

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РАБОТЫ АКТИН-МИОЗИНОВОГО МОТОРА В МЫШЦЕ

©2011 г. Н. А. КУБАСОВА, А. К. ЦАТУРЯН

НИИ механики МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

I. Введение. II. Строение скелетной мышцы, миозин, актин, регуляторные белки, теория скользящих нитей. III. Мостиковая модель мышечного сокращения, гипотеза рычага. IV. Рентгенодифракционная картина мышцы. V. Модели рентгеновской дифракции на мышце. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие актина и миозина приводит в движение поперечно-полосатые и гладкие мышцы, а также лежит в основе многих других видов биологической подвижности. Скелетная мышца, в силу своей регулярной организации на всех структурных уровнях, является наиболее удобным объектом для изучения механизма работы актин-миозинового биологического мотора. В обзоре кратко описана история исследований актин-миозинового взаимодействия в мышце и представлены современные данные, полученные с помощью белковой кристаллографии, электронной микроскопии, биохимии и белковой инженерии. Особое внимание уделено рентгенодифракционным исследованиям интактных мышц и изолированных мышечных волокон с проницаемой мембраной, способных развивать активные усилия и совершать механическую работу. Такие исследования, проводящиеся на современных источниках синхротронного излучения, позволяют исследовать движения миозиновых молекулярных моторов в условиях, приближенных к физиологическим, с высоким временным и пространственным разрешением.

Первые экспериментальные данные о структуре сократительного аппарата мышцы были получены Hugh Huxley при помощи рентгеновской дифракции [1]. Используя лабораторный источник рентгеновского излучения и миниатюрную камеру (окно для луча 5 мкм и расстояние от препарата до детектора 3 см), он получил малоугловые

Адрес для корреспонденции: natalia@imec.msu.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-00908-а

рентгенограммы живой мышцы в покое и в активном сокращении. На основе этих данных в сочетании с данными электронной микроскопии была построена первая схема упаковки толстых и тонких нитей в саркомере. Развитие источников синхротронного излучения и появление быстрых двумерных детекторов открыло новые возможности для исследования структуры актин-миозинового мотора с уникальным временным [2] и пространственным [3] разрешением. Для современного экспериментатора этот метод не теряет своей привлекательности, поскольку, в отличие от многих других высокотехнологичных методов, позволяет наблюдать за изменениями структуры мышечных белков непосредственно в клетке одновременно с изменениями её физических характеристик.

II. СТРОЕНИЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ, МИОЗИН, АКТИН, РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ, ТЕОРИЯ СКОЛЬЗЯЩИХ НИТЕЙ

Скелетная мышца состоит из пучков параллельно упакованных мышечных клеток, или волокон (рис. 1). Характерный диаметр клетки 50–100 мкм, диапазон возможных длин очень широк. Каждое волокно – это одна большая многоядерная клетка, в которой ядра отнесены к поверхности, а почти всё остальное пространство занято миофибриллами. Диаметр отдельной миофибриллы порядка 1 мкм. Миофибриллы собраны из одинаковых сегментов, саркомеров, (от греч. *sárx* – мясо и *mégos* – часть, доля), которые отделены друг от друга Z-дисками (рис. 1). Поперечную исчерченность мышечных волокон, обусловленную регулярным повтором саркомеров, ван Левенгук увидел в свой самодельный микроскоп в 1674 г. Учитывая, что длина саркомера примерно 2–2,5 мкм, – это было удивительное достижение.

В середине XIX века немецкий учёный Кюне выделил «сократительную субстанцию» мышц и назвал её миозином [4]. Позднее он описал её как вещество, которое при определённых условиях способно формировать сокращающийся сгусток. В те годы не существовало методов выделения и анализа чистых белков, поэтому тот частично характеризованный Кюне миозин являлся, по сути, смесью нескольких белков, в которой присутствовал и актин. Примерно в те же годы в научной литературе появилась классификация тёмных и светлых зон, задающих поперечную исчерченность скелетной и сердечной мышц. Видимые в световой микроскоп более светлые участки саркомеров стали называть I-зонами (изотропными), тёмные – A-зонами (анизотропными). Z-диски образуют границы между саркомерами, а чуть более светлый участок в центре A-зоны получил название H-зоны

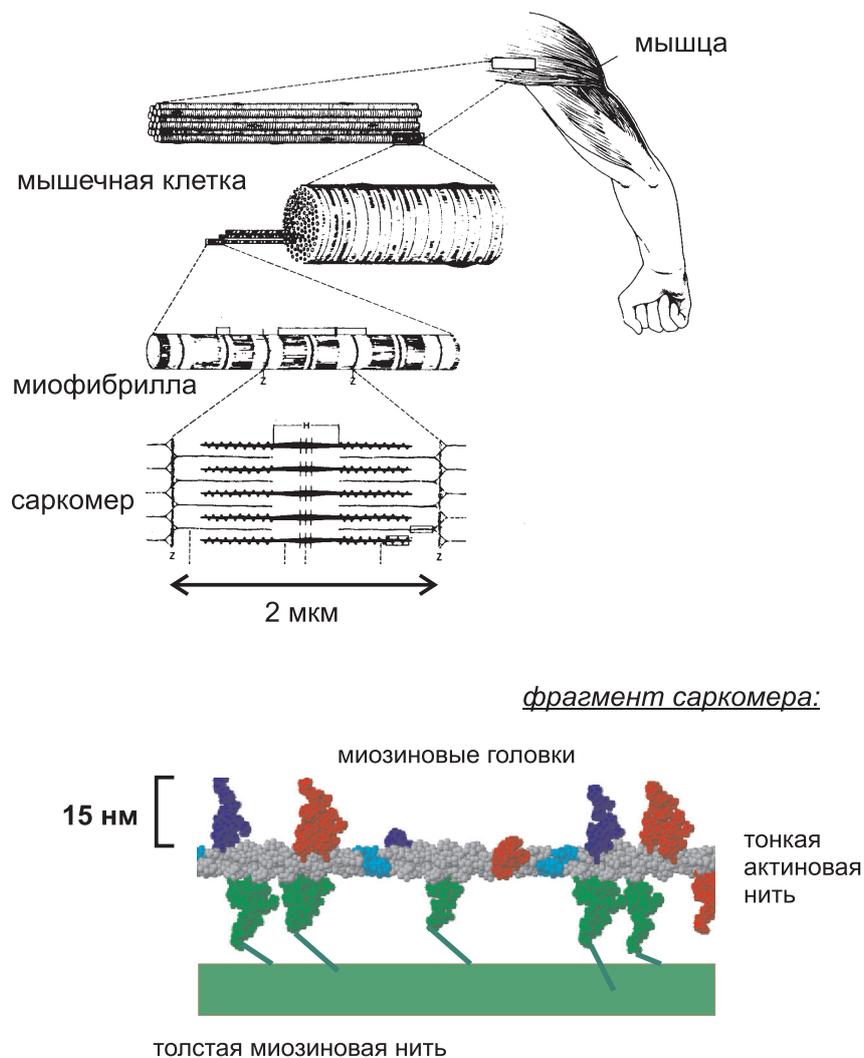


Рис. 1. Схема строения скелетной мышцы.

Указаны характерные размеры саркомера и головки миозиновой молекулы. Синим, красным и зелёным показаны миозиновые головки, принадлежащие трём толстым нитям, окружающим тонкую актиновую нить. Серым цветом показаны мономеры актина, доступные для миозиновых головок, голубым – актиновые мономеры, связанные с молекулами регуляторного белка тропонина (регуляторные белки на рисунке не показаны).

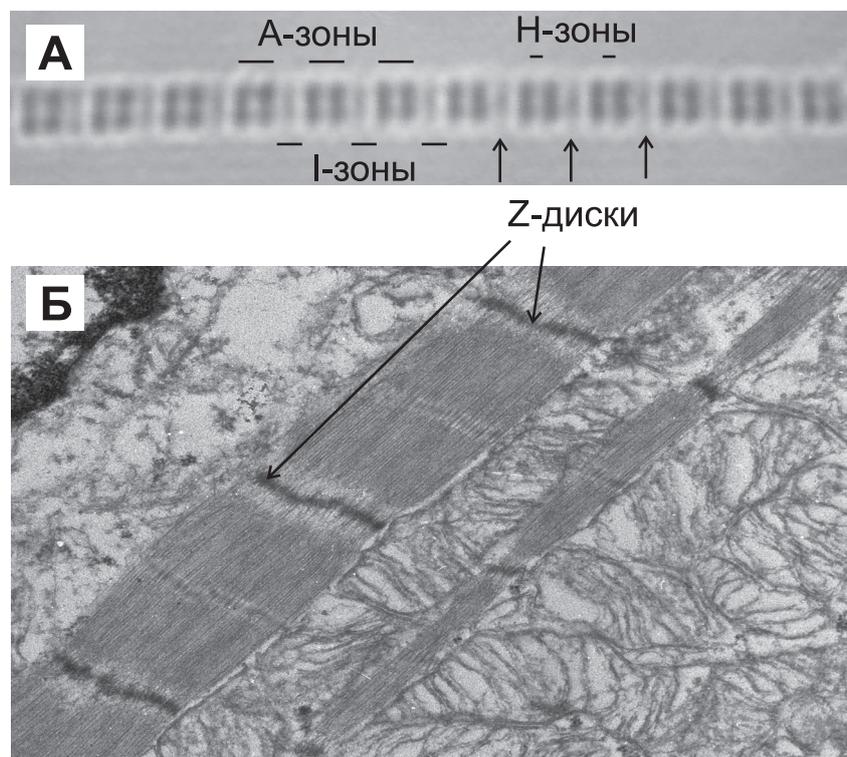


Рис. 2. Сократительный аппарат скелетной мышцы.

А. Фотография, сделанная в световой микроскоп. Указаны оптически различимые зоны саркомера.

Б. Электронная микрофотография.

