоформы ТnI экспрессируются во всех типах скелетной мускулатуры, однако во взрослом состоянии указанные изоформы представлены только, соответственно, в быстрых или медленных скелетных мышцах [6]. Медленная скелетная изоформа ТnI экспрессируется в сердечной мышце в процессе эмбрионального развития [7–9] и сменяется сердечной изоформой во взрослом состоянии. Сердечная изоформа ТnI экспрессируется исключительно в сердечной мускулатуре [10–12]. Ген сердечной изоформы ТnI (TNNI3) расположен в 19 хромосоме (19q13.4) и включает в себя восемь экзонов и семь интронов [3]. Экзон 3 отсутствует в генах

скелетных изоформ белка и кодирует основную часть уникальной N-концевой последовательности, характерной только для сердечной изоформы ТnI [3].

#### *Смена изоформ тропонина I в процессе онтогенеза*

В процессе онтогенеза в сердце многих животных и человека происходит смена изоформ ТnI [8, 13–16]. Во время эмбрионального развития в сердце преимущественно экспрессируется медленная скелетная изоформа ТnI. В последние недели эмбрионального развития уровень экспрессии чсТnI усиливается [7, 9], и к девятому месяцу жизни в сердце человека происходит полная замена медленной скелетной на сердечную изоформу белка [9]. Механизм регуляции смены изоформ ТnI в процессе развития сердца не до конца изучен. Ингибирование экспрессии медленной скелетной формы ТnI в кардиомиоцитах может проходить как на стадии транскрипции, так и на посттранскрипционном уровне. В экспериментах на миоблестах мыши было показано, что в ингибировании активности промотора гена медленной скелетной изоформы ТnI может принимать участие транскрипционный фактор Yin Yang 1 [17]. В другой серии экспериментов, выполненных на эмбриональном миокарде крыс, было обнаружено увеличенное количество антисмысловой РНК, препятствующей трансляции сердечной изоформы ТnI, при этом количество указанной антисмысловой РНК уменьшалось по мере взросления организма [18].

Эксперименты на миоцитах мышей [19, 20], крыс [21, 22] и кроликов [23, 24] показали, что медленная скелетная изоформа тропонина I, встроенная в состав тропоинового комплекса, обеспечивает более высокое сродство к ионам  $Ca^{2+}$  и меньшую чувствительность к ацидозу, чем аналогичная сердечная изоформа этого белка. Таким образом, экспрессия медленной скелетной изоформы ТnI в эмбриональных миоцитах делает сердечную мышцу более устойчивой к гипоксии и ацидозу, которые могут возникать в процессе эмбрионального развития и при родах.

#### ТРОПОНИН Т

Тропонин Т представлен в организме человека также тремя генами, кодирующими соответственно быструю и медленную скелетную, а также сердечную изоформы белка. Ген сердечной изоформы ТnТ (TNNT2) расположен в хромосоме 1 (1q32.3) [25, 26], имеет длину 17 kb и состоит из 17 экзонов и 16 интронов [27]. Для различных животных и человека было показано, что помимо кардиомиоцитов

сердечная изоформа ТnТ в небольшом количестве экспрессируется в скелетных мышцах во время эмбрионального развития [28–31].

*Альтернативный сплайсинг и смена изоформ сТnТ  
в процессе онтогенеза*

В нескольких работах, посвященных исследованию экспрессии изоформ ТnТ в процессе эмбрионального развития сердечной мышцы мышей [32, 33] и крыс [34], наблюдалось кратковременное увеличение количества мРНК, кодирующей медленную скелетную изоформу белка. Повышенный уровень мРНК, кодирующей данную изоформу ТnТ, был отмечен в эмбриональной сердечной мышце здоровых людей, а также в сердцах больных с терминальной стадией сердечной недостаточности [34]. Впрочем, следует отметить, что в указанных работах не было приведено убедительных доказательств трансляции этой мРНК в сердечной мускулатуре. Отсутствие скелетных изоформ ТnТ в сердечной мышце на разных этапах ее развития установлено в целом ряде исследований [30, 35–37], и это позволяет утверждать, что в кардиомиоцитах экспрессируется исключительно сердечная изоформа ТnТ, кодируемая геном TNNT2.

В сердечной мышце птиц [38] и млекопитающих [39–43] присутствует несколько форм ТnТ, получаемых в результате альтернативного сплайсинга. Продуктами гена TNNT2 человека также являются несколько изоформ белка, получаемые при альтернативном сплайсинге экзонов 4, 5 и 13 [25, 26, 30, 38, 42, 44, 45]. Показано, что у птиц и млекопитающих аминокислотная последовательность, кодируемая экзонами 4, 5 и 13, представлена только в эмбриональной форме и отсутствует в структуре тропонина Т сердца взрослого организма [13, 30, 38, 43, 45]. Экзоны 4 и 13 могут подвергаться альтернативному сплайсингу независимо от стадии развития [28, 42, 45, 46]. У мышей и крыс эмбриональная сердечная изоформа ТnТ перестает экспрессироваться соответственно к 5 и 14 дню постнатального развития [28]. Время окончания экспрессии эмбриональной сердечной изоформы ТnТ человека точно не известно, но к девятому месяцу после рождения ТnТ представлен только в виде «взрослой» сердечной изоформы, в которой последовательность, кодируемая 5 экзонами, отсутствует [26]. В сердце здорового человека тропонин Т преимущественно представлен в виде изоформы ТnТ3, содержащей 287 аминокислотных остатков (без учета первого остатка метионина, отщепляемого в процессе трансляции) и включающей в свой состав последовательности, кодируемые экзонами 4 и 13 [30, 46].

Участок аминокислотной последовательности, кодируемый экзон 5 (EEEDWREDED), несет большой отрицательный заряд. Таким образом, альтернативный сплайсинг, происходящий при взрослении организма, приводит к уменьшению длины белка и смене более кислой изоформы на менее кислую, что может влиять на функциональные свойства тропонина. Было показано, что экспрессия эмбриональной изоформы ТнТ усиливает максимальную силу сокращения миофибрилл и чувствительность миоцитов к ионам  $Ca^{2+}$  [47–49]. Сплайсинг 4 экзона также может иметь функциональное значение. Экспрессия белка, в котором отсутствовал участок, кодируемый 4 экзонем, активировалась в сердцах больных с терминальной стадией сердечной недостаточности [30, 46].

Молекулярный механизм регуляции альтернативного сплайсинга ТнТ остается не вполне понятным. В настоящее время в наибольшей степени изучены факторы, оказывающие влияние на сплайсинг 5 экзона ТнТ. Установлено, что связывание факторов CUG-BP и ETR-3 с UG-богатым участком интронной последовательности, расположенной ниже экзона 5, приводит к включению данного экзона в последовательность кодирующей РНК [50]. Экспрессия CUG-BP и ETR-3 снижается в процессе онтогенеза [51]. Антагонистами данных факторов являются белки РТВ и MBNL, связывающиеся с участками интронных последовательностей, расположенных как выше, так и ниже экзона 5, и препятствующие его встраиванию в кРНК [52].

#### ТРОПОНИН С

Тропонин С представлен в организме человека двумя генами: геном (TNNC1), расположенным в хромосоме 3 (3p21.1) и кодирующим сердечную/медленную скелетную изоформу ТнС (с/мсТнС) [53], и геном быстрой скелетной изоформы ТнС (TNNC2), расположенным в 20 хромосоме (20q12) [54, 55]. TNNC1 состоит из 6 экзонов и 5 интронов [56] и экспрессируется в сердечной и медленной скелетной мускулатуре [57]. В экспериментах на цыплятах было показано, что ген TNNC1 экспрессируется также на эмбриональной стадии развития быстрой скелетной мускулатуры [58, 59]. Ген TNNC2 экспрессируется исключительно в быстрой скелетной мускулатуре независимо от стадии развития организма [57].

### III. СТРОЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ТРОПОНИНОВОГО КОМПЛЕКСА СЕРДЦА ЧЕЛОВЕКА

#### ТРОПОНИН I

Продукт трансляции мРНК сердечной изоформы тропонина I состоит из 210 аминокислотных остатков; в процессе синтеза белка первый остаток метионина отщепляется, а следующий за ним аланин подвергается ацетилированию [60, 61]. Зрелая молекула белка состоит из 209 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 24 кДа. Сердечная изоформа тропонина I состоит из 5 доменов: N-концевого домена, IT-руки, ингибиторного домена, регуляторного домена и C-концевого мобильного домена (рис. 1Б).

N-концевой домен (остатки 2–32\*) специфичен для сердечной изоформы белка и играет важную роль во взаимодействии TnI с TnC и регуляции мышечного сокращения. Данный домен состоит из кислого N-концевого участка (остатки 2–11), Хаа-Pro мотива (остатки 12–18) и участка, содержащего два остатка серина (S23, S24), способных подвергаться фосфорилированию (остатки 19–32) [60, 62]. С использованием методов дот-блоттинга [63] и ЯМР [62, 64–66] установлено, что N-концевой фрагмент дефосфорилированного чсTnI способен взаимодействовать с N-концевым глобулярным доменом TnC (рис. 1А). В этом взаимодействии участвуют аминокислотные остатки, расположенные во фрагменте, ограниченном остатками 19–33 чсTnI [63, 65]. Фосфорилирование остатков S23 и S24 приводит к образованию нового  $\alpha$ -спирального участка (остатки 21–30) [62]. Данное структурное изменение нарушает взаимодействие TnI с N-концевым доменом TnC и приводит к смещению кислого N-концевого участка TnI. Предполагается, что в бифосфорилированной молекуле TnI кислый N-концевой участок взаимодействует с положительно заряженным ингибиторным доменом TnI, и такое взаимодействие оказывает значительное влияние на  $Ca^{2+}$ -зависимую регуляцию мышечного сокращения [62].

За N-концевым доменом следует так называемая IT-рука (остатки 42–136), состоящая из двух  $\alpha$ -спиралей (H1 (остатки 43–79) и H2 (остатки 90–135)), соединенных гибким линкером [67]. Данный участок молекулы является наименее подвижной частью тропонинового комплекса и выполняет структурную функцию, обеспечивая контакт с тропонинами C и T и отвечая за пространственную ориентацию

\* Все номера аминокислотных остатков соответствуют продуктам экспрессии генов тропонина I и T человека, то есть приводятся с учетом первого отщепляемого метионина, если не указано иначе.

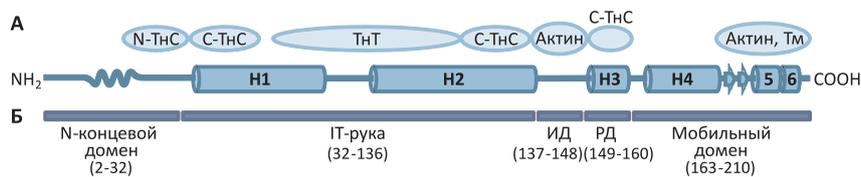


Рис. 1. Структура сердечной изоформы ТnI человека.

А – расположение  $\alpha$ -спиралей Н1–Н4 в молекуле  $\text{cTnI}$  согласно [67]. Структура N-концевого домена ТnI изображена согласно модели, предложенной в [62], структура мобильного домена – согласно модели, предложенной в [86]. Волнообразной линией обозначен Хаа-Про участок ТnI (остатки 12–18), образующий пролиновую спираль. Стрелками обозначены короткие  $\beta$ -участки 1 и 2. В овалах указаны белки тонкого филамента, с которыми взаимодействуют соответствующие участки молекулы ТnI [62, 63, 65, 67, 88]. N-TnC и C-TnC, соответственно, N- и C-концевые домены ТnC, Тm – тропомиозин.

Б – доменная организация  $\text{cTnI}$  [67]. ИД – ингибиторный домен, РД – регуляторный домен.

ТnI в тропоиновом комплексе. Амфифильная часть Н1  $\alpha$ -спирали (43–65 остатки) контактирует с C-концевым доменом ТnC [67, 68]. C-концевая часть  $\alpha$ -спирали Н1 (остатки 66–79) взаимодействует с Н2  $\alpha$ -спиралью ТnТ [67, 69]. Участок тропоина I, ограниченный остатками 80–89, образует гибкий линкер между  $\alpha$ -спиралями Н1 и Н2. Указанный участок богат гидрофобными аминокислотными остатками и вместе с отдельными аминокислотными остатками из Н2  $\alpha$ -спирали ТnТ образует гидрофобную область. Н2  $\alpha$ -спираль  $\text{cTnI}$  образует параллельную суперскрученную спираль с Н2  $\alpha$ -спиралью тропоина Т (остатки 226–271  $\text{cTnT}$ ) [67, 70, 71].

За IТ-рукой следует ингибиторный домен (остатки 137–148) [67, 72] (в работах Lindhout & Sykes [73] и Brown *et al* [74], указываются несколько другие границы ингибиторного домена – остатки 129–148). В отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  138–148 аминокислотные остатки ингибиторного домена взаимодействуют с актином [72, 75] и, сдвигая молекулу тропомиозина, препятствуют образованию актомиозинового комплекса [76, 77]. В различных работах приводятся несколько вариантов структуры ингибиторного домена  $\text{cTnI}$ . Так, в исследовании Brown *et al* [74], проведенном на сердечной изоформе ТnI мыши,  $\text{cTnC}$  курицы и  $\text{cTnT}$  быка, методом SDSL-EPR (site-directed spin labeling, сайт-направленной модификации и электронного парамагнитного резонанса) показано, что участок, ограниченный остатками 138–145, не имеет устойчивой вторичной структуры. Данные результаты подтверждались в работе Takeda *et al* [67], в которой попытки закристаллизовать фрагмент, содержащий остатки 137–148

не увенчались успехом, что косвенно свидетельствует о высокой подвижности и неупорядоченности указанного фрагмента. В то же время данные Lindhout & Sykes [73] свидетельствуют о том, что в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  участок, ограниченный остатками 132–135 чсТнI, взаимодействует с гидрофобной областью на поверхности С-домена с/мсТнС, в результате чего следующий за этим участок тропонина I (остатки 135–140) принимает конформацию  $\alpha$ -спирали, образуя гидрофобные связи с Е- и Н-спиралями С-концевого домена ТнС. При этом участок, ограниченный остатками 141–148, остается в неупорядоченном состоянии [73]. Однако в ряде других исследований приводятся доказательства того, что ингибиторный домен может иметь вторичную структуру. Например, данные ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) свидетельствуют о том, что в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  участок сердечной изоформы ТнI курицы, ограниченный остатками 138–149 (остатки 137–148 чсТнI), взаимодействует с актином и при этом принимает более компактную конформацию [75]. Повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к изменению конформации ингибиторного домена ТнI и к образованию продолжительной квази- $\alpha$ -спирали, взаимодействующей с линкерным участком молекулы ТнС [75, 78]. Возможность образования ингибиторным доменом вторичной структуры в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  также была подтверждена методом H/D масс-спектрометрии [79].

Регуляторный домен чсТнI (остатки 149–163) включает в себя короткую НЗ  $\alpha$ -спираль (остатки 150–159) [67]. При повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  данный домен взаимодействует с гидрофобным участком на поверхности N-концевого домена ТнС, формируя третью область связывания чсТнI с ТнС [80]. Взаимодействие регуляторного домена с ТнС приводит к диссоциации ингибиторного домена ТнI от актина и смещению тропомиозина, что делает возможным образование актомиозинового комплекса [69, 80, 81].

Мобильный домен чсТнI (остатки 163–210) содержит длинную Н4  $\alpha$ -спираль (остатки 164–188) и С-концевой участок молекулы (остатки 190–210), структура которого до конца не выяснена. В работе Takeda *et al* [67], в которой тропониновый комплекс был закристаллизован в насыщенном  $\text{Ca}^{2+}$  состоянии, не удалось определить структуру последовательности, ограниченной остатками 192–210 ТнI, что, по мнению авторов, говорит о высокой подвижности данного участка в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  [67]. В работах, посвященных исследованию структуры тропонина I скелетных мышц, было предложено несколько вариантов строения С-концевого участка молекулы, имеющего высокую степень гомологии с С-концевым участком сердечной

изоформы белка. Исследования с помощью метода ЯМР-спектроскопии комплекса, собранного *in vitro* из рекомбинантных ТnI и ТnС и фрагмента ТnТ [82], или химерных белков [83] показали, что данный участок скелетной изоформы ТnI находится в неупорядоченном состоянии. В то же время данные группы King *et al* [84], полученные методом малоуглового нейтронного рассеивания, говорят о том, что в присутствии  $Ca^{2+}$  С-конец скелетной изоформы ТnI цыпленка может принимать компактную конформацию, образованную, предположительно,  $\alpha$ -спиралями, а при низких концентрациях кальция образует удлиненную суперскрученную спираль. В другой работе методом ЯМР-спектроскопии было показано, что С-конец ТnI из скелетной мускулатуры цыпленка имеет вторичную структуру, состоящую из  $\alpha$ -спирали, двух коротких анти-параллельных  $\beta$ -слоев и следующих за ними двух  $\alpha$ -спиралей [85]. Аналогичная вторичная структура была предложена недавно и для рекомбинантного чсТnI в работе Wang *et al* [86], выполненной с использованием метода FRET. Наконец, в работе Zhou *et al* [87], проведенной с использованием сердечной изоформы ТnI крысы, предполагается, что в отсутствие  $Ca^{2+}$  С-конец ТnI имеет оформленную вторичную структуру, однако при повышении концентрации кальция переходит в подвижное неупорядоченное состояние.

В работах с рекомбинантным скелетным тропонином курицы [85], рекомбинантным сердечным ТnI крысы [87], рекомбинантными фрагментами (остатки 131–210) [88] и (остатки 1–192) [89] сердечной изоформы ТnI человека, было показано, что в отсутствие ионов  $Ca^{2+}$  мобильный домен ТnI взаимодействует с С-концевой частью актина и тропомиозина. Считается, что данные взаимодействия играют важную роль в регуляции  $Ca^{2+}$ -зависимого сокращения и стабилизации тропоинового комплекса на поверхности тонкого филамента [88, 89].

#### ТРОПОНИН Т

Тропонин Т играет основную роль в закреплении тропоинового комплекса на тонком филаменте, обеспечивает организацию белков в тропоиновом комплексе и участвует в регуляции мышечного сокращения [90, 91]. Как говорилось выше, в сердечной мышце здорового взрослого человека экспрессируется преимущественно одна изоформа тропоина Т, имеющая молекулярную массу 35,9 кДа. N-концевой метионин в процессе созревания белка отщепляется, а следующий за ним остаток серина подвергается ацетилированию. Таким образом, зрелая молекула белка состоит из 287 аминокислотных

остатков. На данный момент удалось получить кристаллическую структуру только некоторых участков молекулы чсТнТ [67], поэтому основная информация о структуре данной молекулы получена путем анализа ее фрагментов.

Молекула чсТнТ имеет вытянутую форму и располагается вдоль тонкого филамента [88, 92]. Данный белок состоит из N-концевого варибельного домена (остатки 2–68) и консервативных центрального (остатки 69–200) и C-концевого доменов (остатки 201–288) (рис. 2 Б). Строение N-концевого домена сильно отличается у различных изоформ ТнТ [93]. В N-концевом домене чсТнТ, как и в случае с чсТнI, присутствует уникальная для сердечной изоформы белка аминокислотная последовательность, кодируемая преимущественно экзоном 6 и имеющая длину ~32 аминокислот [94]. Данный участок крайне полярен и отрицательно заряжен, поскольку более чем на половину состоит из остатков глутаминовой кислоты. Ранние исследования, проведенные на коротком изолированном N-концевом фрагменте ТнТ, показали, что этот участок не имеет сайтов взаимодействия с белками тонкого филамента [95, 96]. Впрочем, существуют работы, в которых предполагается, что первые 40 аминокислотных остатков ТнТ все-таки могут непосредственно взаимодействовать с другими компонентами тропонинового комплекса с тропомиозином [97]. Согласно работам, проведенным с использованием различных химерных белков и делеционных мутантов ТнТ, N-концевая часть ТнТ оказывает влияние на конформацию молекулы [98–100], взаимодействие тропонинового комплекса с актином и тропомиозином [100, 101], чувствительность сердечной мышцы к ионам  $Ca^{2+}$  [94, 102, 103], а также на развитие максимальной силы сокращения [103, 104].

В центральном домене чсТнТ находится первый участок (Т1) взаимодействия с тропомиозином (остатки 98–136 чсТнТ) [105]. Т1 связывается в области контакта двух соседних молекул тропомиозина [92, 106], при этом прочность взаимодействия практически не зависит от концентрации  $Ca^{2+}$  [107]. Точная структура Т1 не ясна, но предполагается, что данный участок имеет преимущественно  $\alpha$ -спиральную структуру [108, 109]. Следующий за Т1 участок (остатки 183–200 чсТнТ) является подвижным линкером, соединяющим центральный и C-концевой участки молекулы чсТнТ [67, 109].

C-концевой участок чсТнТ содержит  $\alpha$ -спирали Н1 (остатки 204–220) и Н2 (остатки 226–271) [67]. Н2-спираль участвует во взаимодействии с ТнI, формируя с Н2-спиралью последнего суперскрученную спираль [67, 70]. Своим C-концом (остатки 256–270) Н2-спираль



Рис. 2. Структура сердечной изоформы ТнТ человека.

А – расположение  $\alpha$ -спиральных участков Н1 и Н2 в молекуле чсТнТ [67]. В овалах указаны белки тонкого филамента, с которыми взаимодействуют соответствующие участки молекулы ТнТ [67, 105, 113]. Т1 и Т2 – участки взаимодействия с тропомиозином.

Б – доменная организация молекулы чсТнТ.

В – расположение экзонов, кодирующих соответствующие участки молекулы чсТнТ [91, 93]. Серым цветом отмечены экзоны 4 и 13, подвергающиеся альтернативному сплайсингу. Черным цветом отмечен экзон 5, присутствующий только в эмбриональной форме белка.

ТнТ взаимодействует также с  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими петлями С-концевого домена ТнС [67]. Структура последних 16 аминокислотных остатков чсТнТ не была определена при кристаллографии тропоинового комплекса, что является косвенным признаком подвижности данного участка молекулы [67]. В С-концевом домене расположен второй участок (Т2) взаимодействия чсТнТ с тропомиозином. Т2 связывается с тропомиозином в районе С190 последнего [110, 111], и данное взаимодействие усиливается в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [107]. Существуют противоречивые данные о том, какая конкретно часть С-концевого домена тропонина Т участвует в формировании участка Т2. В работе Jin *et al* [105] методом иммуноферментного анализа с использованием фрагментов медленной скелетной изоформы тропонина Т мышцы было показано, что Т2 участок расположен между остатками 180–204 (гомологичен участку, ограниченному остатками 197–239 чсТнТ). Однако в других работах предполагается, что участок Т2 образован последними 16 аминокислотными остатками ТнТ [111–113]. Взаимодействуя с тропомиозином и, возможно, актином, С-концевой участок ТнТ стабилизирует неактивное состояние тропоинового комплекса, поскольку делеция последних 14 аминокислотных остатков чсТнТ приводила к увеличению актин-активируемой АТФазной активности *in vitro* [113].

## ТРОПОНИН С

Изоформа ТнС, экспрессируемая в сердечной и медленной скелетной мускулатуре, имеет массу 18,4 кДа и состоит из 161 аминокислотного остатка [114]. В отличие от  $\text{cTnT}$  и  $\text{cTnI}$ , N-концевой метионин зрелой молекулы  $\text{sTnC}$  не отщепляется и подвергается ацетилированию [114, 115]. ТнС состоит из короткого N-концевого домена (остатки 1–13), содержащего первую  $\alpha$ -спираль (N- $\alpha$ -спираль), и четырех  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих EF-рук (EF-hands), объединенных попарно в глобулярный N-концевой (остатки 14–87) и C-концевой (остатки 92–161) домены (рис. 3). Каждая EF-рука состоит из двух  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha$ -спирали А–Н), между которыми расположена петля, обеспечивающая связывание  $\text{Ca}^{2+}$  и включающая в свой состав участок, формирующий короткую антипараллельную  $\beta$ -складку с аналогичным участком соседней EF-руки [67, 116]. N- и C-концевые домены соединены коротким линкером, расположенным между  $\alpha$ -спиралями D и E (D–E линкер) [116].

У быстрой скелетной изоформы ТнС все четыре EF-руки способны связывать катионы  $\text{Mg}^{2+}$  или  $\text{Ca}^{2+}$  [117, 118]. У  $\text{sTnC}$  в первой EF-руке произошли неконсервативные замены, препятствующие связыванию двухвалентных катионов [116, 119]. Таким образом, сердечная изоформа ТнС содержит только три  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих участка: два C-концевых участка, обладающих высоким сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $Kd_{\text{Ca}} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) и один участок с низким сродством ( $Kd_{\text{Ca}} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) [120–122].

Участки высокого сродства к ионам кальция, расположенные в C-концевой глобуле  $\text{cTnC}$  (III и IV EF-руки), имеют относительно низкую специфичность, и при физиологических условиях постоянно заполнены ионами  $\text{Mg}^{2+}$  или  $\text{Ca}^{2+}$  [118] (рис. 3 А). C-концевой глобулярный домен обеспечивает взаимодействие ТнС с остальными белками тропонинового комплекса, и не принимает непосредственного участия в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции мышечного сокращения [122, 123]. Вторая EF-рука, находящаяся в N-концевом домене  $\text{sTnC}$ , обладает более низким сродством, но более высокой специфичностью к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и играет ключевую роль в регуляции сокращения сердечной мускулатуры (см. ниже) [122, 124].

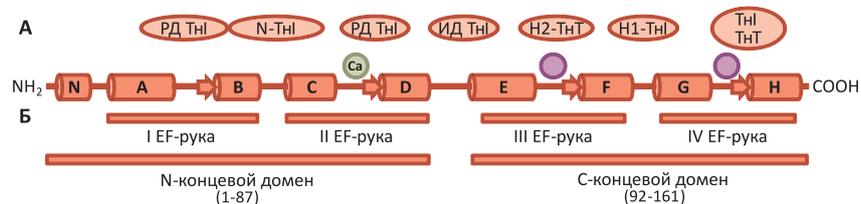


Рис. 3. Схема строения сердечной/медленной скелетной изоформы ТnC человека.

А – схема вторичной структуры с/мсТnC [67, 116]. Цилиндрами обозначены  $\alpha$ -спирали N и A–H, стрелками –  $\beta$ -участки. Фиолетовыми кружками обозначены низкоспецифичные участки, способные связывать как ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , так и  $\text{Mg}^{2+}$ . Зеленым кружком обозначен участок с высокой специфичностью к  $\text{Ca}^{2+}$ . В овалах указаны компоненты тропонового комплекса, с которыми взаимодействуют соответствующие участки молекулы ТnC [63, 65, 67, 80]. РД – регуляторный домен, N-ТнI – N-концевой домен ТнI, ИД – ингибиторный домен ТнI.

Б – доменная структура ТnC [67].

#### IV. РОЛЬ ТРОПОНОВОГО КОМПЛЕКСА В РЕГУЛЯЦИИ СЕРДЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

##### СТРОЕНИЕ САРКОМЕРА И МЕХАНИЗМ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Функциональной единицей, обеспечивающей сокращение сердечной мышцы, считается саркомер. Саркомер состоит из образованных миозином толстых филаментов, каждый из которых окружен шестью тонкими филаментами, закрепленными своими «+»-концами на Z-диске. Тонкий миофиламент образован фибриллярным актином (F-актином), связанным с двумя нитями тропомиозина и молекулами тропонового комплекса. Фибрилла F-актина образуется за счет полимеризации молекул глобулярного актина и при электронной микроскопии представляется в виде двуцепочечной правозакрученной спирали [125, 126], имеющей бороздки с каждой из сторон (рис. 4). Нить тропомиозина образуется за счет полимеризации  $\alpha$ -спиральных димеров тропомиозина, формирующих суперзакрученную спираль [127]. При этом концы димеров частично перекрываются с соседними димерами «хвост к голове», что приводит к образованию протяженной нити тропомиозина, которая располагается в каждой из двух бороздок F-актина [128]. Взаимодействия актина и тропомиозина имеет нековалентный характер [129], при этом каждый димер тропомиозина взаимодействует с 7 молекулами актина тонкого филамента [130].

Тропоновый комплекс расположен на тонком филаменте через каждые 7 мономеров актина, таким образом стехиометрическое

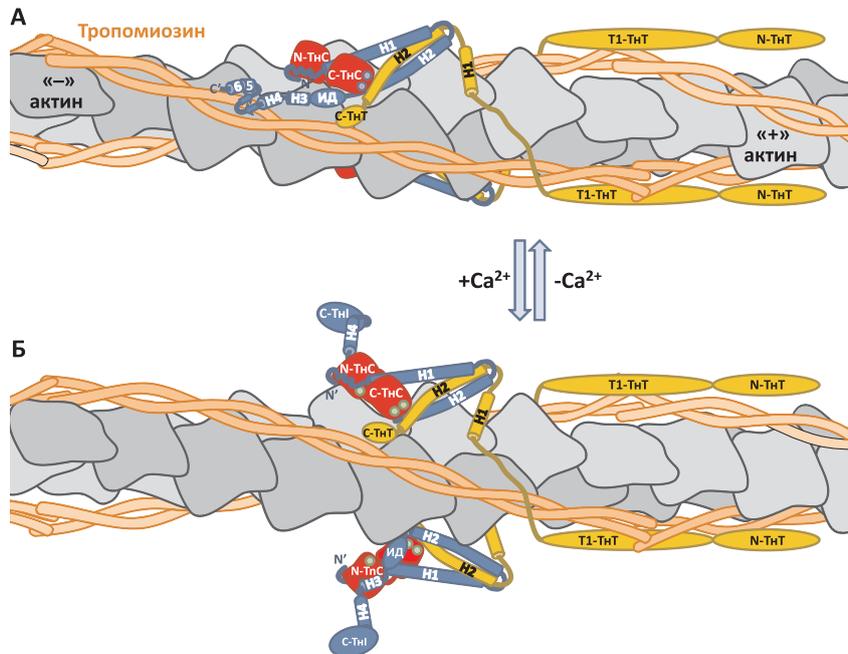


Рис. 4. Схема строения тонкого филамента при низких (А) и высоких (Б) концентрациях  $Ca^{2+}$ .

TnI отмечен голубым цветом, TnC – красным, TnT – желтым. Расположение и взаимодействия белков тропонинового комплекса отображены согласно моделям [62, 67, 86, 87, 109]. При низких концентрациях  $Ca^{2+}$  II EF-рука в N-концевом домене TnC (N-TnC) не заполнена ионами, а III и IV EF-руки C-концевого домена (C-TnC) связывают ионы  $Ca^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  (фиолетовые кружки) [118]. Ингибиторный домен (ИД) TnI взаимодействует с актином (серый). Предполагается, что мобильный домен TnI имеет вторичную структуру [85] и способен взаимодействовать с актином и тропомиозином (оранжевый) [85, 87–89]. C-концевой участок TnT (C-TnT) также взаимодействует с актином и тропомиозином, дополнительно стабилизируя молекулу тропонинового комплекса [111–113]. Молекула тропомиозина блокирует участок взаимодействия миозина с актином. Повышение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (зеленые кружки) и его связывание с N-концевым доменом TnC приводит к изменению конформации TnC, диссоциации ингибиторного и мобильного доменов тропонина I от актина и взаимодействию H3  $\alpha$ -спирали TnI с N-концевым доменом TnC. Отделившись от актина, мобильный домен TnI переходит в неупорядоченное подвижное состояние [86, 87, 109]. Данные структурные изменения позволяют молекуле тропомиозина сместиться вглубь бороздки F-актина, что открывает участок взаимодействия актина с миозином и приводит к развитию мышечного сокращения.

соотношение актин:тропомиозин:тропонин составляет 7:1:1 [131] (рис. 4). Присоединение тропоминового комплекса к микрофиламенту осуществляется преимущественно за счет взаимодействий тропонина Т с тропомиозином. Также во взаимодействии тропоминового комплекса с тонким филаментом участвует ТnI, ингибиторный и мобильный домены которого в отсутствие ионов  $Ca^{2+}$  взаимодействуют с актином [132, 133]. Предполагается также, что мобильный домен ТnI способен взаимодействовать с тропомиозином [134, 135].