(рис. 2). Отечественные биохимики показали, что при экстракции «миозина» из мышцы высокий коэффициент преломления А-зоны исчезает [5, см. также ссылки в 6].

Следующим очень важным шагом на пути исследования мышечного сокращения было открытие Энгельгардтом и Любимовой АТФазной активности миозина [7, 8]. Ими же было обнаружено, что гель миозина под влиянием АТФ способен изменять свой объём. На основании этих данных они высказали предположение о том, что расщепление АТФ миозином является движущей силой мышечного сокращения. Это представление лежит в основе современных представлений о механохимическом преобразовании энергии актин-миозиновым мотором.

Во время второй мировой войны, в 1942 г., работая в лаборатории А. Szent-Györgyi в университете Сегеда, венгерский биохимик Bruno Straub показал, что «миозин» является смесью двух белков [9]. Второй белок назвали актином из-за его способности активировать гидролиз АТФ миозином. Было показано, что актин и миозин диссоциируют при добавлении АТФ. Позднее, Szent-Györgyi показал, что обработанные глицерином мышечные волокна, содержащие только основные сократительные белки, укорачиваются при добавлении АТФ [10].

В 1953 г. с помощью электронной микроскопии Hugh Huxley и Jean Hanson показали, что в саркомере есть два семейства нитей, толстые и тонкие, но были очень осторожны в интерпретации результатов и не пытались совместить их с какой-либо из существовавших тогда гипотез о природе мышечного сокращения [11]. В следующем году в одном номере журнала *Nature* вышло две работы [12, 13], независимо, с использованием разных экспериментальных методов показавших, что I-зоны содержат только тонкие нити, А-зоны содержат нити обоих типов, и что при сокращении саркомеры укорачиваются так, что длина А-зоны остаётся неизменной, а укорачиваются только I-зоны (рис. 3). Авторы предположили, что при сокращении нити не изменяют длину, а скользят друг относительно друга. Эта гипотеза скользящих нитей была затем неоднократно подтверждена экспериментально и стала основой современных представлений о физике мышечного сокращения.

Термин «мышечное сокращение», конечно, исторический и не вполне точный. Под ним подразумевают совершение мышцей механической работы, т.е. укорочение против действующей на мышцу внешней силы, свободное активное укорочение без нагрузки или развитие активного механического напряжения при постоянной длине (изометрическое сокращение), в котором механическая работа не совершается. Увеличивать длину мышца может только под действием внешних сил, превышающих изометрическую.

Тонкие нити состоят, главным образом, из белка актина. Актин – очень широко распространённый и в то же время весьма консервативный белок с молекулярной массой 42 кД. Мономеры актина (их часто называют глобулярным, или G-актином) могут полимеризоваться, образуя фибриллярный F-актин. Полимерная нить актина имеет спиральную структуру (рис. 1, 9), которую часто представляют простой моделью левой спирали 13/6 (т.е. полный период спирали составляют 13 субъединиц, расположенных на 6 её оборотах). Осевой шаг между мономерами – около 2,75 нм, а угол поворота соседних мономеров примерно 167°, т.е. полный период

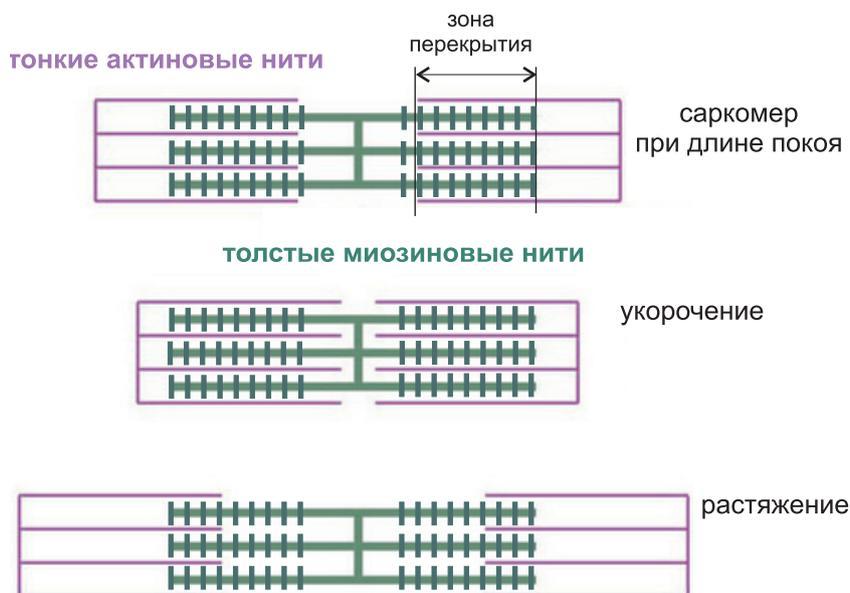


Рис. 3. Иллюстрация гипотезы скользящих нитей.

Видно, что при изменении длины саркомера длина А-зоны (зоны толстых нитей) остаётся постоянной, а меняется только длина неперекрытой с миозином части актиновых нитей (I-зоны). Область, где находятся и нити актина, и части миозиновых нитей, содержащие головки, называется зоной перекрытия.

равен $13 \times 2,75 \approx 36$ нм (Holmes и др., 1990). Длина искусственной актиновой нити, полученной полимеризацией G-актина, может достигать 20 мкм, в саркомере скелетной мышцы теплокровных её длина около 1 мкм. В тонких нитях поперечно-полосатых мышц имеются также и другие белки. Наиболее значимые из них – регуляторные белки тропомиозин и тропонин, управляемые ионами Ca^{2+} и обеспечивающие как активацию мышечного сокращения, так и расслабление мышц [14, 15]. Тропомиозин (Тm) был открыт уже в послевоенные годы [16]. Молекула тропомиозина состоит из двух скрученных между собой альфа-спиралей и имеет вид длинной слабо изогнутой спирали, примерно комплементарной спирали актина [17]; молекулярная масса тропомиозина 65 кД. Соседние молекулы тропомиозина соединены между собой «хвост к голове» [18] и образуют два длинных тяжа, идущих вдоль всей актиновой нити. Тропонин – глобулярный белок, открытый в лаборатории Ebashi в 1960-е гг. [19–21] с молекулярной массой 80 кД. В его состав

входят три субъединицы (Tn-I, Tn-C, Tn-T). Tn-C (кальций-связывающий) обладает значительным сродством к ионам кальция, Tn-I («ингибирующий») может присоединяться к актину, фиксируя весь тропонин-тропомиозиновый комплекс на его поверхности, и тем самым ингибируя связывание миозиновых головок с актином и их АТФазную активность, либо сам присоединяется к Tn-C, ослабляя связь регуляторных белков с актином. Tn-T (тропомиозин-связывающий) обеспечивает связь двух других субъединиц между собой и с тропомиозином. Каждый тропониновый комплекс связан с одной молекулой тропомиозина, осевой период повторения тропонин-тропомиозиновых комплексов на тонкой нити равен 14 шагам основной актиновой спирали, т.е. $14 \times 2,75 \text{ нм} \approx 38,5 \text{ нм}$, – чуть больше, чем период актиновой спирали.

Мышца не могла бы выполнять свою функцию, если бы она находилась в постоянно включённом состоянии. Для эффективной работы необходимо, чтобы в ней находились управляемые «выключатели». Роль этих выключателей выполняют ионы Ca^{2+} . В ответ на стимуляцию их концентрация внутри клетки повышается с 10^{-7} до 10^{-5} М. В зависимости от того, где располагаются Са-связывающие белки, принято различать миозиновый, характерный для гладких мышц и некоторых мышц моллюсков, и актиновый, доминирующий в поперечно-полосатых мышцах, типы активации.

Модель актиновой регуляции поперечно-полосатых мышц [22–24] предполагает, что в ответ на присоединение ионов Ca^{2+} к Tn-C [25] тропонин поворачивает связанный с ним тяж тропомиозина по поверхности актина таким образом, что на актиновых мономерах открываются миозин-связывающие участки (рис. 4). Исследованию связи между регуляцией мышцы и механикой её сокращения в настоящее время посвящены работы многих научных коллективов (см., например, [26]).

Известно, что моторный белок миозин, образующий толстые нити, обладает большим разнообразием [27]. В настоящее время описано 24 класса миозинов и определены аминокислотные последовательности более чем 100 представителей этого супер-семейства белков [28, 29]. Все миозины содержат одну или две тяжёлых полипептидных цепи и несколько легких цепей. N-конец каждой тяжёлой цепи образует глобулярную головку миозина или субфрагмент-1, S1, который способен связываться с актином и гидролизовать АТФ [30, 31]. В результате гидролиза АТФ выделяется химическая энергия, которая в ходе актин-миозинового взаимодействия превращается в механическую работу [8].

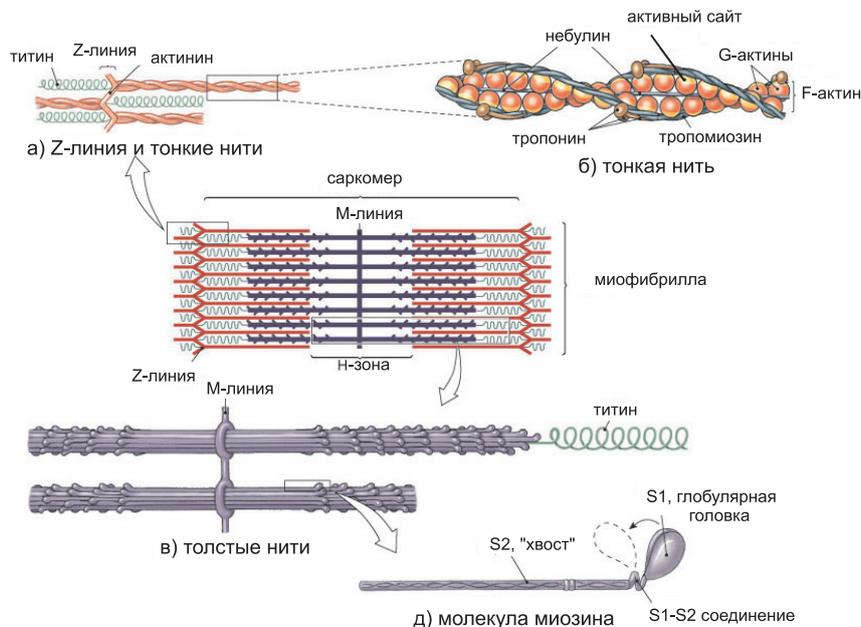


Рис. 4. Схема строения саркомера.