Сокращение сердечной мышцы происходит благодаря скольжению тонких актиновых филаментов относительно толстых миозиновых. Данный процесс обеспечивается за счет циклического АТФ-зависимого взаимодействия миозина и актина. Миозин связывает и гидролизует АТФ до АДФ и неорганического фосфата, но при этом практически не способен избавляться от накопившихся в активном центре продуктов АТФазной реакции. Головка миозина (субфрагмент S1 миозина), содержащая в своем составе АДФ и фосфат, способна слабо взаимодействовать с актином, что активирует процесс освобождения фосфата из активного центра S1-миозина. Освобождение неорганического фосфата (а вслед за этим и АДФ) из активного центра миозина сопровождается изменением ориентации «шейки» головки миозина, протягиванием нити актина относительно головки миозина и развитием натяжения. Связывание новой молекулы АТФ приводит к диссоциации S1-миозина от актина и после гидролиза АТФ происходит очередное циклическое присоединение головки миозина к актину и осуществляется новый «шаг» миозина по актину [136, 137].

#### РОЛЬ ТРОПОМИНОВОГО КОМПЛЕКСА В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Сокращение гладкой и поперечнополосатой мускулатуры развивается при повышении концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме миоцита. Однако, в отличие от гладких мышц, где образование актомиозинового комплекса в основном регулируется за счет  $Ca^{2+}$ -зависимого фосфорилирования одной из легких цепей молекулы миозина (MLC20) [138],  $Ca^{2+}$ -зависимая регуляция сокращения сердечной и скелетной мускулатуры основана на изменении структуры тонких филаментов [139, 140].

На данный момент предложено несколько моделей регуляции сокращения кардиомиоцитов: трехстадийная модель [140–142], «fly casting» модель [82, 143], а также четырехстадийная модель [87, 144].

Согласно трехстадийной модели, белки тонкого филамента могут находиться в трех состояниях: в заблокированном В-положении (от

англ. blocked), закрытом С-положении (от англ. closed) и открытом миозин-связанном М-положении [141]. Во время диастолы при низких (~100 нМ [145]) цитоплазматических концентрациях свободного  $\text{Ca}^{2+}$  тонкий филамент находится в В-положении. При этом ингибиторный домен ТnI связывается с молекулой F-актина и смещает молекулу тропомиозина на периферию бороздки актина, что приводит к стерическому блокированию участка связывания миозина с тонким филаментом [146]. Смещению тропомиозина также способствует взаимодействие с ним Т2 участка ТnT, усиливающееся в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [107].

Распространение потенциала действия по мышечному волокну в начале систолы приводит к выходу ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из саркоплазматического ретикулума и повышению концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме (до ~1 мкМ [145]). Присоединение  $\text{Ca}^{2+}$  ко второй EF-руке с/мсТnС приводит к изменению конформации всего N-концевого домена белка. При этом происходит отдаление  $\alpha$ -спиралей В и С от  $\alpha$ -спиралей А и D [147–149] и появлению на поверхности N-концевого домена тропонина С гидрофобной области, с которой связывается регуляторный домен ТnI [80, 150, 151]. В отличие от быстрой скелетной изоформы ТnС, связывание  $\text{Ca}^{2+}$  со второй EF-рукой не приводит к изменению конформации с/мсТnС от полностью закрытой (со спрятанными гидрофобными участками и почти антипараллельной ориентацией спиралей, фланкирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие участки) на полностью открытую (с доступными гидрофобными участками и спиральями, фланкирующими  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие участки, ориентированными друг относительно друга под углом  $90^\circ$ ) [116, 150]. При связывании кальция N-концевой домен с/мсТnС остается в «полуоткрытой» конформации [116, 152], и считается, что для ее стабилизации необходимо присутствие регуляторного домена сТnI [80, 153]. Взаимодействие регуляторного домена ТnI с ТnС приводит к разрыву связи между ингибиторным доменом ТnI и актином, некоторому смещению молекулы тропомиозина вглубь бороздки F-актина и к образованию слабого контакта между S1-миозином и актином (С-состояние). Данное взаимодействие не ведет к полной активации актомиозинового мостика, но способствует дальнейшему смещению молекулы тропомиозина вглубь бороздки актина [154]. В М-состоянии тропомиозин окончательно смещается вглубь бороздки F-актина, полностью открывая участок связывания головки миозина с актином [155–157], что приводит к образованию прочного актомиозинового комплекса и развитию АТФ-зависимого мышечного сокращения [140]. При снижении цитоплазматической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$

происходит изменение конформации с/мсТnC, которое приводит к разрыву контакта регуляторного домена чсТнI с N-концевым доменом с/мсТnC и смещению ингибиторного домена чсТнI в сторону актина. Возобновляющееся взаимодействие ингибиторного домена ТнI с актином сдвигает молекулу тропомиозина к внешней стороне микрофиламента, блокируя участок связывания миозина с актином, что предотвращает образование актомиозиновых комплексов и приводит к расслаблению мышцы. Развитие трехстадийной модели было предложено в работе Robinson *et al* [158], где методом FRET было показано, что в отсутствие S1-миозина только 50% насыщенного  $Ca^{2+}$  комплекса актина с тропоином и тропомиозином находилось в активированном состоянии. Данные результаты говорили о том, что только повышения концентрации  $Ca^{2+}$  недостаточно для полной активации сокращения. Добавление S1-миозина и образование прочных актомиозиновых комплексов стабилизировало активное состояние тонкого филламента. Robinson *et al* предположили, что миозин также оказывает влияние на средство ТnC к  $Ca^{2+}$ , регулируя скорость диссоциации регуляторного домена ТнI от N-концевой доли ТnC [158]. Похожие результаты были получены группой Houmeida *et al* [159] с использованием нативного тропоинового комплекса сердца свиньи, где методом спектроскопии в остановленном потоке было показано, что для полной активации тонкого филламента необходимо присутствие как  $Ca^{2+}$ , так и S1-миозина, а добавление только одного из агентов приводило лишь к ~70% активации филламента. Работы, посвященные более детальному исследованию строения компонентов актомиозинового комплекса и кинетики их взаимодействия, привели к созданию новых моделей регуляции мышечного сокращения.

Исследования структуры скелетного ТнI привели к появлению «flycasting» модели мышечного сокращения (модель «нахлыста», термин, описывающий заброс приманки при помощи спиннинга), согласно которой важную регуляторную роль играет С-концевой мобильный домен скелетной изоформы ТнI [143]. Предполагается, что в отсутствие  $Ca^{2+}$  мобильный домен ТнI принимает конформацию, состоящую из Н4  $\alpha$ -спирали, за которой следуют две короткие антипараллельные  $\beta$ -складки и две  $\alpha$ -спирали. В данной конформации мобильный домен взаимодействует с актином, стабилизируя неактивное состояние актинового филламента. Регуляторный домен ТнI не имеет вторичной структуры и свободно располагается между актином и N-концевым доменом ТnC. Повышение концентрации  $Ca^{2+}$  приводит к взаимодействию N-концевого домена ТnC с регуляторным доменом ТнI и приобретению последним  $\alpha$ -спиральной

структуры [143]. Затем происходит разрыв связей между мобильным доменом ТnI и актином, при этом мобильный домен переходит в подвижное неупорядоченное состояние. Данные структурные изменения стимулируют диссоциацию ингибиторного домена ТnI от актина и его ассоциацию с DE-линкером ТnС. Открытое состояние ТnС стабилизируется взаимодействием с регуляторным доменом ТnI, однако возобновляющиеся при снижении концентрации  $Ca^{2+}$  электростатические взаимодействия мобильного домена с актином стимулируют диссоциацию регуляторного домена ТnI от N-концевого домена ТnС, взаимодействие ингибиторного и мобильного доменов ТnI с актином и переход мышцы в расслабленное состояние [143].

Четырехстадийная модель мышечного сокращения, предложенная Lehger [144] и подтвержденная в недавней работе Zhou *et al* [87], в целом объединяет и дополняет предложенные ранее схемы сокращения кардиомиоцитов. Согласно данной модели, тонкий филамент может находиться в четырех структурных состояниях: блокированном  $Mg^{2+}$ -состоянии, закрытом  $Ca^{2+}$ -состоянии и открытых  $Mg^{2+}$ -S1- и  $Ca^{2+}$ -S1-состояниях [87, 144] (рис. 5). В блокированном  $Mg^{2+}$ -состоянии, соответствующем В-стадии трехстадийной модели, взаимодействие ингибиторного домена ТnI с актином смещает молекулу тропомиозина и препятствует образованию актомиозиновых

Рис. 5. Схема четырехстадийной модели мышечного сокращения.

ТnI отмечен голубым цветом, ТnС – красным, ТnТ – желтым. В блокированном состоянии (1) ингибиторный и мобильный домены ТnI взаимодействуют с актином (серый) и тропомиозином (оранжевый), и препятствуют образованию актомиозинового комплекса. При этом EF-рука, находящаяся в N-концевом домене ТnС, не заполнена ионами  $Ca^{2+}$ , в то время как обе EF-руки С-концевого домена связывают ионы  $Ca^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  (фиолетовые кружки). Деполяризация мембраны кардиомиоцита приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция и связыванию  $Ca^{2+}$  (зеленые кружки) с N-концевым доменом ТnС. Данное взаимодействие приводит к изменению конформации ТnС, диссоциации ТnI от актина и его ассоциации с ТnС. Это позволяет молекуле тропомиозина несколько сместиться в сторону бороздки актина и способствует возникновению слабого контакта между S1-миозином (фиолетовый) и актином (закрытое состояние (2)). Взаимодействие миозина с актином вызывает еще большее смещение молекулы тропомиозина вглубь бороздки актина, образованию прочного актомиозинового комплекса и переходу системы в открытое  $Ca^{2+}$ -S1-состояние (3). Альтернативный путь активации микрофиламента заключается в переходе из блокированного состояния в открытое  $Mg^{2+}$ -S1-состояние (4), стимулируемом связыванием S1-миозина с актином в отсутствие кальция. Предполагается, что переход в  $Mg^{2+}$ -S1-состояние может способствовать присоединению  $Ca^{2+}$  к N-концевому домену ТnС и переходу тропомиозинового комплекса в открытое состояние. По материалам [87, 160].

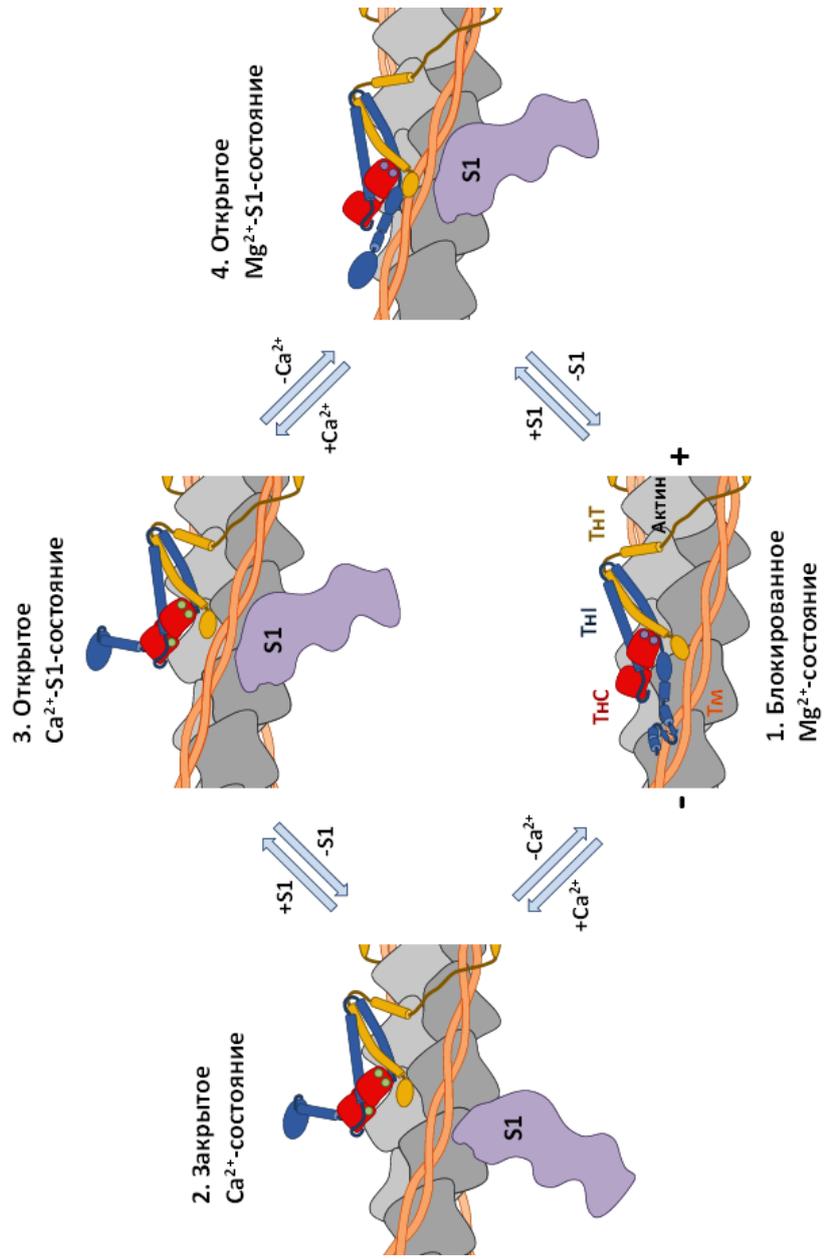


Рис. 5.

мостиков. Мобильный домен ТnI дополнительно стабилизирует тропониновый комплекс на поверхности тонкого филамента, взаимодействуя с актином и, возможно, тропомиозином. Повышение концентрации  $Ca^{2+}$  вызывает относительно быструю диссоциацию мобильного домена ТnI от тонкого филамента и переход мобильного домена в подвижное состояние. Затем следует взаимодействие регуляторного домена с N-концевым доменом ТnС, что приводит к диссоциации ингибиторного домена ТnI от актина (закрытое  $Ca^{2+}$ -состояние, соответствующее С-положению трехстадийной модели). Молекула тропомиозина полностью смещается вглубь бороздки актина, что приводит к образованию прочных актомиозиновых мостиков и развитию мышечного сокращения (открытое  $Ca^{2+}$ -S1-состояние, соответствующее М-положению трехстадийной модели). В  $Mg^{2+}$ -S1 состоянии, представляющем альтернативный путь активации тонкого филамента, S1 фрагмент миозина способен взаимодействовать с актином в отсутствие  $Ca^{2+}$ . Предполагается, что данное взаимодействие смещает молекулу тропомиозина, что, в свою очередь, приводит к диссоциации мобильного домена ТnI от актина и взаимодействию регуляторного домена ТnI с ТnС, увеличивая чувствительность последнего к концентрации  $Ca^{2+}$  [144]. Несмотря на то, что перехода в  $Mg^{2+}$ -S1 состояние недостаточно для полноценного развития мышечного сокращения, которое происходит только при связывании  $Ca^{2+}$  с N-концевой глобулой ТnС, данное взаимодействие способствует переходу тонкого филамента в активное состояние и образованию прочного актомиозинового комплекса [87].

Расслабление мышцы при понижении концентрации кальция согласно четырехстадийной модели происходит в два этапа, различающихся по своей скорости. На первом (быстром) этапе происходит диссоциация  $Ca^{2+}$  из N-концевого домена ТnС, что приводит к взаимодействию мобильного домена ТnI с актином и отрыву регуляторного домена ТnI от ТnС. Данные структурные изменения стимулируют более медленную диссоциацию ингибиторного домена ТnI от ТnС и ассоциацию ингибиторного домена ТnI с актином. Присутствие S1-миозина препятствует взаимодействию мобильного домена ТnI с актином и, таким образом, стабилизирует открытую конформацию ТnС, дополнительно замедляя процесс расслабления мышцы. В результате скорость смещения ингибиторного домена ТnI оказывается сравнимой со скоростью образования актомиозинового комплекса и, таким образом, данный этап может оказывать влияние на скорость мышечного расслабления [87, 160].

Связывание S1-миозина с актином в отсутствие  $Ca^{2+}$ , приводящее к формированию открытого состояния тонкого филамента, позволяет дать объяснение таким особенностям функционирования сердечной мускулатуры, как зависимость от длины активация кардиомиоцитов [161], медленное расслабление миоцитов при снижении концентрации кальция, и увеличенную чувствительность тонкого филамента к кальцию при образовании актомиозинового комплекса [144].

Согласно существующим моделям, тропоновый комплекс играет важную роль в регуляции сердечного сокращения. Изменения конформации компонентов тропонового комплекса обеспечивают развитие сокращения при повышении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  и расслабление сердечной мускулатуры при ее снижении. Более того, особенности строения белков, входящих в состав тропонового комплекса, позволяют осуществлять тонкую регуляцию данных процессов, что дает возможность сердечной мышце приспосабливаться к разнообразным физиологическим и патологическим состояниям. Некоторые из механизмов регуляции функционирования тропонового комплекса и их роль в адаптации сердечной мышцы к различным условиям обсуждаются в следующих разделах.