Показана упаковка основных мышечных белков в тонкие (а, б) и толстые (в, д) нити. Число миозиновых молекул в ярусе толстой нити может меняться в зависимости от вида, в мышцах высших позвоночных оно равно трём.

Миозиновая головка переходит в «шейку» – длинный α -спиральный участок тяжёлой цепи, с которым ассоциированы лёгкие цепи. Их количество в миозинах разного типа варьирует в широких пределах. Мышечный миозин, принадлежащий к классу миозинов II, содержит две тяжёлые и четыре лёгкие цепи. С-концевые участки каждой из тяжёлых цепей образуют супер- α -спиральный субфрагмент-2, S2, переходящий в длинный ствол и также супер- α -спиральный участок молекулы, называемый лёгким меромиозином (LMM, ЛММ). При физиологической ионной силе окружающего раствора ствольные участки молекул миозина агрегируют и образуют миозиновые нити (рис. 4). В скелетных мышцах эти нити обладают спиральной симметрией и представляют собой трёхзаходную правую спираль с периодом около 43 нм и осевым расстоянием между ярусами выступающих миозиновых головок $\sim 14,3$ нм.

Длинные суперспирализованные части молекул миозина (ЛИММ) образуют ствол толстой миозиновой нити диаметром около 15 нм. Кроме основного белка толстой нити – миозина, в ней присутствуют и другие белки: титин, С-белок и др. [32, 33].

III. МОСТИКОВАЯ МОДЕЛЬ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ, ГИПОТЕЗА РЫЧАГА

Первые молекулярные теории, описывающие механизм мышечного сокращения, возникли в 30-е годы прошлого века, но ни одна из них не оказалась сколь-нибудь верной. Основой современных представлений стала описанная выше гипотеза скользящих нитей [12, 13]. В этих же работах был задан вопрос о том, что же заставляет нити скользить, и высказано предположение, что за это отвечают какие-то структуры, соединяющие между собой тонкие и толстые нити. Вскоре с помощью электронной микроскопии были обнаружены выступы из миозиновых нитей, которые образовывали с актином поперечные мостики [34, 35], и впоследствии было показано, что именно миозиновые головки, образующие мостики, обладают АТФ-азной активностью. В летательной мышце насекомых было обнаружено два положения поперечных мостиков: перпендикулярное актиновым нитям и наклонённое примерно под 45° [36].

Структурные и биохимические экспериментальные данные, доступные к началу 1970-х годов, были объединены в схему Лимна-Тэйлора (рис. 5 А, [37, 38]).

Следуя этой схеме, вначале миозиновая головка вместе с АТФ или продуктами её гидролиза, АДФ и неорганическим фосфатом (P_i), присоединяется к актину в пре-силогенерирующем состоянии (на рис. 5 – под углом в 90° , состояние 4). Собственно гидролиз, или расщепление АТФ на АДФ и P_i , происходит, преимущественно, в отсоединённом состоянии. В отсутствие актина скорость гидролиза АТФ миозином лимитируется сбросом P_i , которая не превышает $0,05 \text{ с}^{-1}$ [39]. Если миозиновые молекулы упакованы в толстую нить, то в условиях, соответствующих расслабленному состоянию, миозиновые головки образуют упорядоченную структуру на её поверхности [40]. При этом скорость гидролиза АТФ оказывается ещё в 10 раз ниже [41]. Такая низкая скорость гидролиза АТФ миозином объясняет, почему расслабленная мышца почти не потребляет энергию.

Связывание S1 с актином ускоряет сброс фосфата и приводит к изменению формы S1 и его повороту, при этом он может совершить работу (рис 5 А, состояние 1). Это, в свою очередь, ускоряет сброс

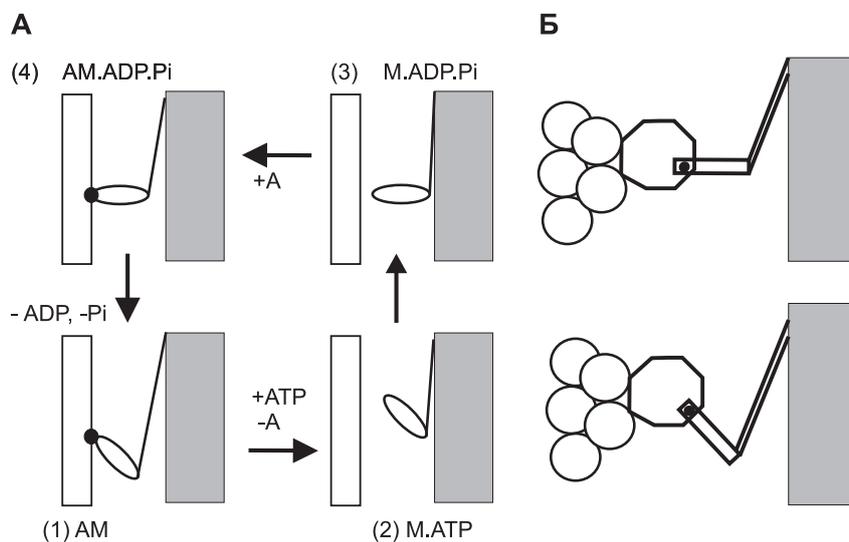


Рис. 5. А. Схема Лимна-Тэйлора работы поперечного мостика. На схеме АТФ, АДФ и P_i соответствуют АТФ, АДФ и неорганическому фосфату.

Б. Предполагаемые конформационные изменения в миозиновой головке во время рабочего шага [42, 43].

АДФ из активного центра S1, после чего присоединение новой молекулы АТФ вызывает отсоединение S1 от актина [37, 38]. В отсутствие АТФ головка присоединяется к актину в состоянии 1, соответствующем концу рабочего шага, такое состояние называют *rigor* (от *rigor mortis* – трупное окоченение). Поскольку в клетке живой мышцы АТФ в избытке, в этом состоянии миозиновая головка пребывает недолго. На один рабочий цикл мостика расходуется одна молекула АТФ.

Примерно в то же время были сделаны эксперименты, позволяющие оценить физические характеристики молекулярного мотора [44]. Авторы использовали быстрые (~ 1 мс) изменения длины сокращающегося одиночного интактного волокна мышцы лягушки и регистрировали силу, развиваемую волокном в ответ на его растяжение или укорочение. Смысл такого подхода состоит в том, чтобы, нарушив равновесные условия, в данном случае микроскопических механических событий в отдельных мостиках, синхронизировать эти события в макроскопически измеримый ответ силы целого волокна и интерпретировать этот ответ в терминах реакций «среднего» мостика. Предположив, что мостик, соединённый с толстой нитью упругим

элементом (по умолчанию предполагалось, что этим элементом является S2), катится по поверхности тонкой нити через ряд дискретных состояний, не меняя при этом формы, и что жёсткость как толстых, так и тонких нитей много выше жёсткости мостиков, авторы построили модель, которая вполне удовлетворительно описывала результаты механических экспериментов. По их оценкам «рабочий шаг» мостика, т.е. расстояние, на которое перемещается головка при расщеплении одной молекулы АТФ, составляет 8–10 нм.

Гипотеза о том, что развитие силы происходит в результате поворота мостиков, получила своё подтверждение в рентгенодифракционных экспериментах. Самый яркий меридиональный рефлекс МЗ на рентгенограмме сокращающейся мышцы, соответствующий осевому периоду ~14,5 нм, вызван повтором ярусов мостиков вдоль ствола толстой нити (рис. 9). Если бы «средний мостик» поворачивался при сокращении, как предлагала схема Лимна-Тэйлора, этот рефлекс становился бы слабее. Все попытки зарегистрировать подобные изменения на лабораторных источниках излучения были неудачными из-за того, что для получения надёжных данных на таких источниках необходима многочасовая экспозиция мышц рентгеновскому лучу, так что повреждение мышцы происходило намного раньше, чем удавалось достоверно измерить изменения интенсивности рефлекса. Первые станции, использующие синхротронное излучение для изучения биологических объектов, были построены в Гамбурге (DESY, [45, 46]). Ключевые эксперименты были сделаны в 1980-е г.г. Было продемонстрировано, что изменения интенсивности рефлекса 14,5 нм происходят на той же миллисекундной временной шкале, что и изменения силы [47]. Если сокращающуюся мышцу быстро укорачивали, так же, как в экспериментах А.Ф. Хаксли и Симмонса [44], то интенсивность меридионального рефлекса падала. Если затем быстро, в течение 1–2 мс, вернуть образцу его начальную длину, интенсивность рефлекса также возвращалась к начальному уровню. Если же длину образца не восстанавливали, а после укорочения удерживали постоянной, то интенсивность рефлекса тоже восстанавливалась, хотя и заметно медленнее [48]. С усовершенствованием всех используемых методов эти эксперименты были повторены на одиночном интактном мышечном волокне лягушки на источнике синхротронного излучения SRS с субмиллисекундным временным разрешением (Daresbury Laboratory, Великобритания; [49]). Экспериментальная регистрация движения поперечных мостиков синхронно с изменением силы была мощной поддержкой гипотезе поворачивающегося мостика.

Во второй половине 1980-х годов были созданы искусственные подвижные системы, в которых выделенные из мышц белки, актин и миозин, двигались друг относительно друга *in vitro* в присутствии АТФ [50–52]. Таким образом, было окончательно доказано, что АТФ, актин и миозин, а точнее, S1, способны обеспечить активное механическое движение в отсутствие надмолекулярной организации.