#### ТРОПОНОВЫЙ КОМПЛЕКС И РЕГУЛЯЦИЯ СИЛЫ СОКРАЩЕНИЯ МЫШЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ЕЕ РАСТЯЖЕНИЯ. ЗАКОН ФРАНКА-СТАРЛИНГА

Согласно закону Франка-Старлинга, сила мышечного сокращения увеличивается пропорционально растяжению мышцы. Особенно эта зависимость выражена в сердечной мышце, где сила сокращения миокарда увеличивается при большем наполнении желудочков кровью [162]. Данный механизм позволяет синхронизовать объем сердечного выброса с объемом крови, поступающим в сердце из вен. Увеличенный объем поступающей в сердце крови в большей степени растягивает стенки желудочка, что приводит к увеличению силы сокращения мышцы и, в результате, объема сердечного выброса. Молекулярные механизмы, приводящие к такому эффекту, до конца не понятны. Предполагается, что причиной увеличения сердечного выброса может служить повышение чувствительности миофиламента к ионам  $Ca^{2+}$ , уменьшение расстояния между тонкими и толстыми филаментами, усиление кооперативности мышечного сокращения [163, 164].

Данные многих исследований указывают на то, что тропоновый комплекс может принимать участие в регуляции зависимой от растяжения силы сокращения сердечной мышцы [165, 166]. В

экспериментах с трансгенными мышами было показано, что замена сердечной изоформы ТnI на медленную скелетную изоформу этого белка приводила к снижению данной зависимости и увеличению сродства ТnС к  $Ca^{2+}$  [165, 167]. И, наоборот, в экспериментах на скинированных скелетных миоцитах кролика было показано, что замена скелетного тропонина на сердечный тропонин свиньи приводила к усилению зависимости силы сокращения от растяжения мышцы и снижению сродства ТnС к  $Ca^{2+}$  [166]. Также было установлено, что фосфорилирование сердечной изоформы ТnI по остаткам S23 и S24 протеинкиназой А (РКА) оказывает значительное влияние на эффект Франк-Старлинга в сердечной мускулатуре, снижая чувствительность мышцы к  $Ca^{2+}$  [167, 168].

Причины, по которым сердечная изоформа ТnI оказывает большее, чем скелетные изоформы белка, влияние на зависимость от растяжения силу сокращения миоцитов, остаются не до конца изученными. В работе Tachampra *et al* [169] предполагается, что важную роль в регуляции данного процесса может играть остаток T144, расположенный в ингибиторном домене сердечной изоформы ТnI. В скелетных изоформах белка в данной позиции располагается пролин. Замена данного аминокислотного остатка на треонин приводила к увеличению зависимости Франка-Старлинга практически до уровня, характерного для сердечной изоформы белка [169].

#### ВЛИЯНИЕ АЦИДОЗА НА СОКРАЩЕНИЕ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Сердечная мускулатура крайне чувствительна к падению внутриклеточного рН (ацидозу). Понижение значения рН ниже физиологического уровня снижает эффективность сердечных сокращений, нарушает  $Ca^{2+}$ -зависимую регуляцию, а также может приводить к возникновению аритмии [170–172]. Физиологические флуктуации значений рН возникают при изменении сердечных нагрузок и учащении сердечного ритма [173]. Опасное понижение внутриклеточного рН (до значений 6,5 и ниже [174, 175]), обусловленное накоплением продуктов метаболизма, в т.ч. лактата [176], наблюдается при продолжительной ишемии сердечной мускулатуры.

Тропониновый комплекс играет важнейшую роль в чувствительности сократительного аппарата к понижению рН [21, 177, 178]. Так, отмечалось, что эмбриональные миоциты, в которых экспрессируется медленная скелетная изоформа тропонина I, значительно меньше подвержены влиянию ацидоза, нежели кардиомиоциты взрослого организма [14, 179]. Замена сердечной изоформы ТnI на медленную скелетную в первичной культуре кардиомиоцитов крысы приводила

к понижению, по сравнению с контролем, порога активации ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и повышала значение  $p\text{Ca}_{50}$  при понижении pH (до значения 6,2) [21]. Похожие результаты были получены в экспериментах на трансгенных мышцах, у которых сердечная изоформа белка была заменена на медленную скелетную [19].

В экспериментах, проведенных на мышцах, было показано, что различия в чувствительности изоформ тропонина к изменению pH могут быть обусловлены заменой одного аминокислотного остатка, расположенного в регуляторном домене сердечной изоформы TnI – A164 (гомологичен A163 последовательности чсTnI). В молекуле скелетной изоформы TnI в данной позиции находится гистидин. Перфузия изолированных сердец мышей дикого типа буфером с низким pH (pH 6,8) быстро приводила к нарушениям в работе левого желудочка и понижению создаваемого им давления крови. В то же время сердца трансгенных мышей, у которых остаток H164 был заменен на аланин, оказались гораздо более устойчивыми к понижению pH [180]. Указанная мутация ослабляла негативный эффект ишемии-реперфузии и уменьшала длительность аритмии [180]. Аналогичное восстановление чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  при понижении pH до 6,5 наблюдалось и в условиях *in vitro* при использовании мутантного A163H чсTnI человека [178]. Недавнее исследование, проведенное с использованием пептида, соответствующего ингибиторному домену чсTnI, в который была введена замена A163H, показало, что H163 взаимодействует с остатками E15 и E19 чсTnC [181]. Авторы предполагают, что повышение положительного заряда боковой группы гистидина, происходящее при понижении pH, приводит к усилению взаимодействия ингибиторного домена мутантного сTnI с N-концевым доменом TnC, что стабилизирует открытую конформацию последнего и приводит к увеличению чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  [181].

Тропонин T также может оказывать влияние на работу сердечной мышцы при понижении pH. Однако интересно, что в отличие от TnI, сердечная изоформа тропонина T более устойчива к изменению внутриклеточного pH, чем скелетные изоформы белка. Так, замена сердечной изоформы TnT на быструю скелетную изоформу белка приводила к увеличению влияния снижения pH на сокращение мышцы по сравнению с мышцей дикого типа *in vitro*. У трансгенных мышей при понижении pH до 6,5 наблюдалось снижение максимальной силы сокращения и  $p\text{Ca}_{50}$  по сравнению с контролем [182].

## V. ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ КОМПОНЕНТОВ ТРОПОНИНОВОГО КОМПЛЕКСА НА РЕГУЛЯЦИЮ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Одним из важнейших механизмов регуляции биохимической активности белков является фосфорилирование. В различных исследованиях было показано, что ТnT и ТnI могут подвергаться фосфорилированию различными протеинкиназами, и данные посттрансляционные модификации оказывают существенное влияние на конформацию и свойства тропонинового комплекса. Нарушение механизмов фосфорилирования тропонинов может быть связано с развитием различных патологий сердечной мускулатуры, что также подтверждает важную роль данных модификаций в функционировании тропонинового комплекса.

### ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ТРОПОНИНА I

В экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также методом компьютерного анализа *in silico* [183] было идентифицировано множество аминокислотных остатков сердечной изоформы тропонина I, способных подвергаться фосфорилированию. Так, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* описано 17 аминокислотных остатков, которые потенциально могут быть фосфорилированы различными протеинкиназами [183–194] (рис. 6). Функциональная значимость фосфорилирования некоторых из этих аминокислотных остатков в ТnI *in vivo* на данный момент еще не до конца изучена, но есть участки, фосфорилирование которых подробно исследовано, и поэтому не приходится сомневаться в том, что данный тип посттрансляционных модификаций тропонина I является важнейшим механизмом регуляции мышечного сокращения.

### ПРОТЕИНКИНАЗА A

При повышенных нагрузках (например, при физических упражнениях) организму требуется более интенсивный приток богатой кислородом крови к органам. Эта потребность обеспечивается за счет увеличения объема сердечного выброса и увеличения частоты сердечных сокращений. Данные процессы находятся под контролем симпатической нервной системы, активирующей  $\beta$ -адренергические рецепторы кардиомиоцитов [195]. Одним из важнейших мессенджеров, появляющихся в кардиомиоцитах при  $\beta$ -адренергической стимуляции, является цАМФ, активирующий РКА. Основными белками-мишенями РКА, участвующими в регуляции сердечного сокращения, являются белки миофиламента: миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) [196], титин [197, 198], ТnI [199–201], а также белки,

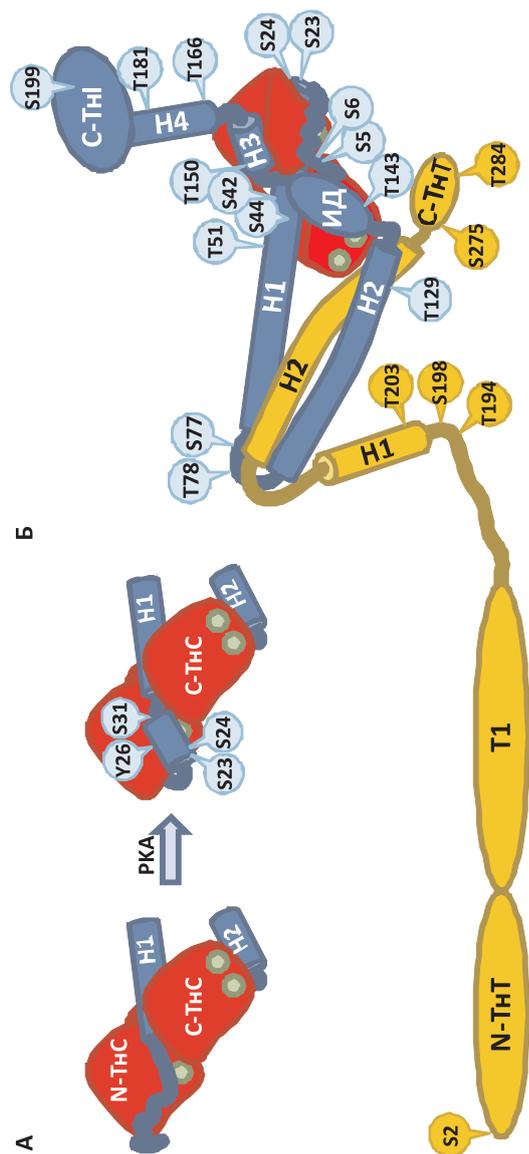


Рис. 6. Расположение участков фосфорилирования ТnI и ТnT в тропоиновом комплексе.

ТnI отмечен голубым цветом, ТnC – красным, ТnT – желтым. Фосфорилируемые аминокислотные остатки ТnI обозначены голубыми кружками, ТnT – желтыми кружками. Зеленые кружки – ионы кальция. Тропоиновый комплекс изображен в открытом  $Ca^{2+}$ -связанном состоянии.

А – схема изменения конформации N-концевого домена чсТnI при фосфорилировании остатков S21 и S22 по материалам [62]. В дефосфорилированном состоянии остатки 1–31 ТnI взаимодействуют с N-концевым доменом ТnC. Предполагается, что фосфорилирование S23 и S24 приводит к образованию  $\alpha$ -спирали остатками 21–30 и смещению кислото N-концевого участка ТnI (остатки 2–11) к ингибиторному домену (ИД) ТnI (рис. 6 Б). Дополнительно указано положение остатков Y26 и S31, закрытых N-концевым доменом чсТnC на рис. 6Б.

Б – схема расположения известных аминокислотных остатков ТnI и ТnT, подвергнутых фосфорилированию [183–194, 242–247].

участвующие в связывании и транспорте ионов  $\text{Ca}^{2+}$ : фосфоламбан [202], дигидропиридиновый и рианоудиновый рецепторы [203, 204]. РКА-зависимое фосфорилирование белков миоцита приводит к усилению работы сердечной мышцы. Этот эффект достигается как за счет увеличения силы сокращения (инотропный эффект), так и за счет увеличения скорости расслабления сердечной мышцы при повышенной частоте сердечных сокращений (люзитропный эффект), что необходимо для нормального наполнения сердца кровью во время диастолы. Инотропное действие РКА реализуется, в основном, за счет фосфорилирования кальциевых каналов (дигидропиридиновых и рианоудиновых рецепторов), что приводит к увеличению выхода кальция из цистерн ретикулума и увеличению входа  $\text{Ca}^{2+}$  снаружи внутрь кардиомиоцитов. Оба этих процесса приводят к повышению концентрации кальция в цитоплазме [203]. Люзитропное действие РКА реализуется за счет фосфорилирования сМуВР-С, фосфоламбана и ТnI, что приводит к увеличению скорости расслабления сердечной мышцы. Данный эффект может быть достигнут за счет снижения чувствительности миоцитов к  $\text{Ca}^{2+}$ , а также за счет увеличения скорости образования актомиозиновых мостиков. Предполагается, что фосфорилирование ТnI РКА может оказывать влияние на оба пути расслабления мускулатуры [205–208].

Особый интерес к активности РКА связан также и с тем, что данная протеинкиназа фосфорилирует аминокислотные остатки S23 и S24 цТnI [60, 184, 185, 209], которые расположены в уникальной N-концевой части молекулы цТnI, отсутствующей у скелетных изоформ белка. Таким образом, фосфорилирование РКА представляет собой механизм регуляции мышечного сокращения, характерный только для сердечной, но не скелетной мускулатуры. Согласно данным масс-спектрометрического исследования тропонина, аффинно выделенного из сердец животных и человека, в норме в полностью дефосфорилированном состоянии находится около половины молекул ТnI, в то время как оставшаяся часть молекул представлена моно- или бифосфорилированной формами белка. Так, было показано, что  $41 \pm 3\%$  тропонина I, выделенного из сердец крыс, находилось в полностью дефосфорилированной форме,  $46 \pm 1\%$  – в монофосфорилированной форме,  $13 \pm 3\%$  – в бифосфорилированной форме [210]. В работе Van Der Velden *et al* при исследовании образцов сердечной ткани человека, полученных путем биопсии у здоровых доноров, было показано, что  $48,9 \pm 10,0\%$  тропонина I полностью дефосфорилировано,  $21,6 \pm 9,8\%$  находится в монофосфорилированной форме и  $29,5 \pm 11,3\%$  – в бифосфорилированной форме [184]. Похожие

результаты (50,5±5,9% дефосфорилировано, 38,6±3,8% монофосфорилировано и 10,9±2,2% бифосфорилировано) были получены в исследовании Zhang et al [185]. При этом в исследованиях [185, 210] отмечалось, что только S23 фосфорилирован в случае монофосфорилированной формы тропонина I.

В работе Howarth et al [62] методом ЯМР было показано, что бифосфорилирование пептида, содержащего остатки 1–32 ТnI, по S23 и S24 приводит к значительным конформационным изменениям данного участка. Предполагается, что в отсутствие фосфорилирования участок 1–32 молекулы cТnI находится в неструктурированном состоянии и взаимодействует с N-концевой глобулой ТnС. Фосфорилирование S23 и S24 приводит к образованию аминокислотными остатками 21–30  $\alpha$ -спиральной структуры, диссоциации N-концевой части ТnI от ТnС и ее смещению к ингибиторному домену ТnI (рис. 6 А). Согласно гипотезе, выдвинутой авторами, именно взаимодействие N-концевого домена с ингибиторным доменом cТnI опосредует эффекты фосфорилирования ТnI РКА [62].

Роль фосфорилирования S23 и S24 РКА в снижении чувствительности сердечной мышцы к ионам  $Ca^{2+}$  и увеличении скорости расслабления миоцитов подтверждена многочисленными исследованиями, проведенными как *in vitro*, так и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* с фрагментами и целыми молекулами cТnI и cТnС мышши фосфорилирование остатков S23 и S24 приводило к снижению чувствительности комплекса ТnI–ТnС к ионам  $Ca^{2+}$  и снижению сродства ТnI к ТnС [211, 212]. В экспериментах *in vivo* с трансгенными мышами, у которых сердечная изоформа тропонина I была заменена на медленную скелетную изоформу, в которой отсутствует участок фосфорилирования РКА, была отмечена более низкая скорость расслабления сердечной мышцы, чем у мышей дикого типа. Также в миоцитах мутантных мышей наблюдалась повышенная по сравнению с миоцитами дикого типа чувствительность к  $Ca^{2+}$  [20, 213]. Аналогичные эффекты были отмечены у трансгенных мышей при замене в сердечной изоформе ТnI остатков S23 и S24 на аланины, фосфорилирование которых невозможно [214, 215]. И наоборот, при замене S23 и S24 на остатки аспарагиновой кислоты, имитирующей фосфорилирование, у мутантных мышей наблюдалось повышенное расслабление миоцитов левого желудочка по сравнению с мышами дикого типа [216]. Схожие результаты были получены *in vitro* с использованием препарата скинированных кардиомиоцитов человека, в которых нативный тропониновый комплекс был заменен на реконструированный комплекс, содержащий мутантный по одному

или обоим остаткам серина cTnI [208]. При этом было показано, что данный эффект наблюдается только при одновременной замене двух остатков серина, в то время как одиночные замены не приводили к достоверному снижению чувствительности к  $Ca^{2+}$  [208].