Удивительные эксперименты были сделаны Hugh Huxley с коллегами. Им удалось зарегистрировать изменения на второй актиновой слоевой линии при активации целой мышцы. Оказалось, что увеличение интенсивности на этой линии на достаточно больших обратных радиусах происходит сразу после начала активации и опережает развитие силы. Такое увеличение интенсивности могло быть вызвано только белками тонкой нити, а именно поворотом тропомиозина по поверхности актина, усиливающим четырёхскладчатую симметрию нити. Это было наглядным подтверждением механизма стерического регулирования тонкой нити [53].

С помощью белковой кристаллографии в 1990 г. была получена первая атомная структура актинового мономера и предложена модельная структура F-актина [54, 55], а в 1993 г. расшифрована атомная структура S1 миозина из мышц курицы [56]. Впоследствии были получены и другие структуры актина и S1. Последняя модель актина, которую можно считать истинно атомной, была получена недавно [57]. Оказалось, что при полимеризации конформация мономеров актина заметно меняется. Этим объясняется, почему только полимеры актина, а не глобулярный актин способны связывать миозин и поддерживать его движение.

Миозиновая головка, или протеолитический фрагмент миозина S1, содержит 843 аминокислоты тяжёлой цепи (95 кД) и ассоциированные лёгкие цепи (~15–20 кД каждая). Он сохраняет всю ферментативную активность миозина и является минимальным фрагментом, сохраняющим моторную активность целой молекулы. Дальнейший протеолиз разделяет тяжёлую цепь S1 на три фрагмента, названные по их молекулярному весу – 25 кД, N-концевой фрагмент, 50 кД, центральный, и 20 кД – С-концевой. Первая кристаллографическая структура S1 была получена при высокой концентрации соли без связанного нуклеотида [56].

Оказалось, что миозиновая головка имеет форму головы зверька с приоткрытой пастью (рис. 6). Длинная «шейка» образована альфа-спиральным участком тяжёлой цепи и ассоциированными с ней лёгкими цепями, одну из которых называют существенной, а другую – регуляторной. Шейка как рычаг увеличивает небольшие изменения,

происходящие в конвертерном домене в значительные, по белковым понятиям, перемещения С-конца, соединяющего головку с S2, а затем с толстой нитью. Собственно моторный, N-концевой участок головки, состоит из нескольких доменов, участвующих в связывании актина и АТФ (а после гидролиза – его продуктов, неорганического фосфата, P_i, и АДФ). «Пасть» делит центральный 50 кД домен на два субдомена – верхний и нижний, и они оба участвуют в связывании актина. АТФ-связывающий участок, или «карман», расположен между верхней «челюстью» (верхним субдоменом) и N-концевым участком и находится вблизи 7-заходного β-листа. Этот лист служит «крамой», к которой крепятся основные детали мотора. Нижняя «челюсть» также связана с АТФазным (активным) центром через «переключатель-2». Все эти детали могут двигаться друг относительно друга, и именно их согласованные перемещения приводят в действие мотор.

Вскоре после первой структуры S1 довольно быстро было получено ещё несколько структур миозиновых головок миозина разных типов в различных конфигурациях [58–67]. Огромную помощь кристаллографам оказали биохимики, открыв способ экспрессировать укороченный миозин [68]. Если получение атомной структуры полного S1 представляет собой героическую задачу, то укороченные S1 (без длинного «рычага» или его части) кристаллизуются довольно легко. Оказалось, что S1 миозина II из мышц моллюсков кристаллизуется лучше, чем S1 поперечно-полосатых мышц позвоночных, а их кристаллические структуры весьма похожи друг на друга [69].

Оказалось, что большинство полученных структур S1 распадается на два класса в зависимости от содержимого его активного центра. Эти два класса отличаются поворотом конвертерного домена примерно на 60°. Так как длинная «шейка» S1 жёстко связана с конвертером, то при его повороте «шейка» поворачивается как рычаг относительно каталитического (и актин-связывающего) домена S1. Такой поворот, в свою очередь, эквивалентен перемещению С-концевого участка S1 относительно места его присоединения к актину на 8–10 нм.

Было экспериментально показано, что скорость движения ненагруженного филаментарного актина по поверхности, покрытой миозином, линейно связана с длиной его α-спиральной «шейки», которую можно изменять с помощью генной инженерии [70].

На основании этих результатов была предложена гипотеза «рычага» ([42, 43], рис. 5 Б). Согласно этой гипотезе поворот «рычага» и есть тот процесс, в результате которого происходит относительное перемещение толстых и тонких нитей, а каталитический домен S1, однажды присоединившись, не изменяет своего положения на актине.



Рис. 6. Структура миозиновой головки или S1 миозина (по [56]).

Слева показан общий вид и обозначены основные структурно-функциональные элементы; справа с большим увеличением показана область контакта каталитического домена и рычага и их некоторые детали: реле спираль, реле петля и конвертер.

Поскольку эта гипотеза была сформулирована на основании изучения структуры кристаллов S1 в отсутствие актина, остается неясным, действительно ли все изменения актин-миозинового комплекса, обеспечивающие развитие силы или перемещение нитей, ограничиваются лишь перестройкой внутри S1 и не включают изменений в зоне его контакта с актином. Для ответа на этот вопрос необходимы данные об изменении структуры актин-миозинового комплекса в функционирующей системе, способной развивать активные усилия и перемещения.

Миозин V – это белок внутриклеточного транспорта. Он доставляет везикулы по длинным актиновым тяжам от центра клетки к периферии. Как и миозин II он двуглавый, только его «шейка» гораздо длиннее, поэтому он может двигаться большими шагами, равными полному периоду спирали актина 36 нм. В отличие от миозина II, миозин V – процессивный белок, то есть молекула способна двигаться по актину так, что в любой момент хотя бы одна из её головок присоединена к актину и поэтому она способна в одиночку перемещать груз вдоль нити на значительное расстояние. С биохимической точки зрения это значит, что даже после связывания АТФ или АДФ и фосфата, S1 миозина V прочно связан с актином. Полученная с помощью рентгеновской кристаллографии структура укороченного S1 миозина V без нуклеотида показала, что пасть между верхней и нижней челюстями центрального домена в этом состоянии закрыта [64].

При сравнении новой структуры S1 с полученными ранее оказалось, что при закрытии пасти происходит также движение переключателя 1, который открывает нуклеотид-связывающий

карман, и изгиб бета-складки [64]. Очень похожие изменения в положении переключателя 1 и в бета-складке видны в структуре S1 миозина II *Dictyostellium*, полученной в отсутствие нуклеотида [71]. Как показали эксперименты [72], в отличие от миозина V, в миозине II открытие переключателя 1 в отсутствие нуклеотида не приводит к закрытию пасти. Для этого необходимо связывание S1 с актином. Поэтому именно структуры с закрытой пастью соответствуют прочно связанному с актином состоянию миозина и могут служить моделью состояния ригора, а все структуры, в которых верхняя и нижняя челюсти разведены, соответствуют слабому связыванию миозина с актином. Позднее были получены структуры S1 миозина II, выделенного из некоторых морских животных, в которых в отсутствие нуклеотида переключатель 1 был открыт, а пасть – закрыта, хотя и не так плотно, как в миозине V [67]. В настоящее время структурные состояния S1 со слабым сродством к актину классифицируют как пре-силогенерирующее и пост-ригорное, в зависимости от положения рычага. Первая из полученных структур головки миозина II мышцы курицы [56] относится именно к пост-ригорному классу.

Интересно проследить связь структурных данных с результатами биохимических экспериментов, выполненных в растворе S1, актина и АТФ. Этой теме посвящён большой обзор [69], а мы выделим лишь ключевые моменты.

Прочность связывания головки миозина с актином максимальна, если АТФ-азный карман пуст или содержит только АДФ. Константа равновесия между свободным и связанным с актином S1 составляет менее 0,1 мкМ (10^{-7} моль/л). При истощении АТФ в мышце все миозиновые головки прочно присоединяются к актину и мышца становится очень жёсткой – наступает состояние ригора. Это обусловлено тем, что для прочного связывания с актином верхняя и нижняя челюсти должны сблизиться и закрыть пасть между ними (рис. 7). Лишь в этом случае актин-связывающий участок головки становится комплементарным соответствующей поверхности актина и может прочно связаться с ним (рис. 7). При закрытии пасти верхняя челюсть поворачивается как целое относительно остальной части каталитического домена и открывает АТФ-азный карман. Таким образом, активный и актин-связывающий центры S1 функционируют согласованно, хотя находятся в 3–4 нм друг от друга. Если в активном центре головки находится АТФ или оба продукта гидролиза, АДФ и P_i , то прочность связывания с актином падает почти в 1000 раз. Это происходит потому, что связывание АТФ приводит к закрытию кармана и, соответственно, к раскрытию пасти. Всё время, пока

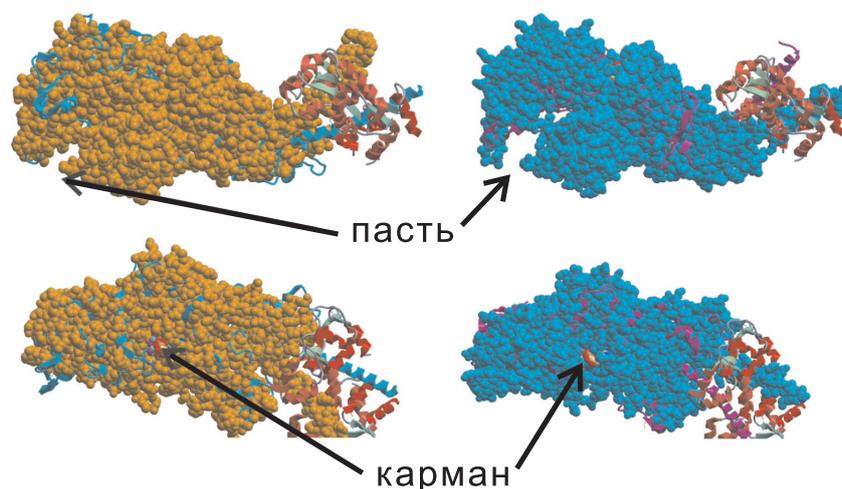


Рис. 7. Структуры S1 миозина V без нуклеотида (слева, PDB код 1W8J) и в присутствии АДФ и аналога неорганического фосфата – BeF (справа, PDB код 1W7J). Верхние и нижние картинки получены поворотом на 90°. Для визуализации нуклеотидного кармана свободного S1 в него искусственно вставлена молекула АТФ. Рисунок выполнен с помощью программы ICM (Molsoft, CA, USA).

активный центр остается закрытым, актин-связывающая пасть открыта, независимо от того, произошёл гидролиз или нет. При этом S1 может легко отсоединиться от актина, а потом присоединиться к другому мономеру. Для успешного гидролиза необходимо, чтобы карман активного центра был полностью закрыт – лишь в этом случае возможно образование многочисленных связей между атомами аминокислот белка, Mg и АТФ, которые ослабляют связь между γ -фосфатом и остальной частью АТФ. Без этого молекула воды не может расщепить АТФ. Между открытым и закрытым состояниями активного центра существует динамическое равновесие [73, 74]. Оно сильно зависит от температуры: её увеличение способствует закрытию нуклеотидного «кармана».

Имеется определенная конкуренция между связыванием S1 с нуклеотидом и с актином. Константа связывания S1 с АТФ и с АДФ существенно снижается, если S1 прочно связан с актином. Это, по-видимому, объясняется тем, что прочное связывание с актином сопровождается поворотом верхней «челюсти». Такой поворот приводит не только к закрытию пасти, но и к открытию нуклеотидного «кармана» (рис. 7), что ослабляет прочность связывания нуклеотида. Наоборот,

связывание АТФ или её аналогов с S1 ослабляет его сродство к актину, поскольку способствует закрытию нуклеотидного кармана и открытию пасти на актин-связывающей поверхности S1.

Отметим на первый взгляд парадоксальный факт: сам по себе гидролиз АТФ в S1 легко обратим – константа равновесия этой реакции составляет около 10, т.е. на 10 гидролизованных молекул АТФ приходится одна, вновь синтезируемая из АДФ и P_i, что соответствует разности свободных энергий всего в $k_B T \ln(10) \approx 10^{-20}$ Дж, где k_B – константа Больцмана, а T – абсолютная температура. Свободная энергия гидролиза АТФ в 10 раз больше, около 10^{-19} Дж. Куда же расходуется оставшаяся энергия? Она запасается внутри миозиновой головки, мотор «заряжается» и готов «выстрелить» – произвести механическую работу при взаимодействии с актином. Перемещения отдельных деталей S1 при связывании АТФ невелики. Однако внутренние напряжения в молекуле S1, по-видимому, весьма значительны. Они, например, приводят к раскручиванию жёсткого β-листа [69].

Рассмотрим теперь цикл работы мотора, начиная, с той стадии, когда миозиновая головка связала и гидролизовала АТФ, т.е. полностью «заряжена» и готова к работе. Если актин недоступен, то продукты гидролиза АТФ надолго остаются в активном центре, пока в результате крупномасштабной, а поэтому редкой, флуктуации АТФ-азный карман не откроется сам, и P_i, а затем и АДФ, смогут покинуть активный центр. S1 может связать новую молекулу АТФ лишь после сброса продуктов гидролиза. Благодаря такому медленному сбросу продуктов, головка S1 в расслабленной мышце расщепляет всего две молекулы АТФ в минуту и расход горючего на «холостом ходу» мотора очень мал. В активном сокращении сброс фосфата резко ускоряется. Взаимодействие головки с актином происходит в несколько этапов. На первом этапе головка связывается с актином слабо, главным образом за счёт электростатического взаимодействия отрицательно заряженных групп на поверхности актина и положительно заряженных групп в разупорядоченной петле 2, расположенной между верхней и нижней челюстями S1. На втором этапе челюсти смыкаются, и слабая связь с актином преобразуется в прочную. Как именно и почему присутствие актина способствует закрытию пасти S1 неизвестно, потому что все атомные структуры миозиновых головок были получены в отсутствие актина. Как мы уже обсуждали выше, закрытие пасти сопровождается поворотом верхней челюсти и частичным раскрытием АТФ-азного кармана.

Следующий этап связан с высвобождением запасённой энергии и превращением её в механическую работу. Образование прочного комплекса S1 с актином и закрытие «пасти» также облегчает движение переключателя-1, связывающего нижнюю «челюсть» с АТФазным карманом. Небольшие, всего на 0,2 нм, перемещения переключателя вызывают крупномасштабную перестройку всей миозиновой головки. Его движение передаётся к нижней челюсти S1 и вызывает там целую цепочку конформационных изменений. Открытие переключателя-1 приводит к закручиванию одного частично раскрученного витка так называемой «реле» α -спирали, которая тянется от актин-связывающего участка нижней челюсти в область «рычага» (рис. 6). Это приводит к повороту реле-петли, находящейся на конце реле-спирали, и её смещению по отношению к SH-спирали. В результате этих изменений в нижней части конвертерного домена S1, находящегося в тесном контакте с жёстким доменом рычага, называемым конвертером, последний поворачивается на 60–65°, «перецёлкиваясь» в энергетически более выгодное положение. Поскольку длина рычага составляет 8 нм, такой поворот вызывает смещение его конца на 10 нм – расстояние во много раз превосходящее перемещение «переключателя». Именно поворот рычага вдоль оси актина и является элементарным «шагом» миозинового мотора.

После того, как в результате поворота верхней челюсти и срабатывания переключателя-1, приводящего к повороту рычага, АТФазный карман S1 полностью открывается, продукты гидролиза легко его покидают и освобождают место для новой молекулы АТФ. Поэтому связывание с актином ускоряет цикл гидролиза АТФ одной головкой миозина до 40 молекул в секунду, что по крайней мере в 100 раз быстрее, чем в отсутствие актина [75]. В свою очередь, связывание АТФ и закрытие кармана приводит к раскрытию пасти и ослаблению связи головки с актином. Теперь она легко от него отсоединяется. Захват новой молекулы АТФ приводит к закрытию кармана. Когда тот закрывается полностью, он втягивает в себя переключатель и рычаг возвращается в исходное положение. Теперь мотор вновь «заряжен» и готов к новому циклу работы с участием другого мономера актина.

Заметим ещё раз, что описанная выше схема работы миозинового мотора основана на сравнении различных структур кристаллов S1, полученных в отсутствие актина. Поэтому остаётся неясным, как его взаимодействие с актином, а также силы, развиваемые при актин-миозиновом взаимодействии, и перемещения в организованной системе в саркомере влияют на изменение формы S1 и какие именно изменения актин-миозинового комплекса приводят к совершению механической работы.

IV. РЕНТГЕНОДИФРАКЦИОННАЯ КАРТИНА МЫШЦЫ

Миофибриллы в скелетной мышце упорядочены настолько хорошо, что упаковка сократительных белков в саркомере близка к кристаллической. Актин, миозин, а также другие белки толстых и тонких нитей порождают богатый набор экваториальных и меридиональных рефлексов и слоевых линий на дифракционной диаграмме. В первых работах Н.Е. Нухлеу по дифракции на мышце эти рефлексывы были успешно использованы для получения информации о структуре мышцы в различных физиологических и биохимических состояниях [1, 76].

Схема рентгенодифракционного эксперимента показана на рис. 8. Образец (на рисунке показан зелёным прямоугольником) помещают в экспериментальную установку. Входящий поток монохроматического рентгеновского излучения рассеивается на образце, рассеянные лучи регистрируют двумерным детектором. Поскольку мышца слабо рассеивает рентгеновские лучи и не образует истинно кристаллической структуры, то все регистрируемые рефлексывы лежат в области малых углов, и поэтому используют плоский детектор. В экспериментах образцы устанавливают вертикально или горизонтально. С горизонтально расположенным препаратом удобнее работать, зато вертикальное расположение обеспечивает лучшее пространственное разрешение вдоль меридиана, так как луч синхротрона лучше коллимирован в вертикальном направлении, чем в горизонтальном.

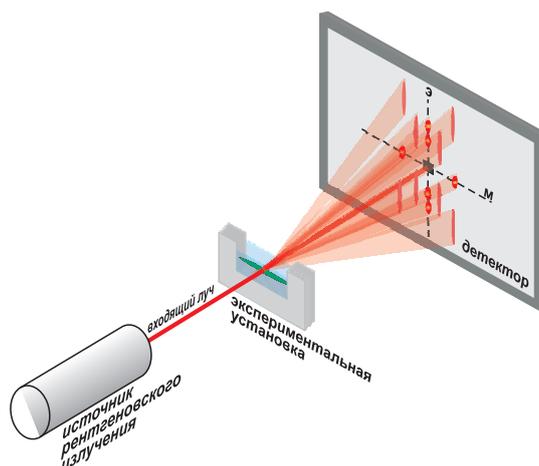


Рис. 8. Схема рентгенодифракционного эксперимента.

Экваториальная и меридиональная оси детектора помечены буквами «э» и «м» соответственно.