В то же время данные о влиянии фосфорилирования cTnI на скорость образования актомиозинового комплекса и силу сокращения кардиомиоцитов противоречивы. В работах, проведенных на препаратах скинированных миофибрилл мыши и свиньи, было отмечено, что РКА-зависимое фосфорилирование TnI усиливает скорость образования актомиозинового комплекса, а также скорость и силу сокращения кардиомиоцитов [206, 207]. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с препаратами скинированных вентрикулярных миоцитов крысы [201]. Однако в другом исследовании, проводившемся на препаратах скинированных трабекул и миоцитов крысы, не было отмечено изменений в  $Ca^{2+}$ -активируемой изометрической скорости образования актомиозинового комплекса под воздействием РКА [217]. Также не было найдено достоверного изменения в скорости образования актомиозинового комплекса и в силе сокращения миоцитов трансгенных мышей, у которых S23 и S24 были заменены на аспартаты [208, 216]. В работах Stelzer *et al* [218] и Chen *et al* [219] было показано, что зависимое от протеинкиназы А ускорение образования актомиозиновых комплексов происходит не из-за фосфорилирования TnI, а благодаря фосфорилированию cMyBP-C.

Фосфорилирование тропонина I РКА может играть важную роль в развитии патологий сердца. Установлено, что у больных с терминальными стадиями сердечной миопатии чувствительность к  $Ca^{2+}$  повышена по сравнению со здоровыми донорами [184]. Также было отмечено значительное снижение уровня фосфорилирования TnI по остаткам S23 и S24 у больных с сердечной недостаточностью и кардиомиопатией [183, 185, 220]. Однако на данный момент не понятно, являются ли различия в фосфорилировании причиной или следствием развития сердечных заболеваний.

#### ПРОТЕИНКИНАЗА С

Обобщенное наименование «протеинкиназа С» (PKC) подразумевает обозначение большого семейства серин/треониновых киназ. Данное семейство состоит из трех подсемейств: «традиционных» (conventional) киназ (изоформы PKC $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 и  $\gamma$ ), «новых» (novel) киназ (изоформы PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  и  $\theta$ ), а также «атипичных» (atypical) киназ (PKC $\zeta$  и  $\iota$ ), различающихся по структуре доменов, отвечающих за внутриклеточную локализацию белка на мембране [221]. В кар-

диомиоцитах взрослого человека экспрессируются  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  изоформы РКС [221, 222]. В исследованиях было установлено, что данные изоформы взаимодействуют со многими белками, участвующими в регуляции сердечного сокращения, в том числе с ТнI [223], ТнТ [224], MyBP-C [225] и титином [226].

В экспериментах *in vitro* было показано, что основными аминокислотными остатками, по которым идет фосфорилирование чсТнI данным семейством киназ, являются остатки S23, S24 [186–188], S42, S44, T143 [189] (последовательность чсТнI). При этом разные изоформы данной протеинкиназы обладают различной специфичностью по отношению к белку. С использованием сердечной изоформы ТнI быка было показано, что РКСа фосфорилирует преимущественно аминокислотные остатки S42, S44, а протеинкиназа РКС $\delta$  – S23, S24 [186]. В исследованиях, проведенных на сердечной изоформе ТнI мыши, было показано, что РКС $\beta$  и РКС $\epsilon$  фосфорилируют остатки S23, S24 и T144 (T143 последовательности чсТнI), но не S42, S44 [188]. В то же время в другом исследовании отмечено, что при фосфорилировании ТнI *in vitro*, предпочтительным участком фосфорилирования РКС $\beta$  является S44 [227]. В экспериментах с кардиомиоцитами крысы *in vitro* было показано, что «атипичная» изоформа РКС $\zeta$ , экспрессия которой была определена в кардиомиоцитах крыс [228], фосфорилирует исключительно остаток T143 [229].

Данные о влиянии фосфорилирования чсТнI протеинкиназой С на функционирование тропонового комплекса во многом противоречивы. В целом, физиологический эффект фосфорилирования РКС противоположен эффекту РКА [230]. Замена S23 и S24 (участки фосфорилирования РКА) у мышей на остатки аспарагиновой кислоты приводила к увеличению скорости расслабления и мышечного сокращения при нагрузке. В то же время одновременное мутирование S23D, S24D и S43D, S45D, T144D (остатки, фосфорилируемые РКС, гомологичны, соответственно, S42, S44 и T143 чсТнI) нивелировали этот эффект [231]. Миоциты трансгенных мышей, у которых в сердечной изоформе тропонина S43 и S45 были заменены на нефосфорилируемые аланины, обладали, по сравнению с клетками мышей дикого типа, повышенной способностью к контрактуре, вызванной ишемией [232]. При замене остатков S43, S45 и T144 на глутаминовую кислоту, что имитирует фосфорилирование, у трансгенных мышей было отмечено снижение активных сокращений и замедленное расслабление сердечной мышцы, сниженный ответ на  $\beta$ -адренергическую стимуляцию, снижение максимальной силы сокращения без изменения в чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  [233]. Однако в работе, проведенной на скинированных миоцитах мыши, в которых

нативный тропонин I был заменен на аналогичные мутанты, отмечалось как снижение скорости мышечного сокращения, так и снижение чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  [234]. Аналогичные результаты (снижение максимальной  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой силы сокращения, АТФазной активности и чувствительности к концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ ) были получены при исследовании *in vitro* реконструированного тонкого филамента, содержащего мутантный  $\text{cTnI}$  [235].

Функционирование РКС может иметь важное значение при развитии патологических состояний сердечной мышцы. Экспрессия РКСа и РКС $\delta$  была повышена у крыс со спонтанно возникающей гипертензией, при этом уровень экспрессии РКА и РКС $\beta$  оставался неизменным, а уровень РКС $\epsilon$  снижался. У этих модельных животных также было отмечено увеличение уровня фосфорилирования  $\text{TnI}$  по остаткам S23, S24, S42 и S44 (последовательность  $\text{TnI}$  крысы) [236]. В другом исследовании [225] было установлено, что РКСа и РКС $\epsilon$ -зависимое фосфорилирование  $\text{cTnI}$  в миоцитах больных с дилатационной кардиомиопатией приводит к снижению чувствительности микрофиламента к  $\text{Ca}^{2+}$ , не оказывая влияния на максимальную силу сокращения. Высказывается предположение, что РКС-опосредованное снижение активности сокращения может иметь компенсаторный эффект, предохраняя кардиомиоциты от истощения в условиях повышенной кальциевой нагрузки [237].

#### ДРУГИЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ

В экспериментах *in vitro* было показано, что сердечная изоформа  $\text{TnI}$  может подвергаться фосфорилированию протеинкиназой D [238, 239] и cGMP-зависимой протеинкиназой (PKG) [240] по остаткам S23, S24, p21-активируемой киназой 3 (PAK3) (по остатку S150) [190, 191], протеинкиназой Mst-1 (преимущественно по остатку T31, но также по остаткам, T51, T129, T143) [192], АМФ-зависимой киназой (АМПК) (по остатку S150) [193, 194] (рис. 6 Б).

Фосфорилирование тропонина I также изучалось *in vivo* с использованием масс-спектрометрического анализа аффинно выделенного из образцов сердечной ткани тропонинового комплекса. С использованием данного метода помимо описанных выше аминокислотных остатков было показано фосфорилирование остатков S4, S5, Y25, S76, T77, S166, T180, S198 (нумерация приведена без учета первого метионина) тропонина I, выделенного из образцов миокарда здоровых доноров, а также больных с ишемической болезнью сердца и дилатационной миопатией [61, 183]. Однако, в других исследованиях, проведенных с использованием данного метода, были получены

противоречивые результаты. Так, тропонин I, аффинно выделенный из сердец мышей [241] и крыс [210], был фосфорилирован только по остаткам S23 и S24. Аналогичные данные были получены и при исследовании тропонина, выделенного из образцов сердечной ткани здоровых доноров [184, 185] и у больных с дилатационной или ишемической миопатией [185].

Фосфорилирование  $\text{cTnI}$  протеинкиназой А имеет важное физиологическое значение, снижая чувствительность тропоинового к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  и ускоряя расслабление сердечной мышцы. Данные о физиологических эффектах фосфорилирования тропонина I другими протеинкиназами получены преимущественно в экспериментах *in vitro* или с использованием различных моделей трансгенных животных. Результаты, полученные в работах, посвященных роли РКС и других протеинкиназ в фосфорилировании  $\text{TnI}$  сердца человека, противоречивы, что говорит о необходимости проведения дальнейших исследований в этом направлении *in vivo*.

#### ПОСТТРАНЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ТРОПОНИНА Т

##### Фосфорилирование $\text{cTnT}$

В экспериментах *in vitro* было установлено, что  $\text{cTnT}$ , как и  $\text{TnI}$ , может подвергаться фосфорилированию несколькими протеинкиназами. Так, на различных моделях было показано, что  $\text{TnT}$  может быть фосфорилирован тропонин Т киназой по остатку S2 [242–244], регулирующей сигналы апоптоза киназой-1 (ASK-1) по остаткам T194 и S198 [245], Rho-A-зависимой протеинкиназой (ROCK-II) по остаткам S275 и T284 [246], киназой Raf-1 по остатку T203  $\text{cTnT}$  [247] (рис. 6 Б). В экспериментах с сердцем быка было показано, что в отличие от  $\text{TnI}$ , сердечная изоформа  $\text{TnT}$  не подвергается фосфорилированию РКА [248, 249]. Наиболее изученными протеинкиназами, фосфорилирующими  $\text{cTnT}$ , являются протеинкиназы семейства РКС [248–250]. В экспериментах *in vitro*, проведенных на миоцитах крысы, было установлено, что основными изоформами, способными фосфорилировать  $\text{cTnT}$  являются РКС  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\zeta$  [229]. Также *in vitro* было показано, что фосфорилирование сердечной изоформы  $\text{TnT}$  быка РКС проходит по аминокислотным остаткам T190, S194, T199 и T280 (гомологичны, соответственно, T194, S198, T203 и T284  $\text{cTnT}$ ) [189, 251, 252]. Фосфорилирование  $\text{TnT}$  РКС ингибирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую активацию тонкого филамента и снижает максимально возможное усилие, развиваемое кардиомиоцитами [251, 253, 254].

Согласно данным, полученным *in vitro*,  $\text{cTnT}$  может подвергаться фосфорилированию по различным аминокислотным остаткам. Однако масс-спектрометрический анализ фосфорилирования  $\text{TnT}$ , аффинно выделенного из сердечной мышцы крысы [210], мыши и человека [255], показал, что *in vivo* фосфорилирование данного белка происходит только по одному аминокислотному остатку, а именно по – S2. Эти данные подтверждают первые результаты исследования фосфорилирования сердечного тропонина Т быка [256], в которых S2 также был единственным идентифицированным аминокислотным остатком, подвергающимся фосфорилированию. Этот аминокислотный остаток фосфорилируется тропонин Т киназой [242], и при этом степень фосфорилирования тропонина Т по этому остатку очень высока [210, 255, 256]. Физиологическая роль данной модификации не совсем ясна, так как было показано, что фосфорилирование S2 не оказывает влияния на чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  и образование актомиозинового комплекса [41].

#### *Дефосфорилирование TnI и TnT*

Несмотря на то, что дефосфорилирование белков, участвующих в функционировании сердечной мускулатуры, имеет не менее важное регуляторное значение, чем их фосфорилирование [257–259], роль фосфатаз в модуляции активности тропонинового комплекса исследована крайне поверхностно. В дефосфорилировании  $\text{TnI}$  и  $\text{TnT}$  участвуют протеинфосфатазы 1 и 2А (PP1 и PP2A) [260–263]. Эти широко распространенные фосфатазы [264] принимают участие в регуляции множества биологических процессов, включая клеточное деление, синтез белков, углеводный метаболизм и мышечное сокращение [265, 266]. Можно надеяться, что дальнейшие исследования прольют свет на роль фосфатаз в регуляции функционирования тропонинового комплекса.

#### *Ограниченный протеолиз TnT*

Одним из недавно описанных механизмов адаптации сердечной мышцы является ограниченный протеолиз  $\text{TnT}$ . Протеолиз N-концевой части (остатки 1–71) сердечной изоформы  $\text{TnT}$  был выявлен в миоцитах мышечной и крыс после проведения экспериментальной ишемии-реперфузии и при повышении давления [267, 268]. Протеолитический фрагмент  $\text{TnT}$  также был обнаружен в модельных экспериментах, симулирующих перегрузку кальцием [269]. Было показано, что отщепление остатков 1–71  $\text{TnT}$  происходит под действием каль-

паина-1 ( $\mu$ -кальпаин) [267].

Протеолиз N-концевой части сердечной изоформы ТнТ приводит к изменению конформации центральной и С-концевой части молекулы белка и к снижению сродства ТнТ к ТнI, ТнС и тропомиозину [100, 267]. В *ex vivo* исследованиях сердец трансгенных мышей, экспрессирующих укороченную сердечную изоформу ТнТ (остатки 72–291 тропонина Т мыши), было показано, что указанная замена не приводит к гипертрофии сердечной мышцы и снижению сердечной активности [100]. При этом сердца, в которых экспрессировался мутантный белок, оказались более устойчивы к нагрузкам под давлением, что позволило выдвинуть гипотезу о том, что протеолиз N-концевой части сТнТ является одним из способов компенсаторной адаптации миокарда к возникновению ишемического стресса [268].

## VI. ТРОПОНИНОВЫЙ КОМПЛЕКС И ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕРДЦА

### ТРОПОНИНОВЫЙ КОМПЛЕКС И ТЕРАПИЯ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Являясь одним из ключевых белков-регуляторов сердечного сокращения, тропоновый комплекс играет важную роль в терапии сердечной недостаточности – патологического состояния, при котором сердце не способно прокачивать необходимый организму объем крови. Одной из причин возникновения данной патологии является снижение чувствительности сердечной мышцы к ионам  $Ca^{2+}$ , что приводит к уменьшению силы сокращения и систолической функции сердца. Как было показано выше, ключевую роль в чувствительности сердечной мышцы к  $Ca^{2+}$  играет тропоновый комплекс (в особенности взаимодействия между сТнI и ТнС, а также сродство ТнС к  $Ca^{2+}$ ). На данный момент известен ряд веществ, которые, взаимодействуя с компонентами тропонового комплекса, усиливают чувствительность тонкого филамента к кальцию. К таким агентам относятся бепридил, левосимендан, EMD 57033 и другие [270, 271]. В работах, посвященных исследованиям действия этих веществ, были продемонстрированы различные пути усиления чувствительности кардиомиоцитов к  $Ca^{2+}$ . Методами рентгеноструктурного анализа [272] и ЯМР [273, 274] было показано, что терапевтическое действие бепридила и левосимендана реализуется через непосредственное взаимодействие этих фармакологических соединений с гидрофобным участком на поверхности N-концевого домена тропонина С. Данные взаимодействия приводят к стабилизации открытой конформации

ТнС, т.е. вызывают эффект аналогичный действию, производимому ингибиторным доменом чсТнI [274]. В результате наблюдается снижение скорости диссоциации  $Ca^{2+}$  из второй ЕF-руки сердечной изоформы ТнС, что увеличивает чувствительность тонкого филамента к кальцию. В отличие от описанных выше лекарственных средств, EMD 57033 взаимодействует с С-концевым доменом ТнС [275, 276], нарушая его взаимодействия с остатками 34–71 чсТнI [277]. Предполагается, что данные взаимодействия также приводят к усилению взаимодействия ингибиторного домена ТнI с ТнС [270].