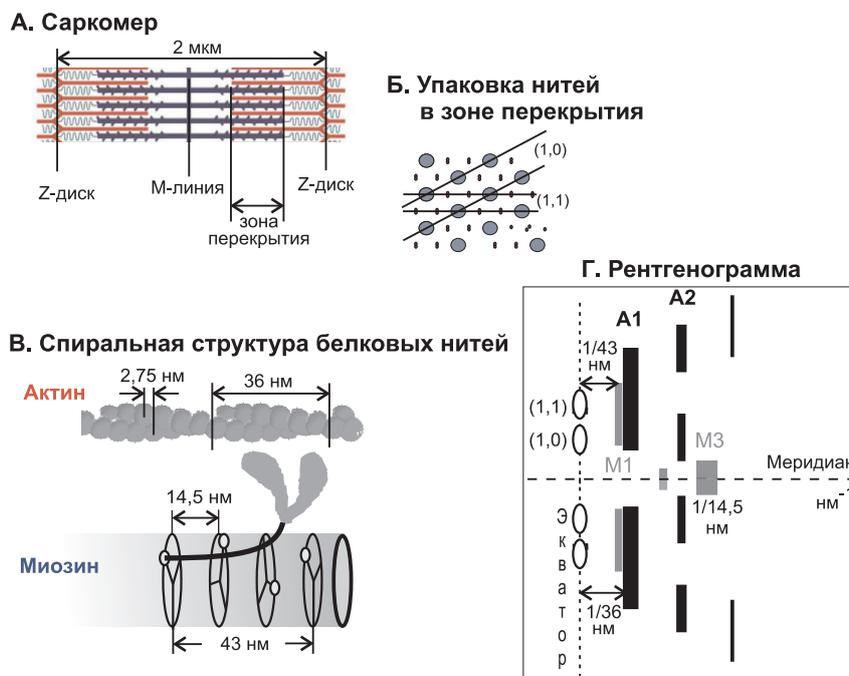


Рис. 9. Периодические белковые структуры саркомера и соответствующие им рефлексы на рентгенограмме скелетной мышцы.

На *В* показаны параметры спиралей актиновых и миозиновых нитей. Шаг спирали (осевое расстояние между соседними мономерами) актина $\sim 2,75$ нм и её период (полный повтор) ~ 36 нм, шаг миозиновой спирали $14,5$ нм, период ~ 43 нм.

Современные источники синхротронного излучения создают пучок монохроматических рентгеновских лучей интенсивностью до 5×10^{13} фотонов/с в луче размером $0,2\text{--}0,3$ мм, лишь ненамного превосходящем диаметр мышечного волокна. Это позволяет получать рентгенодифракционное «кино» одиночной клетки с разрешением 1000 кадров/с, а для наиболее яркого рефлекса М3 достичь рекордного временного разрешения $0,02$ мс [2]. Синхронизовать движения отдельных моторных молекул можно с помощью внешних импульсных воздействия. Такими воздействиями могут быть быстрые ступенчатые изменения длины сокращающейся мышцы или одиночного волокна [49], субмиллисекундный скачок температуры [77, 78], фотолитическое выделение АТФ из её негидролизованного аналога под действием вспышки света ультрафиолетового лазера [79, 80] или скачок давления [81].

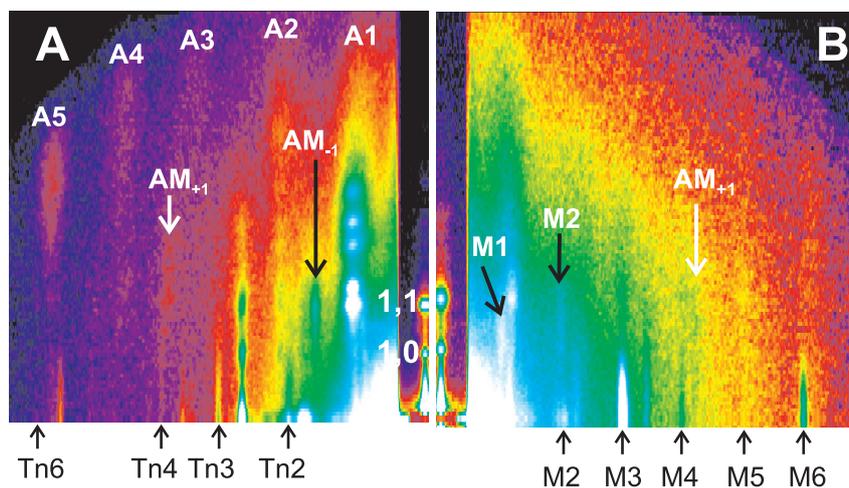


Рис 10. Рентгенограммы одиночного волокна скелетной мышцы кролика в ригоре (А) и в активном сокращении при 30 °С (Б).

Для каждого состояния показан только один из четырёх симметричных квадрантов ($0,155 \text{ nm}^{-1} \times 0,155 \text{ nm}^{-1}$ в обратном пространстве), экватор расположен вертикально. Использованы два $\sim 3,5$ мм сегмента демембранизованного мышечного волокна, экспозиция по 400 мс в каждом состоянии, длина камеры 4,2 м; интенсивность показана в логарифмической шкале, чтобы можно было увидеть и слабые, и яркие рефлекссы, чем светлее цвет точки, тем выше интенсивность в ней. Наиболее яркие рефлекссы подписаны. На детекторе вдоль экватора был поставлен attenuator, чтобы избежать насыщения детектора.

Наиболее яркие рефлекссы видны на экваторе – оси детектора, перпендикулярной оси волокна. Рефлекссы на меридиане – оси детектора, параллельной оси волокна, – заметно слабее. Слоевые линии – рефлекссы в форме линий, параллельных экватору, в целом, ещё менее яркие, чем меридиональные рефлекссы. Соответствие между белковыми структурами саркомера и рентгенодифракционной картиной схематически показано на рис. 9. Здесь и далее будем называть периодом структуры величину в физическом пространстве, имеющую размерность нанометр (нм), а положением, или координатой рефлекса, – величину в обратном пространстве, т.е. с размерностью обратный нанометр (nm^{-1}). При увеличении периода положение соответствующего рефлекса уменьшается.

Экспериментальная рентгенограмма одиночного волокна скелетной мышцы кролика в ригоре и в изометрическом сокращении при 30 °С показана на рис. 10.

ЭКВАТОРИАЛЬНЫЕ РЕФЛЕКСЫ

В саркомере, в зоне перекрытия, толстые и тонкие нити образуют гексагональную решётку, в которой миозиновые нити находятся в узлах решётки, а актиновые нити – в вершинах треугольников (рис. 9 Б, [82]). Дифракция на такой решётке даёт характерный набор экваториальных рефлексов (рис. 9 Г). Поскольку ориентация решёток в разных миофибриллах по отношению к входящему лучу случайна, то дифракционная рентгенограмма мышцы показывает квадрат преобразования Фурье электронной плотности белковых нитей, осреднённый по всем возможным азимутальным углам. Любой экваториальный рефлекс содержит вклад только тех участков саркомеров, для которых угол между соответствующей плоскостью (h, k) и входящим лучом равен брэгговскому углу для данного рефлекса.

Два наиболее ярких экваториальных рефлекса $1,0$ и $1,1$ соответствуют дифракции на плоскостях, показанных на рис. 9. Период этих рефлексов равен $\sqrt{3}d/2$ для $(1,0)$ и $d/2$ для $(1,1)$ где d – расстояние между двумя соседними толстыми нитями в саркомере. Изменения абсолютных величин и соотношения интенсивностей этих рефлексов, $I_{1,0}, I_{1,1}$, были замечены при сравнении рентгенограмм расслабленной мышцы и мышцы в состоянии ригора ([83], рис. 11). В ригоре $I_{1,1}$ увеличивается, а $I_{1,0}$ снижается. Качественно это можно объяснить движением миозиновых головок, которые в расслабленной мышце были сосредоточены у поверхности миозиновых нитей, или в плоскостях $(1,0)$, к актиновым нитям, лежащим в плоскостях $(1,1)$ [83]. В активном сокращении $I_{1,0}, I_{1,1}$ принимают промежуточные значения между теми, которые достигаются в ригоре и в покое (рис. 11, [84]).

Отношение $I_{1,1}/I_{1,0}$ было использовано для оценки доли миозиновых головок в активном сокращении [84, 85]. Этот подход используется до сих пор [86], особенно для исследования сердечных мышц [87]. Однако распределение интенсивности по экватору зависит не только от числа присоединённых головок, но и от некоторых других параметров. В частности, на это распределение сильно влияет степень упорядоченности актин-миозиновой решётки [88].

В неперекрытой зоне саркомеров, или в I-зоне, тонкие нити образуют другую, квадратную, решётку, обусловленную геометрией их встраивания в Z-линию [82]. Эта квадратная решётка видна на экваторе как «Z-рефлекс», расположенный между рефлексами $1,0$ и $1,1$ (рис. 11).

На интенсивности экваториальных рефлексов влияет также распределение отсоединённых головок вокруг толстых нитей. Было показано, что в расслабленной мышце млекопитающих увеличение темпера-

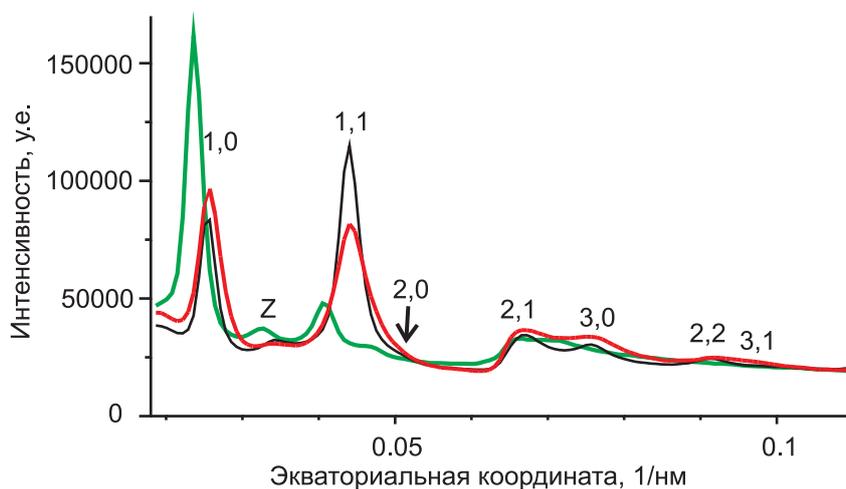


Рис. 11. Дифракция на мышце в экваториальной плоскости.