Одним из преимуществ агентов, оказывающих влияние на чувствительность тропонинового комплекса к  $Ca^{2+}$ , является отсутствие повышения внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  [278], наблюдаемое при терапии такими кардиотоническими агентами, как кардиотонические стероиды, катехоламины, ингибитор фосфодиэстеразы цАМФ третьего типа [279]. Данное свойство лекарств, взаимодействующих с ТнС, снижает риск возникновения побочных эффектов, связанных с повышенной кальциевой нагрузкой [270, 279]. Таким образом, создание лекарственных средств, модулирующих чувствительность тонкого филамента к кальцию, является перспективным направлением терапии сердечной недостаточности.

#### ТРОПОНИНОВЫЙ КОМПЛЕКС И КАРДИОМИОПАТИЯ

Одним из достаточно распространенных заболеваний сердца является кардиомиопатия, патология, связанная с изменениями в структуре миокарда и/или развитием систолической или диастолической дисфункции в отсутствие врожденного порока сердца, артериальной гипертензии, патологий клапанов и коронарных артерий [280]. Согласно современной классификации Европейского кардиологического общества, выделяют пять типов кардиомиопатии: гипертрофическую кардиомиопатию (HCM), дилатационную кардиомиопатию (DCM), рестриктивную кардиомиопатию (RCM), аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка и кардиомиопатию неизвестной природы [280]. Данные заболевания связаны с повышенным риском развития сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, высокой смертностью, и являются главной причиной смерти от внезапной остановки сердца [281–283].

На данный момент идентифицировано более 90 мутаций компонентов тропонинового комплекса, связанных с HCM, DCM и RCM [284–287]. В их число входят точечные мутации ТнТ, ТнI и ТнС, связанные с заменой или делецией одиночного аминокислотного остатка [288–290], мутации, связанные со сдвигом рамки считывания

TnC [287], а также делецией С-концевой части молекулы cTnT и ее заменой на 7 незначущих аминокислотных остатков [291]. Физиологическая роль мутаций генов различных компонентов тропонового комплекса отличается в зависимости от типа кардиомиопатии. Мутации, ассоциированные с HCM и RCM, в основном приводят к повышению чувствительности миофиламента к концентрации  $Ca^{2+}$ , в то время как мутации, связанные с DCM, наоборот, в основном снижают  $Ca^{2+}$ -чувствительность миофиламента [284].

#### ТРОПОНОВЫЙ КОМПЛЕКС И ДИАГНОСТИКА ИНФАРКТА МИОКАРДА

Как говорилось выше, в сердечной мышце взрослого человека тропонины I и T представлены уникальными изоформами, которые не экспрессируются в других тканях. Эта особенность позволяет использовать оба этих белка в качестве высокоспецифичных маркеров гибели клеток сердечной мышцы. Наиболее распространенной причиной массовой гибели кардиомиоцитов является инфаркт миокарда, возникающий в результате продолжительной ишемии участка сердечной мышцы. Из мертвых кардиомиоцитов внутриклеточные белки попадают в кровоток и там могут быть обнаружены с использованием иммунохимических методов.

Впервые использование тропонина I, а затем и тропонина T в качестве белков-маркеров инфаркта миокарда было предложено более 20 лет назад [292, 293]. С тех пор диагностические системы, основанные на иммунохимическом определении концентрации тропонинов I и T в крови больного, оттеснили на второй план традиционные методы диагностики инфаркта. Высокая специфичность и чувствительность методов, основанных на детекции тропонинов, стала причиной того, что с 2007 г., согласно рекомендациям ведущих кардиологических ассоциаций Европы и США, определение концентрации этих белков в крови стало одним из основных критериев постановки диагноза «инфаркт миокарда» [294–296]. Современные диагностические системы позволяют достоверно определить инфаркт уже через 3–6 часов после начала приступа [296]. Следует надеяться, что использование новых, более чувствительных диагностических систем, появление которых ожидается в ближайшее время, позволит сократить время постановки диагноза до 2–3 часов [297–299]. К сожалению, ограниченный объем данного обзора не позволяет более подробно рассмотреть основные особенности применения тропонинов в диагностике, однако заинтересованный читатель может получить более полную информацию по данному вопросу в следующих обзорных статьях [300–303].

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тропониновый комплекс является уникальным механизмом, позволяющим при помощи различных биохимических воздействий осуществлять тонкую регуляцию сократительной активности сердца. Важнейшую роль в такой регуляции играют посттрансляционные модификации компонентов тропонинового комплекса. Несмотря на длительную историю изучения, многие свойства тропонина остаются не до конца понятны. Можно надеяться, что дальнейшие исследования прольют свет на неизвестные особенности функционирования и регуляцию работы тропонинового комплекса. Это позволит более точно понять его роль в регуляции сокращения сердечной мускулатуры, а также разработать более совершенные подходы в диагностике и терапии патологий сердечно-сосудистой системы.

Автор выражает благодарность А.Е. Когану и А.В. Вылегжаниной за помощь в подготовке данной работы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wade, R., Eddy, R., Shows, T.B., Kedes, L. (1990) *Genomics*, **7**, 346–357.
2. Tiso, N., Rampoldi, L., Pallavicini, A., Zimbello, R., Pandolfo, D., Valle, G., Lanfranchi, G., Danieli, G.A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 347–350.
3. Bhavsar, P.K., Brand, N.J., Yacoub, M.H., Barton, P.J. (1996) *Genomics*, **35**, 11–23.
4. Lundin, L.G. (1993) *Genomics*, **16**, 1–19.
5. Cullen, M.E., Dellow, K.A., Barton, P.J. (2004) *Mol. Cell Biochem.*, **263**, 81–90.
6. Dhoot, G.K., Perry, S.V. (1979) *Nature*, **278**, 714–718.
7. Bhavsar, P.K., Dhoot, G.K., Cumming, D.V., Butler-Browne, G.S., Yacoub, M.H., Barton, P.J. (1991) *FEBS Lett.*, **292**, 5–8.
8. Hunkeler, N.M., Kullman, J., Murphy, A.M. (1991) *Circ. Res.*, **69**, 1409–1414.
9. Sasse, S., Brand, N.J., Kyprianou, P., Dhoot, G.K., Wade, R., Arai, M., Periasamy, M., Yacoub, M.H., Barton, P.J. (1993) *Circ. Res.*, **72**, 932–938.
10. Bhavsar, P.K., Dellow, K.A., Yacoub, M.H., Brand, N.J., Barton, P.J. (2000) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**, 95–108.
11. Dellow, K.A., Bhavsar, P.K., Brand, N.J., Barton, P.J. (2001) *Cardiovasc. Res.*, **50**, 24–33.
12. Bodor, G.S., Porterfield, D., Voss, E.M., Smith, S., Apple, F.S. (1995) *Clin. Chem.*, **41**, 1710–1715.
13. Sabry, M.A., Dhoot, G.K. (1989) *J. Muscle. Res. Cell Motil.*, **10**, 85–91.
14. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S., Schiaffino, S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 16299–16302.
15. Ausoni, S., De Nardi, C., Moretti, P., Gorza, L., Schiaffino, S. (1991) *Development*, **112**, 1041–1051.
16. Kruger, M., Kohl, T., Linke, W.A. (2006) *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **291**, H496–506.

17. Nan, C., Huang, X. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **378**, 62–67.
18. Podlowski, S., Bramlage, P., Baumann, G., Morano, I., Luther, H.P. (2002) *J. Cell Biochem.*, **85**, 198–207.
19. Wolska, B.M., Vijayan, K., Arteaga, G.M., Konhilas, J.P., Phillips, R.M., Kim, R., Naya, T., Leiden, J.M., Martin, A.F., De Tombe, P.P., Solaro, R.J. (2001) *J. Physiol.*, **536**, 863–870.
20. Fentzke, R.C., Buck, S.H., Patel, J.R., Lin, H., Wolska, B.M., Stojanovic, M.O., Martin, A.F., Solaro, R.J., Moss, R.L., Leiden, J.M. (1999) *J. Physiol.*, **517** (Pt. 1), 143–157.
21. Westfall, M.V., Rust, E.M., Metzger, J.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5444–5449.
22. Metzger, J.M., Michele, D.E., Rust, E.M., Borton, A.R., Westfall, M.V. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 13118–13123.
23. Morimoto, S., Harada, K., Ohtsuki, I. (1999) *J. Biochem.*, **126**, 121–129.
24. Morimoto, S., Goto, T. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 912–917.
25. Mesnard, L., Logeart, D., Taviaux, S., Diriong, S., Mercadier, J.J., Samson, F. (1995) *Circ. Res.*, **76**, 687–692.
26. Townsend, P.J., Farza, H., Macgeoch, C., Spurr, N.K., Wade, R., Gahlmann, R., Yacoub, M.H., Barton, P.J. (1994) *Genomics*, **21**, 311–316.
27. Farza, H., Townsend, P.J., Carrier, L., Barton, P.J., Mesnard, L., Bahrend, E., Forissier, J.F., Fiszman, M., Yacoub, M.H., Schwartz, K. (1998) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **30**, 1247–1253.
28. Jin, J.P. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 883–889.
29. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S., Schiaffino, S. (1990) *Development*, **110**, 547–554.
30. Anderson, P.A., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Pagani, E.D., Allen, P.D. (1991) *Circ. Res.*, **69**, 1226–1233.
31. Yonemura, I., Mitani, Y., Nakada, K., Akutsu, S., Miyazaki, J. (2002) *Zoolog. Sci.*, **19**, 215–223.
32. Krishan, K., Morgan, M.J., Zhao, W., Dhoot, G.K. (2000) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **21**, 527–536.
33. Wang, Q., Reiter, R.S., Huang, Q.Q., Jin, J.P., Lin, J.J. (2001) *Anat. Rec.*, **263**, 72–84.
34. Barton, P.J., Felkin, L.E., Koban, M.U., Cullen, M.E., Brand, N.J., Dhoot, G.K. (2004) *Mol. Cell Biochem.*, **263**, 91–97.
35. Anderson, P.A., Oakeley, A.E. (1989) *Circ. Res.*, **65**, 1087–1093.
36. Samson, F., Mesnard, L., Mihovilovic, M., Potter, T.G., Mercadier, J.J., Roses, A.D., Gilbert, J.R. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 841–847.
37. Jin, J.P., Chen, A., Huang, Q.Q. (1998) *Gene*, **214**, 121–129.
38. Cooper, T.A., Ordahl, C.P. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 11140–11148.
39. Risnik, V.V., Verin, A.D., Gusev, N.B. (1985) *Biochem. J.*, **225**, 549–552.
40. Leszyk, J., Dumaswala, R., Potter, J.D., Gusev, N.B., Verin, A.D., Tobacman, L.S., Collins, J.H. (1987) *Biochemistry*, **26**, 7035–7042.
41. Tobacman, L.S., Lee, R. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 4059–4064.
42. Jin, J.P., Wang, J., Zhang, J. (1996) *Gene*, **168**, 217–221.
43. Jin, J.P., Lin, J.J. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 14471–14477.
44. Jin, J.P., Huang, Q.Q., Yeh, H.I., Lin, J.J. (1992) *J. Mol. Biol.*, **227**, 1269–1276.
45. Townsend, P.J., Barton, P.J., Yacoub, M.H., Farza, H. (1995) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **27**, 2223–2236.
46. Anderson, P.A., Greig, A., Mark, T.M., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Ungerleider, R.M., Allen, P.D., Kay, B.K. (1995) *Circ. Res.*, **76**, 681–686.

47. Gomes, A.V., Venkatraman, G., Davis, J.P., Tikunova, S.B., Engel, P., Solaro, R.J., Potter, J.D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 49579–49587.
48. Mcauliffe, J.J., Gao, L.Z., Solaro, R.J. (1990) *Circ. Res.*, **66**, 1204–1216.
49. Nassar, R., Malouf, N.N., Kelly, M.B., Oakeley, A.E., Anderson, P.A. (1991) *Circ. Res.*, **69**, 1470–1475.
50. Ladd, A.N., Charlet, N., Cooper, T.A. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 1285–1296.
51. Ladd, A.N., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Cooper, T.A. (2005) *Dev. Dyn.*, **233**, 783–793.
52. Charlet, B.N., Logan, P., Singh, G., Cooper, T.A. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 649–658.
53. Song, W.J., Van Keuren, M.L., Drabkin, H.A., Cypser, J.R., Gemmill, R.M., Kurnit, D.M. (1996) *Cytogenet. Cell Genet.*, **75**, 36–37.
54. Townsend, P.J., Yacoub, M.H., Barton, P.J. (1997) *Ann. Hum. Genet.*, **61**, 457–459.
55. Gahlmann, R., Kedes, L. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 12520–12528.
56. Schreier, T., Kedes, L., Gahlmann, R. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21247–214753.
57. Gahlmann, R., Wade, R., Gunning, P., Kedes, L. (1988) *J. Mol. Biol.*, **201**, 379–391.
58. Toyota, N., Shimada, Y. (1981) *J. Cell Biol.*, **91**, 497–504.
59. Toyota, N. (1993) *Int. J. Dev. Biol.*, **37**, 531–537.
60. Mittmann, K., Jaquet, K., Heilmeyer, L.M., Jr. (1990) *FEBS Lett.*, **273**, 41–45.
61. Zabrouskov, V., Ge, Y., Schwartz, J., Walker, J.W. (2008) *Mol. Cell Proteomics*, **7**, 1838–1849.
62. Howarth, J.W., Meller, J., Solaro, R.J., Trewhella, J., Rosevear, P.R. (2007) *J. Mol. Biol.*, **373**, 706–722.
63. Ferrieres, G., Pugniere, M., Mani, J.C., Villard, S., Laprade, M., Doutre, P., Pau, B., Granier, C. (2000) *FEBS Lett.*, **479**, 99–105.
64. Ward, D.G., Brewer, S.M., Gallon, C.E., Gao, Y., Levine, B.A., Trayer, I.P. (2004) *Biochemistry*, **43**, 5772–5781.
65. Ward, D.G., Brewer, S.M., Calvert, M.J., Gallon, C.E., Gao, Y., Trayer, I.P. (2004) *Biochemistry*, **43**, 4020–4027.
66. Finley, N., Abbott, M.B., Abusamhadneh, E., Gaponenko, V., Dong, W., Gasmir-Seabrook, G., Howarth, J.W., Rance, M., Solaro, R.J., Cheung, H.C., Rosevear, P.R. (1999) *FEBS Lett.*, **453**, 107–112.
67. Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., Maeda, Y. (2003) *Nature*, **424**, 35–41.
68. Takeda, S. (2005) *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, **54 Suppl. 1**, 35–i41.
69. Vassilyev, D.G., Takeda, S., Wakatsuki, S., Maeda, K., Maeda, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4847–4852.
70. Stefancsik, R., Jha, P.K., Sarkar, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 957–962.
71. Takeda, S., Maeda, Y. (2003) *Seikagaku*, **75**, 1540–1545.
72. Kobayashi, T., Patrick, S.E., Kobayashi, M. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20052–20060.
73. Lindhout, D.A., Sykes, B.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27024–27034.
74. Brown, L.J., Sale, K.L., Hills, R., Rouviere, C., Song, L., Zhang, X., Fajer, P.G. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12765–12770.
75. Dong, W.J., Robinson, J.M., Stagg, S., Xing, J., Cheung, H.C. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 8686–8692.
76. Talbot, J.A., Hodges, R.S. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 2798–27802.
77. Farah, C.S., Miyamoto, C.A., Ramos, C.H., Da Silva, A.C., Quaggio, R.B., Fujimori, K., Smillie, L.B., Reinach, F.C. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 5230–5240.

78. Dong, W.J., Xing, J., Robinson, J.M., Cheung, H.C. (2001) *J. Mol. Biol.*, **314**, 51–61.
79. Kowlessur, D., Tobacman, L.S. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 2686–2694.
80. Li, M.X., Spyropoulos, L., Sykes, B.D. (1999) *Biochemistry*, **38**, 8289–8298.
81. Wang, X., Li, M.X., Sykes, B.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 31124–31133.
82. Blumenschein, T.M., Stone, D.B., Fletterick, R.J., Mendelson, R.A., Sykes, B.D. (2006) *Biophys. J.*, **90**, 2436–2444.
83. Julien, O., Mercier, P., Allen, C.N., Fiset, O., Ramos, C.H., Lague, P., Blumenschein, T.M., Sykes, B.D. (2011) *Proteins*, **79**, 1240–1250.
84. King, W.A., Stone, D.B., Timmins, P.A., Narayanan, T., Von Brasch, A.A., Mendelson, R.A., Curmi, P.M. (2005) *J. Mol. Biol.*, **345**, 797–815.
85. Murakami, K., Yumoto, F., Ohki, S.Y., Yasunaga, T., Tanokura, M., Wakabayashi, T. (2005) *J. Mol. Biol.*, **352**, 178–201.
86. Wang, H., Chalovich, J.M., Marriott, G. (2012) *PLoS One*, **7**, e50420.
87. Zhou, Z., Li, K.L., Rieck, D., Ouyang, Y., Chandra, M., Dong, W.J. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 7661–7674.
88. Galinska-Rakoczy, A., Engel, P., Xu, C., Jung, H., Craig, R., Tobacman, L.S., Lehman, W. (2008) *J. Mol. Biol.*, **379**, 929–935.
89. Galinska, A., Hatch, V., Craig, R., Murphy, A.M., Van Eyk, J.E., Wang, C.L., Lehman, W., Foster, D.B. (2009) *Circ. Res.*, **106**, 705–711.
90. Tobacman, L.S. (1996) *Annu. Rev. Physiol.*, **58**, 447–481.
91. Perry, S.V. (1998) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **19**, 575–602.
92. White, S.P., Cohen, C., Phillips, G.N., Jr. (1987) *Nature*, **325**, 826–828.
93. Wei, B., Jin, J.P. (2011) *Arch. Biochem. Biophys.*, **505**, 144–154.
94. Gollapudi, S.K., Mamidi, R., Mallampalli, S.L., Chandra, M. (2012) *Biophys. J.*, **103**, 940–948.
95. Pearlstone, J.R., Smillie, L.B. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 10587–10592.
96. Pearlstone, J.R., Smillie, L.B. (1985) *Can J. Biochem. Cell Biol.*, **63**, 212–218.
97. Верин А.Д., Гусев Н.Б. (1988) *Биохимия*, **53**, 1235–1246.
98. Wang, J., Jin, J.P. (1998) *Biochemistry*, **37**, 14519–14528.
99. Jin, J.P., Chen, A., Ogut, O., Huang, Q.Q. (2000) *Am J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C1067–C1077.
100. Biesiadecki, B.J., Chong, S.M., Nosek, T.M., Jin, J.P. (2007) *Biochemistry*, **46**, 1368–1379.
101. Chandra, M., Montgomery, D.E., Kim, J.J., Solaro, R.J. (1999) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **31**, 867–880.
102. Sumandea, M.P., Vahebi, S., Sumandea, C.A., Garcia-Cazarin, M.L., Staidle, J., Homsher, E. (2009) *Biochemistry*, **48**, 7722–7731.
103. Mamidi, R., Michael, J.J., Muthuchamy, M., Chandra, M. (2013) *FASEB J.*, **27**, doi: 10.1096/fj.13-232363.
104. Gollapudi, S.K., Gallon, C.E., Chandra, M. (2013) *J. Mol. Biol.*, **425**, 1565–1581.
105. Jin, J.P., Chong, S.M. (2010) *Arch. Biochem. Biophys.*, **500**, 144–150.
106. Mak, A.S., Smillie, L.B. (1981) *J. Mol. Biol.*, **149**, 541–550.
107. Pearlstone, J.R., Smillie, L.B. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 2534–2542.
108. Murakami, K., Stewart, M., Nozawa, K., Tomii, K., Kudou, N., Igarashi, N., Shirakihara, Y., Wakatsuki, S., Yasunaga, T., Wakabayashi, T. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7200–7205.

109. Manning, E.P., Tardiff, J.C., Schwartz, S.D. (2011) *Biochemistry*, **50**, 7405–7413.
110. Chong, P.C., Hodges, R.S. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 9152–9160.
111. Morris, E.P., Lehrer, S.S. (1984) *Biochemistry*, **23**, 2214–2220.
112. Tanokura, M., Tawada, Y., Ohtsuki, I. (1982) *J. Biochem.*, **91**, 1257–1265.
113. Franklin, A.J., Baxley, T., Kobayashi, T., Chalovich, J.M. (2012) *Biophys. J.*, **102**, 2536–2544.
114. Roher, A., Lieska, N., Spitz, W. (1986) *Muscle Nerve*, **9**, 73–77.
115. Van Eerd, J.P., Takahashi, K. (1976) *Biochemistry*, **15**, 1171–1180.
116. Sia, S.K., Li, M.X., Spyrapoulos, L., Gagne, S.M., Liu, W., Putkey, J.A., Sykes, B.D. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 18216–18221.
117. Kretsinger, R.H. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **8**, 119–174.
118. Potter, J.D., Gergely, J. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4628–4633.
119. Van Eerd, J.P., Takahashi, K. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 122–127.
120. Barskaya, N.V., Gusev, N.B. (1982) *Biochem. J.*, **207**, 185–192.
121. Holroyde, M.J., Robertson, S.P., Johnson, J.D., Solaro, R.J., Potter, J.D. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 11688–11693.
122. Pan, B.S., Solaro, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 7839–7849.
123. Zot, H.G., Potter, J.D. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 7678–7683.
124. Putkey, J.A., Sweeney, H.L., Campbell, S.T. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 12370–12378.
125. Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. (1990) *Nature*, **347**, 44–49.
126. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y., Narita, A. (2009) *Nature*, **457**, 441–445.
127. Невзоров И.А., Левицкий Д.И. (2011) *Биохимия*, **76**, 1507–1527.
128. Spudich, J.A., Huxley, H.E., Finch, J.T. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 619–632.
129. Lorenz, M., Poole, K.J., Popp, D., Rosenbaum, G., Holmes, K.C. (1995) *J. Mol. Biol.*, **246**, 108–119.
130. Phillips, G.N., Jr., Fillers, J.P., Cohen, C. (1986) *J. Mol. Biol.*, **192**, 111–131.
131. Ebashi, S., Endo, M., Otsuki, I. (1969) *Q. Rev. Biophys.*, **2**, 351–384.
132. Hitchcock, S.E., Huxley, H.E., Szent-Gyorgyi, A.G. (1973) *J. Mol. Biol.*, **80**, 825–836.
133. Potter, J.D., Gergely, J. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2697–2703.
134. Tripet, B., Van Eyk, J.E., Hodges, R.S. (1997) *J. Mol. Biol.*, **271**, 728–750.
135. Geeves, M.A., Chai, M., Lehrer, S.S. (2000) *Biochemistry*, **39**, 9345–9350.
136. Кубасова Н.А., Цатурян А.К. (2011) *Биохимия*, **76**, 1484–1506.
137. Geeves, M.A., Holmes, K.C. (2005) *Adv. Protein Chem.*, **71**, 161–93.
138. Ikebe, M., Hartshorne, D.J. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 10027–10031.
139. Gordon, A.M., Homsher, E., Reginier, M. (2000) *Physiol. Rev.*, **80**, 853–924.
140. Kobayashi, T., Solaro, R.J. (2005) *Annu. Rev. Physiol.*, **67**, 39–67.
141. Mckillop, D.F., Geeves, M.A. (1993) *Biophys. J.*, **65**, 693–701.
142. Maytum, R., Lehrer, S.S., Geeves, M.A. (1999) *Biochemistry*, **38**, 1102–1110.
143. Hoffman, R.M., Blumenschein, T.M., Sykes, B.D. (2006) *J. Mol. Biol.*, **361**, 625–633.
144. Lehrer, S.S. (2011) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **32**, 203–208.
145. Bers, D.M. (2000) *Circ. Res.*, **87**, 275–281.

146. Xu, C., Craig, R., Tobacman, L., Horowitz, R., Lehman, W. (1999) *Biophys. J.*, **77**, 985–992.
147. Lindert, S., Kekenos-Huskey, P.M., Huber, G., Pierce, L., Mccammon, J.A. (2012) *J. Phys. Chem. B*, **116**, 8449–8459.
148. Ovaska, M., Taskinen, J. (1991) *Proteins*, **11**, 79–94.
149. Dong, W., Rosenfeld, S.S., Wang, C.K., Gordon, A.M., Cheung, H.C. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 688–694.
150. Gagne, S.M., Tsuda, S., Li, M.X., Smillie, L.B., Sykes, B.D. (1995) *Nat Struct Biol*, **2**, 784–789.
151. Slupsky, C.M., Sykes, B.D. (1995) *Biochemistry*, **34**, 15953–15964.
152. Spyrapoulos, L., Li, M.X., Sia, S.K., Gagne, S.M., Chandra, M., Solaro, R.J., Sykes, B.D. (1997) *Biochemistry*, **36**, 12138–12146.
153. Dong, W.J., Xing, J., Villain, M., Hellinger, M., Robinson, J.M., Chandra, M., Solaro, R.J., Umeda, P.K., Cheung, H.C. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 31382–31390.
154. Vibert, P., Craig, R., Lehman, W. (1997) *J. Mol. Biol.*, **266**, 8–14.
155. Haselgrove, J.C., Huxley, H.E. (1973) *J. Mol. Biol.*, **77**, 549–568.
156. Parry, D.A., Squire, J.M. (1973) *J. Mol. Biol.*, **75**, 33–55.
157. Poole, K.J., Lorenz, M., Evans, G., Rosenbaum, G., Pirani, A., Craig, R., Tobacman, L.S., Lehman, W., Holmes, K.C. (2006) *J. Struct. Biol.*, **155**, 273–284.
158. Robinson, J.M., Dong, W.J., Xing, J., Cheung, H.C. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 295–305.
159. Houmeida, A., Heeley, D.H., Belknap, B., White, H.D. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 32760–32769.
160. Xing, J., Jayasundar, J.J., Ouyang, Y., Dong, W.J. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 16432–16441.
161. Hofmann, P.A., Fuchs, F. (1987) *Am. J. Physiol.*, **253**, C90–C96.
162. Allen, D.G., Kentish, J.C. (1985) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **17**, 821–840.
163. De Tombe, P.P., Mateja, R.D., Tachampa, K., Ait Mou, Y., Farman, G.P., Irving, T.C. (2010) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **48**, 851–858.
164. Shiels, H.A., White, E. (2008) *J. Exp. Biol.*, **211**, 2005–2013.
165. Arteaga, G.M., Palmiter, K.A., Leiden, J.M., Solaro, R.J. (2000) *J. Physiol.*, **526 Pt 3**, 541–549.
166. Terui, T., Sodnomtseren, M., Matsuba, D., Udaka, J., Ishiwata, S., Ohtsuki, I., Kurihara, S., Fukuda, N. (2008) *J. Gen Physiol.*, **131**, 275–283.
167. Konhilas, J.P., Irving, T.C., Wolska, B.M., Jweied, E.E., Martin, A.F., Solaro, R.J., De Tombe, P.P. (2003) *J. Physiol.*, **547**, 951–961.
168. Matsuba, D., Terui, T., Jin O., Tanaka, H., Ojima, T., Ohtsuki, I., Ishiwata, S., Kurihara, S., Fukuda, N. (2009) *J. Gen Physiol.*, **133**, 571–581.
169. Tachampa, K., Wang, H., Farman, G.P., De Tombe, P.P. (2007) *Circ. Res.*, **101**, 1081–103.
170. Sedlis, S.P. (1992) *Cardiovasc. Clin.*, **22**, 3–18.
171. Di Diego, J.M., Antzelevitch, C. (2011) *Heart Rhythm*, **8**, 1963–1968.
172. Crampin, E.J., Smith, N.P., Langham, A.E., Clayton, R.H., Orchard, C.H. (2006) *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **364**, 1171–1186.
173. Bountra, C., Kaila, K., Vaughan-Jones, R.D. (1988) *J. Physiol.*, **398**, 341–360.
174. Yan, G.X., Kleber, A.G. (1992) *Circ. Res.*, **71**, 460–470.
175. Park, C.O., Xiao, X.H., Allen, D.G. (1999) *Am J. Physiol.*, **276**, H1581–H1590.

176. Jennings, R.B., Reimer, K.A. (1991) *Annu. Rev. Med.*, **42**, 225–246.
177. Metzger, J.M., Parmacek, M.S., Barr, E., Pasyk, K., Lin, W.I., Cochran, K.L., Field, L.J., Leiden, J.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9036–9040.
178. Dargis, R., Pearlstone, J.R., Barrette-Ng, I., Edwards, H., Smillie, L.B. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 34662–34665.
179. Reiser, P.J., Westfall, M.V., Schiaffino, S., Solaro, R.J. (1994) *Am J. Physiol.*, **267**, H1589–H1596.
180. Day, S.M., Westfall, M.V., Fomicheva, E.V., Hoyer, K., Yasuda, S., La Cross, N.C., D'alecy, L.G., Ingwall, J.S., Metzger, J.M. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 181–189.
181. Pineda-Sanabria, S.E., Robertson, I.M., Li, M.X., Sykes, B.D. (2013) *Cardiovasc. Res.*, **97**, 481–489.
182. Nosek, T.M., Brotto, M.A., Jin, J.P. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 178–184.
183. Zhang, P., Kirk, J.A., Ji, W., Dos Remedios, C.G., Kass, D.A., Van Eyk, J.E., Murphy, A.M. (2012) *Circulation*, **126**, 1828–1837.
184. Van Der Velden, J., Papp, Z., Zarembo, R., Boontje, N.M., De Jong, J.W., Owen, V.J., Burton, P.B., Goldmann, P., Jaquet, K., Stienen, G.J. (2003) *Cardiovasc. Res.*, **57**, 37–47.
185. Zhang, J., Guy, M.J., Norman, H.S., Chen, Y.C., Xu, Q., Dong, X., Guner, H., Wang, S., Kohmoto, T., Young, K.H., Moss, R.L., Ge, Y. (2011) *J. Proteome Res.*, **10**, 4054–4065.
186. Noland, T.A., Jr., Guo, X., Raynor, R.L., Jideama, N.M., Averyhart-Fullard, V., Solaro, R.J., Kuo, J.F. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25445–25454.
187. Noland, T.A., Jr., Raynor, R.L., Jideama, N.M., Guo, X., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Solaro, R.J., Kuo, J.F. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14923–14931.
188. Kobayashi, T., Yang, X., Walker, L.A., Van Breemen, R.B., Solaro, R.J. (2005) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **38**, 213–218.
189. Noland, T.A., Jr., Raynor, R.L., Kuo, J.F. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 20778–20785.
190. Buscemi, N., Foster, D.B., Neverova, I., Van Eyk, J.E. (2002) *Circ. Res.*, **91**, 509–516.
191. Cuello, F., Bardswell, S.C., Hawthorth, R.S., Yin, X., Lutz, S., Wieland, T., Mayr, M., Kentish, J.C., Avkiran, M. (2007) *Circ. Res.*, **100**, 864–873.
192. You, B., Yan, G., Zhang, Z., Yan, L., Li, J., Ge, Q., Jin, J.P., Sun, J. (2009) *Biochem. J.*, **418**, 93–101.
193. Oliveira, S.M., Zhang, Y.H., Solis, R.S., Isackson, H., Bellahcene, M., Yavari, A., Pinter, K., Davies, J.K., Ge, Y., Ashrafian, H., Walker, J.W., Carling, D., Watkins, H., Casadei, B., Redwood, C. (2012) *Circ. Res.*, **110**, 1192–1201.
194. Sancho Solis, R., Ge, Y., Walker, J.W. (2011) *Protein Sci.*, **20**, 894–907.
195. Solaro, R.J., Moir, A.J., Perry, S.V. (1976) *Nature*, **262**, 615–67.
196. Gautel, M., Zuffardi, O., Freiburg, A., Labeit, S. (1995) *EMBO J.*, **14**, 1952–1960.
197. Yamasaki, R., Wu, Y., McNabb, M., Greaser, M., Labeit, S., Granzier, H. (2002) *Circ. Res.*, **90**, 1181–1188.
198. Kruger, M., Linke, W.A. (2006) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**, 435–444.
199. Stull, J.T., Brostrom, C.O., Krebs, E.G. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 5272–5274.
200. Pratje, E., Heilmeyer, L.M. (1972) *FEBS Lett.*, **27**, 89–93.
201. Strang, K.T., Sweitzer, N.K., Greaser, M.L., Moss, R.L. (1994) *Circ. Res.*, **74**, 542–549.
202. Hagemann, D., Xiao, R.P. (2002) *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 51–56.