Экваториальный профиль интенсивности на рентгенограмме одиночного демембранизованного волокна плавниковой мышцы камбалы в расслабленном состоянии (зелёная линия), в ригоре (чёрная) и во время изометрического сокращения при 5 °С (красная).

Данные получены на станции ID02 ESRF. Экспозиция по 100 мс в каждом состоянии, длина волны 0,1 нм, длина камеры 2,5 м. Атенюатор, поставленный вдоль экватора, уменьшал интенсивность в области обратных координат, меньших $0,064 \text{ nm}^{-1}$, в несколько раз, чтобы избежать насыщения детектора. Основные рефлекс подписаны.

Здесь и на рис. 12, 13 у.е. – единицы ПЗС детектора

туры с 5 °С до 20 °С вызывает переход отсоединённых миозиновых головок из разупорядоченного состояния в спиральную упаковку на стволе толстой нити [89]. Этот переход также сопровождается уменьшением отношения $I_{1,1}/I_{1,0}$ [89, 90] и увеличением беспорядка актиновых нитей, наблюдаемого на электронных микрофотографиях [91, 92].

Также известно, что небольшие изменения размера решётки вызывают значительные изменения экваториальных рефлексов [88]. При переходе демембранизованного мышечного волокна из расслабленного состояния в ригор, решётка сжимается довольно сильно. При увеличении ионной силы уменьшение размера решётки может достигать 10 % (рис. 11). В интактом мышечном волокне развитие сокращения не приводит к сколько-нибудь значительному сжатию решетки [93]. Небольшое уменьшение размеров решётки происходит, когда волокно развивает активную силу в присутствии

АТФ и Ca^{2+} (рис. 11). Это, вероятно, происходит из-за радиальной компоненты активной силы поперечных мостиков [94]. Интактное волокно в тетанусе при обратной связи по длине саркомеров тоже сжимается, но незначительно, примерно на 2% [93]. В сердечной мышце изменения размеров решётки из-за изменений в длине саркомеров и степени активации, возможно, объясняют известный закон Франка-Старлинга [95, 96].

МЕРИДИОНАЛЬНЫЕ РЕФЛЕКСЫ

Меридиональные рефлексы на дифракционной рентгенограмме отражают структуры, имеющие периодичность вдоль оси волокна. Меридиональные распределения интенсивности на малоугловой рентгенограмме скелетной мышцы кролика показаны на рис. 12.

Меридиональные рефлексы тонких нитей

Основной актиновый меридиональный рефлекс соответствует расстоянию между двумя соседними мономерами, его положение в обратном пространстве $\sim(2,75 \text{ нм})^{-1}$ (рис. 9). В соответствии с наиболее простой моделью актиновой спирали 13/6, в которой 13 мономеров приходятся на 6 полных оборотов левовращающей спирали, будем называть этот рефлекс А13. Связывание миозиновых головок с актином в ригоре или во время активного сокращения ведёт к увеличению интенсивности А13 (рис. 12 Б) за счёт эффективного увеличения электронной плотности актиновой спирали.

Изменения положения этого рефлекса использовали для определения осевой растяжимости тонкой нити при увеличении нагрузки, при Са-активации и при присоединении миозиновых головок к актиновой нити. В рентгенодифракционных экспериментах податливость актиновых нитей была оценена в $0,2\text{--}0,3\% / T_0$, где T_0 – изометрическое напряжение, составляющее для целой мышцы *m. sartorius* лягушки при 10 °С 200–300 кПа [97, 98]. Вскоре было показано, что активация вызывает укорочение актиновой нити, и оценки растяжимости актина выросли до $0,6\% / T_0$ [99, 100]. Мы показали, что сильное связывание миозиновых головок с актином без развития растягивающего напряжения ведёт к 0,2 % удлинению тонких нитей [101]. С учётом этих результатов, значение податливости тонкой нити, полученное нами ранее в механических экспериментах [102], теперь согласуется с рентгенодифракционными данными.

Кроме актиновых меридиональных рефлексов (А13 и его более высоких порядков), у тонких нитей есть ещё серия меридиональных рефлексов, обусловленных повторяющейся осевой структурой регуляторных белков тонкой нити. Тропонин и тропомиозин имеют

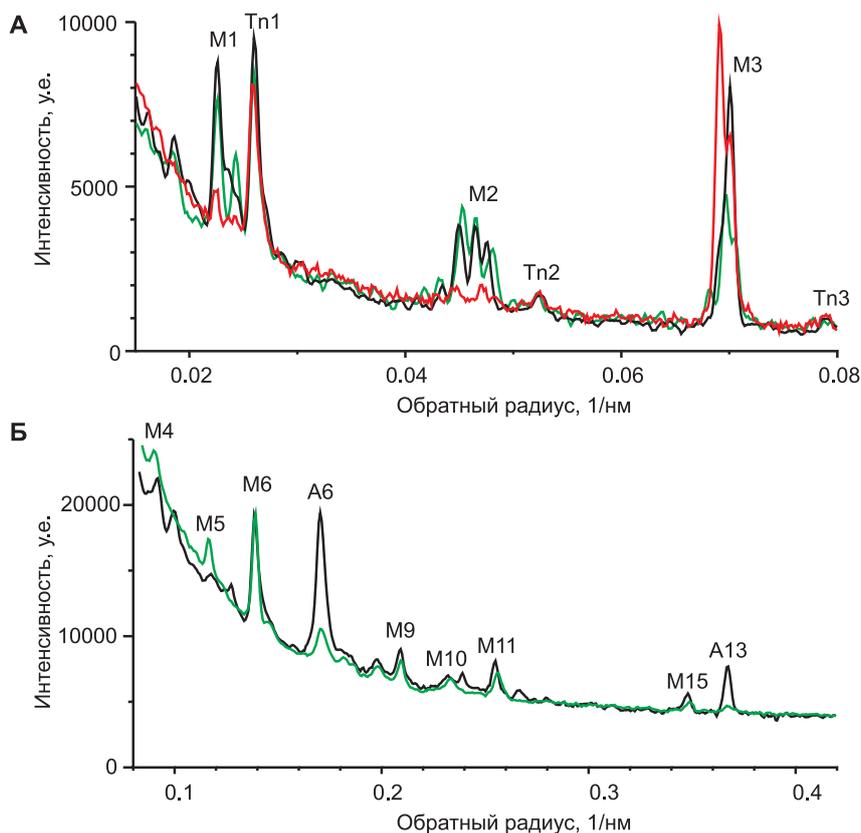


Рис. 12. Распределение меридиональной интенсивности при дифракции на мышце кролика в различных состояниях.

Распределение интенсивности вдоль меридиана на рентгенограммах тонких пучков мышц кролика в расслабленном состоянии (зелёная линия), в ригоре при низкой силе (чёрная) и во время изометрического сокращения при $\sim 30^\circ\text{C}$ (красная). Данные собраны на станции ID02 Европейского источника синхротронного излучения (ESRF), длина камеры 10 м (А) и 2,5 м (Б); более подробно экспериментальные детали описаны в нашей публикации [101]. Индексы А, М, и Тп соответствуют актиновым, миозиновым и тропониновым рефлексам.

общий осевой период $\sim 38,5$ нм, который больше периода актиновой спирали, он примерно в 14 раз больше, чем шаг спирали актина. Вклад тропонина в меридиональные рефлексы, по-видимому, существенно больше вклада тропомиозина, поэтому эти рефлексы называют тропониновыми – Тп1, Тп2 и Тп3 (рис. 10). Интенсивности этих рефлексов также меняются при изменении состояния мышцы (рис. 12 А [103]).

Меридиональные рефлексы толстых нитей

Рефлексы толстых нитей называют миозиновыми, хотя они частично обусловлены дифракцией и на других белках толстых нитей. Их период составляет примерно 43 нм, т.е. положение $M1 \approx (43 \text{ нм})^{-1}$, следующего максимума $M2 - 2/43 = (21,5 \text{ нм})^{-1}$, $3/43 \text{ нм} = (14,33 \text{ нм})^{-1}$ для $M3$ и т.д. (рис. 9). Наиболее яркий миозиновый рефлекс – $M3$, соответствует осевой периодичности ярусов миозиновых головок на стволе толстой нити. Если бы миозиновая нить являлась идеальной трёхзаходной спиралью, в которой каждый ярус миозиновых головок повёрнут относительно предыдущего на 40° и сдвинут по оси на фиксированное расстояние $\sim 14,3$ нм, наблюдаемые меридиональные рефлексы имели бы индексы кратные 3: $M3, M6, M9$ и т.д. [82]. На самом деле существуют и другие меридиональные рефлексы, $M1, M2, M4, M5$ и т.д., называемые запрещёнными, т.к. они вызваны отклонениями структуры толстой нити от идеальной трёхзаходной спирали. «Запрещённые» рефлексы очень хорошо видны на рентгенограммах расслабленной мышцы, они менее яркие в ригоре и совсем слабые в изометрическом сокращении (рис. 10).

Отклонения от трёхзаходной симметрии были приписаны влиянию С-белка на структуру толстых нитей [104, 105]. С-белок, или МуВР-С, – миозин-связывающий белок, присутствующий в виде 7–9 колец на стволе толстой нити в зоне перекрытия с актином при физиологических длинах саркомеров, с периодом очень близким или совпадающим с $M1$ [82]. Недавние эксперименты, выполненные на сердечной мышце мышей с нокаутом гена, кодирующего С-белок, показали, что для таких толстых нитей характерны только рефлексы, кратные $M3$, а «запрещённые» рефлексы исчезают, т.е. структура приближается к регулярной трёхзаходной спирали [33].