203. Bers, D.M., Perez-Reyes, E. (1999) *Cardiovasc. Res.*, **42**, 339–360.
204. Van Der Velden, J. (2011) *Pflugers Arch.*, **462**, 155–163.
205. Solaro, R.J., Henze, M., Kobayashi, T. (2013) *Circ. Res.*, **112**, 355–366.
206. Zhang, R., Zhao, J., Mandveno, A., Potter, J.D. (1995) *Circ. Res.*, **76**, 1028–1035.
207. Kentish, J.C., McCloskey, D.T., Layland, J., Palmer, S., Leiden, J.M., Martin, A.F., Solaro, R.J. (2001) *Circ. Res.*, **88**, 1059–1065.
208. Wijnker, P.J., Foster, D.B., Tsao, A.L., Frazier, A.H., Dos Remedios, C.G., Murphy, A.M., Stienen, G.J., Van Der Velden, J. (2013) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **304**, H260–H268.
209. Mittmann, K., Jaquet, K., Heilmeyer, L.M., Jr. (1992) *FEBS Lett.*, **302**, 133–137.
210. Sancho Solis, R., Ge, Y., Walker, J.W. (2008) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **29**, 203–212.
211. Chandra, M., Dong, W.J., Pan, B.S., Cheung, H.C., Solaro, R.J. (1997) *Biochemistry*, **36**, 13305–13311.
212. Zhang, R., Zhao, J., Potter, J.D. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 30773–30780.
213. Pena, J.R., Wolska, B.M. (2004) *Cardiovasc. Res.*, **61**, 756–763.
214. Pi, Y., Kemnitz, K.R., Zhang, D., Kranias, E.G., Walker, J.W. (2002) *Circ. Res.*, **90**, 649–656.
215. Pi, Y., Zhang, D., Kemnitz, K.R., Wang, H., Walker, J.W. (2003) *J. Physiol.*, **552**, 845–857.
216. Takimoto, E., Soergel, D.G., Janssen, P.M., Stull, L.B., Kass, D.A., Murphy, A.M. (2004) *Circ. Res.*, **94**, 496–504.
217. De Tombe, P.P., Stienen, G.J. (1995) *Circ. Res.*, **76**, 734–741.
218. Stelzer, J.E., Patel, J.R., Walker, J.W., Moss, R.L. (2007) *Circ. Res.*, **101**, 503–511.
219. Chen, P.P., Patel, J.R., Rybakova, I.N., Walker, J.W., Moss, R.L. (2010) *J. Gen Physiol.*, **136**, 615–627.
220. Messer, A.E., Jacques, A.M., Martston, S.B. (2007) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **42**, 247–259.
221. Steinberg, S.F. (2012) *Physiology (Bethesda)*, **27**, 130–139.
222. Shin, H.G., Barnett, J.V., Chang, P., Reddy, S., Drinkwater, D.C., Pierson, R.N., Wiley, R.G., Murray, K.T. (2000) *Cardiovasc. Res.*, **48**, 285–299.
223. Sumandea, M.P., Rybin, V.O., Hinken, A.C., Wang, C., Kobayashi, T., Harleton, E., Sievert, G., Balke, C.W., Feinmark, S.J., Solaro, R.J., Steinberg, S.F. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 22680–22689.
224. Sumandea, M.P., Pyle, W.G., Kobayashi, T., De Tombe, P.P., Solaro, R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 35135–35144.
225. Kooij, V., Boontje, N., Zaremba, R., Jaquet, K., Dos Remedios, C., Stienen, G.J., Van Der Velden, J. (2010) *Basic Res. Cardiol.*, **105**, 289–300.
226. Hidalgo, C., Hudson, B., Bogomolovas, J., Zhu, Y., Anderson, B., Greaser, M., Labeit, S., Granzier, H. (2009) *Circ. Res.*, **105**, 631–638.
227. Ruse, C.I., Willard, B., Jin, J.P., Haas, T., Kinter, M., Bond, M. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 1658–1664.
228. Malhotra, A., Kang, B.P., Cheung, S., Opawumi, D., Meggs, L.G. (2001) *Diabetes*, **50**, 1918–1926.
229. Wu, S.C., Solaro, R.J. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 30691–30698.
230. Hinken, A.C., Hanft, L.M., Scruggs, S.B., Sadayappan, S., Robbins, J., Solaro, R.J., McDonald, K.S. (2012) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **33**, 439–448.
231. Sakthivel, S., Finley, N.L., Rosevear, P.R., Lorenz, J.N., Gulick, J., Kim, S., Vanburen, P., Martin, L.A., Rob-

- bins, J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 703–714.
232. Macgowan, G.A., Du, C., Cowan, D.B., Stamm, C., McGowan, F.X., Solaro, R.J., Koretsky, A.P., Del Nido, P.J. (2001) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, H835–H843.
233. Kirk, J.A., Macgowan, G.A., Evans, C., Smith, S.H., Warren, C.M., Mammidi, R., Chandra, M., Stewart, A.F., Solaro, R.J., Shroff, S.G. (2009) *Circ. Res.*, **105**, 1232–1239.
234. Burkart, E.M., Sumandea, M.P., Kobayashi, T., Nili, M., Martin, A.F., Homsher, E., Solaro, R.J. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 11265–11272.
235. Mathur, M.C., Kobayashi, T., Chalovich, J.M. (2008) *Biophys. J.*, **94**, 542–549.
236. Dong, X., Sumandea, C.A., Chen, Y.C., Garcia-Cazarin, M.L., Zhang, J., Balke, C.W., Sumandea, M.P., Ge, Y. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 848–857.
237. Molnar, A., Borbely, A., Czuriga, D., Ivetta, S.M., Szilagyi, S., Hertelendi, Z., Pasztor, E.T., Balogh, A., Galajda, Z., Szerafin, T., Jaquet, K., Papp, Z., Edes, I., Toth, A. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 1031–1039.
238. Haworth, R.S., Cuello, F., Herron, T.J., Franzen, G., Kentish, J.C., Gautel, M., Avkiran, M. (2004) *Circ. Res.*, **95**, 1091–1099.
239. Haworth, R.S., Roberts, N.A., Cuello, F., Avkiran, M. (2007) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **43**, 686–695.
240. Layland, J., Solaro, R.J., Shah, A.M. (2005) *Cardiovasc. Res.*, **66**, 12–21.
241. Ayaz-Guner, S., Zhang, J., Li, L., Walker, J.W., Ge, Y. (2009) *Biochemistry*, **48**, 8161–8170.
242. Risnik, V.V., Gusev, N.B. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **790**, 108–116.
243. Gusev, N.B., Dobrovolskii, A.B., Severin, S.E. (1980) *Biochem. J.*, **189**, 219–226.
244. Villar-Palasi, C., Kumon, A. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 7409–7415.
245. He, X., Liu, Y., Sharma, V., Dirksen, R.T., Waugh, R., Sheu, S.S., Min, W. (2003) *Am. J. Pathol.*, **163**, 243–251.
246. Vahebi, S., Kobayashi, T., Warren, C.M., De Tombe, P.P., Solaro, R.J. (2005) *Circ. Res.*, **96**, 740–747.
247. Pfeleiderer, P., Sumandea, M.P., Rybin, V.O., Wang, C., Steinberg, S.F. (2009) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **30**, 67–72.
248. Swiderek, K., Jaquet, K., Meyer, H.E., Schachtele, C., Hofmann, F., Heilmeyer, L.M., Jr. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 575–582.
249. Katoh, N., Wise, B.C., Kuo, J.F. (1983) *Biochem. J.*, **209**, 189–195.
250. Raggi, A., Grand, R.J., Moir, A.J., Perry, S.V. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 135–143.
251. Noland, T.A., Jr., Kuo, J.F. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 4974–4978.
252. Jideama, N.M., Noland, T.A., Jr., Raynor, R.L., Blobe, G.C., Fabbro, D., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Hannun, Y.A., Kuo, J.F. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 23277–23283.
253. Noland, T.A., Jr., Kuo, J.F. (1993) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **25**, 53–65.
254. Sumandea, M.P., Burkart, E.M., Kobayashi, T., De Tombe, P.P., Solaro, R.J. (2004) *Ann. NY Acad. Sci.*, **1015**, 39–52.
255. Zhang, J., Zhang, H., Ayaz-Guner, S., Chen, Y.C., Dong, X., Xu, Q., Ge, Y. (2011) *Biochemistry*, **50**, 6081–6092.
256. Gusev, N.B., Barskaya, N.V., Verin, A.D., Duzhenkova, I.V., Khuchua, Z.A., Zheltova, A.O. (1983) *Biochem. J.*, **213**, 123–129.
257. Herve, J.C., Sarrouilhe, D. (2006) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **90**, 225–248.
258. Chu, G., Kranias, E.G. (2006) *Novartis Found. Symp.*, **274**, 156–171.

259. Barefield, D., Sadayappan, S. (2010) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **48**, 866–875.
260. Jideama, N.M., Crawford, B.H., Hussain, A.K., Raynor, R.L. (2006) *Int. J. Biol. Sci.*, **2**, 1–9.
261. Deshmukh, P.A., Blunt, B.C., Hofmann, P.A. (2007) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H792–H799.
262. Jaquet, K., Thieleczek, R., Heilmeyer, L.M., Jr. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **231**, 486–490.
263. Husberg, C., Agnetti, G., Holewinski, R.J., Christensen, G., Van Eyk, J.E. (2012) *Proteomics*, **12**, 973–978.
264. Ceulemans, H., Bollen, M. (2004) *Physiol. Rev.*, **84**, 1–39.
265. Nicolaou, P., Kranias, E.G. (2009) *Front. Biosci.*, **14**, 3571–3585.
266. Kurimchak, A., Grana, X. (2012) *Gene*, **499**, 1–7.
267. Zhang, Z., Biesiadecki, B.J., Jin, J.P. (2006) *Biochemistry*, **45**, 11681–11694.
268. Feng, H.Z., Biesiadecki, B.J., Yu, Z.B., Hossain, M.M., Jin, J.P. (2008) *J. Physiol.*, **586**, 3537–3550.
269. Zhang, Z., Feng, H.Z., Jin, J.P. (2006) *Arch. Biochem. Biophys.*, **515**, 37–45.
270. Li, M.X., Robertson, I.M., Sykes, B.D. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 88–99.
271. Geguchadze, R.N., Krylatov, A.V., Gusev, N.B. (1990) *Biomed. Sci.*, **1**, 37–42.
272. Li, Y., Love, M.L., Putkey, J.A., Cohen, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5140–5145.
273. Pollesello, P., Ovaska, M., Kaivola, J., Tilgmann, C., Lundstrom, K., Kalkkinen, N., Ulmanen, I., Nissinen, E., Taskinen, J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 28584–28590.
274. Sorsa, T., Heikkinen, S., Abbott, M.B., Abusamhadneh, E., Laakso, T., Tilgmann, C., Serimaa, R., Annala, A., Rosevear, P.R., Drakenberg, T., Pollesello, P., Kilpelainen, I. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 9337–9343.
275. Kleerekoper, Q., Putkey, J.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 23932–23939.
276. Li, M.X., Spyrapoulos, L., Beier, N., Putkey, J.A., Sykes, B.D. (2000) *Biochemistry*, **39**, 8782–8790.
277. Wang, X., Li, M.X., Spyrapoulos, L., Beier, N., Chandra, M., Solaro, R.J., Sykes, B.D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 25456–25466.
278. Brixius, K., Reicke, S., Schwinger, R.H. (2002) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **282**, H131–H137.
279. Endoh, M. (2003) *Expert Opin. Investig. Drugs*, **12**, 735–750.
280. Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kuhl, U., Maisch, B., Mckenna, W.J., Monserrat, L., Pankuweit, S., Rapezzi, C., Seferovic, P., Tavazzi, L., Keren, A. (2008) *Eur. Heart J.*, **29**, 270–276.
281. Towbin, J.A. (2009) *Pacing Clin. Electrophysiol.*, **32 Suppl. 2**, S23–S31.
282. Mohan, S.B., Parker, M., Wehbi, M., Douglass, P. (2002) *Cleve. Clin. J. Med.*, **69**, 481–487.
283. Ammash, N.M., Seward, J.B., Bailey, K.R., Edwards, W.D., Tajik, A.J. (2000) *Circulation*, **101**, 2490–2496.
284. Willott, R.H., Gomes, A.V., Chang, A.N., Parvatiyar, M.S., Pinto, J.R., Potter, J.D. (2010) *J. Mol. Cell Cardiol.*, **48**, 882–892.
285. Murakami, C., Nakamura, S., Kobayashi, M., Maeda, K., Irie, W., Wada, B., Hayashi, M., Sasaki, C., Nakamaru, N., Furukawa, M., Kurihara, K. (2010) *Leg. Med. (Tokyo)*, **12**, 280–283.
286. Parvatiyar, M.S., Landstrom, A.P., Figueiredo-Freitas, C., Potter, J.D., Ackerman, M.J., Pinto, J.R. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 31845–31855.
287. Chung, W.K., Kitner, C., Maron, B.J. (2011) *Cardiol. Young*, **21**, 345–348.

288. *Watkins, H., Mckenna, W.J., Thierfelder, L., Suk, H.J., Anan, R., O'donoghue, A., Spirito, P., Matsumori, A., Moravec, C.S., Seidman, J.G., Et Al.* (1995) *N. Engl. J. Med.*, **332**, 1058–10564.
289. *Ashrafian, H., Redwood, C., Blair, E., Watkins, H.* (2003) *Trends Genet.*, **19**, 263–268.
290. *Hershberger, R.E., Parks, S.B., Kushner, J.D., Li, D., Ludwigsen, S., Jakobs, P., Nauman, D., Burgess, D., Partain, J., Litt, M.* (2008) *Clin. Transl. Sci.*, **1**, 21–6.
291. *Moolman, J.C., Corfield, V.A., Posen, B., Ngumbela, K., Seidman, C., Brink, P.A., Watkins, H.* (1997) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **29**, 549–555.
292. *Cummins, B., Auckland, M.L., Cummins, P.* (1987) *Am. Heart J.*, **113**, 1333–1344.
293. *Katus, H.A., Looser, S., Hallermayer, K., Remppis, A., Scheffold, T., Borgya, A., Essig, U., Geuss, U.* (1992) *Clin. Chem.*, **38**, 386–393.
294. *Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D.* (2007) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **50**, 2173–2195.
295. *Mendis, S., Thygesen, K., Kuulasmaa, K., Giampaoli, S., Mahonen, M., Ngu Blackett, K., Lisheng, L.* (2011) *Int. J. Epidemiol.*, **40**, 139–146.
296. *Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., Katus, H.A., Lindahl, B., Morrow, D.A., Clemmensen, P.M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., Bax, J.J., Bonnow, R.O., Pinto, F., Gibbons, R.J., Fox, K.A., Atar, D., Newby, L.K., Galvani, M., Hamm, C.W., Uretsky, B.F., Steg, P.G., Wijns, W., Bassand, J.P., Menasche, P., Ravkilde, J., Ohman, E.M., Antman, E.M., Wallentin, L.C., Armstrong, P.W., Januzzi, J.L., Nieminen, M.S., Gheorghiade, M., Filippatos, G., Luepker, R.V., Fortmann, S.P., Rosamond, W.D., Levy, D., Wood, D., Smith, S.C., Hu, D., Lopez-Sendon, J.L., Robertson, R.M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A.A., Parikhomenko, A.N., Vasilieva, E.J., Mendis, S.* (2012) *Circulation*, **126**, 2020–2035.
297. *Kavsak, P.A., Macrae, A.R., Yerna, M.J., Jaffe, A.S.* (2009) *Clin. Chem.*, **55**, 573–577.
298. *Reichlin, T., Hochholzer, W., Bassetti, S., Steuer, S., Stelzig, C., Hartwiger, S., Biedert, S., Schaub, N., Buerge, C., Potocki, M., Noveanu, M., Breidhardt, T., Twerenbold, R., Winkler, K., Bingisser, R., Mueller, C.* (2009) *N. Engl. J. Med.*, **361**, 858–867.
299. *Diercks, D.B., Peacock, W.F.T., Hollander, J.E., Singer, A.J., Birkhahn, R., Shapiro, N., Glynn, T., Nowack, R., Safdar, B., Miller, C.D., Lewandrowski, E., Nagurney, J.T.* (2012) *Am. Heart J.*, **163**, 74–80 e4.
300. *Hof, D., Klingenberg, R., Von Eckardstein, A.* (2013) *Methods Mol. Biol.*, **963**, 385–406.
301. *Mueller, M., Vafaie, M., Biener, M., Giannitsis, E., Katus, H.A.* (2013) *Circ. J.*, **77**, 1653–1661.
302. *Bima, A., Sikaris, K.* (2012) *Intern. Med. J.*, **42 Suppl. 5**, 16–22.
303. *Collinson, P.O.* (2012) *Postgrad. Med. J.*, **88**, 348–352.