Осевой период толстой нити, оцененный по положению наиболее яркого рефлекса $M3$, составляет 14,34 нм в покоящейся мышце лягушки, 14,42 нм в ригоре [106] и 14,56 нм во время изометрического сокращения [107]. Похожие, до 1,5 %, изменения положений при активации были зарегистрированы для $M6$ и миозиновых рефлексов более высоких порядков [97, 98, 107–109]. Такие изменения структуры, видимо, вызваны не растяжением миозиновых нитей под действием внешней силы, а перестройкой ствола толстой нити при активации. Природа этого феномена пока неизвестна. Зависимость изменений положения миозиновых рефлексов от длины саркомеров довольно непростая. Когда расслабленную мышцу вытягивали до длин саркомеров, при которых толстые и тонкие нити почти не перекрываются, координаты миозиновых рефлексов высокого

порядка, М6, М9 и М15, увеличивались на 0,4–0,8 % [98]. Электрическая стимуляция при этих длинах саркомеров также не вызывала изменений в положении этих рефлексов, хотя при длинах саркомера, при которых перекрытие равно половине максимального, наблюдали увеличение положений рефлексов на ~1 % [98]. Когда мышцам или одиночным волокнам, сокращающимся при полном перекрытии нитей, позволяли укоротиться под небольшой нагрузкой, положения М3 (и М6) частично возвращались к своим значениям в расслабленной мышце (до 14,4–14,45 нм для М3; [109, 110]).

Принято считать, что в сокращающейся мышце вклад в интенсивность М3, I_{M3} , дают только миозиновые головки – как присоединённые к актину, так и неприсоединённые [48]. Линейное снижение I_{M3} с уменьшением зоны перекрытия при растяжении волокон до больших длин саркомеров показало, что основной вклад в этот рефлекс дают присоединённые головки [111]. Многие авторы полагают, что М6 и миозиновые рефлекс более высоких порядков происходят от структур ствола толстой нити, отличных от миозиновых головок, так что изменения положения этих рефлексов можно использовать для определения податливости толстой нити [48, 112–114]. Другие считают, что все миозиновые рефлекс содержат значительный вклад головок [115, 116]. Увеличение интенсивности М6 на 60 % после ступенчатого укорочения и падение на 25 % после ступенчатого растяжения [113, 117], или во время укорочения с максимальной скоростью [110] показывает, что в интенсивность М6 дают вклад и головки, и ствол толстой нити и поэтому при интерпретации результатов измерения положения и интенсивности этого рефлекса нельзя пренебрегать ни тем, ни другим.

Упругую растяжимость толстых нитей пробовали оценить, прикладывая к сокращающейся мышце или одиночным мышечным волокнам ступенчатые изменения длины, длительность которых (~0,1 мс) существенно меньше характерного времени отсоединения – присоединения головок и даже силогенерирующего шага миозинового мостика. В конце ступенчатого укорочения волокна S_{M3} в одиночном интактном волокне лягушки падал на 0,14 %/ T_0 ([3], здесь и далее S_x означает периодичность в физическом пространстве, которая соответствует наблюдаемой меридиональной координате рефлекса X в обратном пространстве). В конце фазы быстрого частичного восстановления напряжения (или фазы 2, по [44]) увеличение S_{M3} было ещё больше, 0,34 %/ T_0 [3]. Для одиночного волокна *m. tibialis anterior* лягушки *Rana temporaria* при 4 °C T_0 составляет 280–290 кПа. Похожие изменения на 0,33–0,36 %/ T_0 были найдены для S_{M3}

в поздних фазах ответов на укорочение и в экспериментах на целой мышце лягушки [113].

Значение податливости толстых нитей $0,26\%/T_0$ было получено по измерению положения М6 в экспериментах с быстрыми изменениями нагрузки [112, 113]. Следует отметить, что изменения положения миозиновых меридиональных рефлексов могут быть вызваны двумя причинами: (а) изменениями в $\sim 14,5$ нм осевом периоде ярусов миозиновых головок вдоль ствола толстой нити, и (б) изменениями длины актиновых нитей, к которым присоединены миозиновые головки, дающие вклад в интенсивность соответствующего рефлекса. Интерпретация этих изменений может быть ещё более сложной, если миозиновые головки претерпевают конформационные изменения во время и/или после ступенчатого изменения длины волокна или нагрузки. Оценки податливости, сделанные по измерениям М6 и дальних рефлексов, возможно, более корректны, хотя, как было сказано выше, нельзя исключить вклад присоединённых миозиновых головок и в интенсивности этих рефлексов.

При развитии изометрического тетануса в интактном волокне [109, 110] или целой мышце лягушки [48, 118] I_{M3} сначала падает, потом снова возрастает. Эти изменения I_{M3} сопровождаются увеличением его радиальной ширины (рис. 13). Было высказано предположение, что увеличение ширины рефлекса вызвано большей латеральной разупорядоченностью толстых нитей [118]. В расслабленной мышце лягушки ширина М3 соответствует латеральному размеру когерентно дифрагирующей структуры около 400 нм, что примерно соответствует радиусу миофибриллы [106]. При сокращении ширина М3 увеличивается почти вдвое из-за того, что активные силы вызывают разупорядочивание толстых нитей внутри миофибриллы, т.е. уменьшают размер когерентно дифрагирующего участка ([118]; рис. 13 А).

Чтобы скорректировать наблюдаемую интегральную интенсивность на эффект беспорядка, было предложено умножать наблюдаемую I_{M3} на радиальную ширину рефлекса, измеренную как радиус в обратном пространстве, при котором интенсивность М3 достигает половины максимального значения [118]. После такой коррекции I_{M3} сокращающейся мышцы значительно увеличивается [118, 110]. Осевой беспорядок миозиновых нитей соответствует беспорядку 2-го рода, так что эффект осевой упорядоченности нитей на интенсивность меридионального рефлекса может быть выражен количественно.

Например, увеличение температуры сокращающегося интактного волокна лягушки с 2°C до 17°C ведёт к лишь 11 % увеличению наблюдаемой I_{M3} . После коррекции на изменение ширины эта

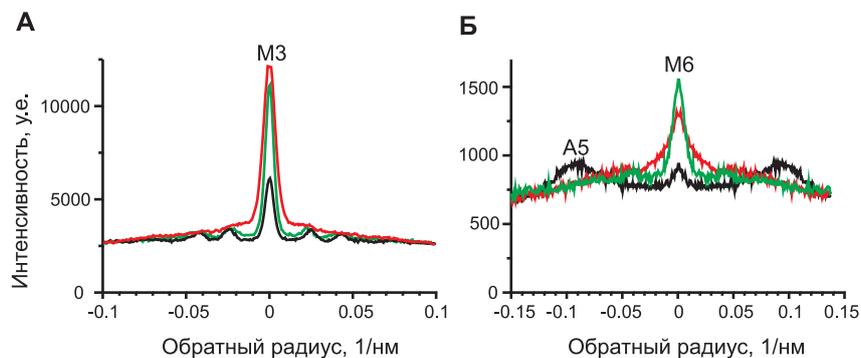


Рис. 13. Радиальное распределение профилей интенсивности рефлексов М3 (А) и М6 (Б).

Данные полученные на одиночном волокне из *t. psoas* кролика расслабленном состоянии (зелёная линия), в ригоре (чёрная линия) и во время изометрического сокращения при 5 °С (красная линия). А: распределение I_{M3} в одной половине рентгенограммы, Б: осреднённые по 4-м квадрантам распределения М6. В расслабленном состоянии и в ригоре на профиле слоевой линии М3 видны «кристаллические» рефлексы, соответствующие радиальному положению экваториальных рефлексов 1,0 и 1,1. Те же данные, что и для рис. 12 Б. Внемеридиональные пики на слоевой линии М6 в ригоре соответствуют частичному вкладу в интегральный профиль слоевой линии А5, положение которой очень близко, но не совпадает с осевым положением М6.

оценка увеличивается до 30 %, т.е. оказывается близкой к относительному приросту развиваемой силы [119]. Похожие значения для температурозависимого увеличения I_{M3} были получены в сокращающихся демембранных волокнах лягушки, в которых актин-миозиновая решётка была стабилизирована частичной сшивкой этил-диметил-карбодиимидом, EDC [120]. Более выраженный, ~60 %, рост I_{M3} был получен в экспериментах со скачком температуры с 5 °С до 30 °С на мышечных волокнах кролика [78]. Температурная зависимость напряжения, развиваемого волокном, для мышц кролика (теплокровного) более крутая, чем для мышц лягушки (холоднокровного животного). В то же время доля присоединённых к актину миозиновых головок, оцененная по измерению мгновенной жёсткости, не зависит от температуры мышц животных обоих видов [121, 122]. Обобщая, можно сказать, что рост интенсивности М3 коррелирует с ростом средней силы, развиваемой мостиком.

Ширина меридиональных рефлексов в ригоре сильно зависит от процедуры достижения этого состояния. Если при ригоризации удастся избежать развития больших напряжений и, следовательно, осевой разупорядоченности нитей, профили М3 в ригоре могут иметь

ту же ширину, что и в расслабленной мышце и на нём так же выражены рефлексы, образуемые плоскостями (1,0) и (1,1) (рис. 13 А).

Изменения интенсивности МЗ в сокращающейся мышце в ответ на внешние механические воздействия интерпретируют как результат поворота всей миозиновой головки вокруг места связывания на актине [48, 49], либо только домена лёгких цепей S1 относительно каталитического домена головки [3, 123, 124]. Такая интерпретация корректна, только если отсоединение и присоединение головок происходят медленнее, чем исследуемые изменения МЗ. В противном случае, изменение числа присоединённых головок и/или дисперсии их распределения приведёт к значительным изменениям $I_{\text{МЗ}}$ [125]. Таким образом, на интенсивность МЗ и, вероятно, других миозиновых рефлексов влияют следующие факторы: число миозиновых головок, присоединённых к актину, их форма, стандартное отклонение распределения от 14,5 нм осевого периода и осевая разупорядоченность соседних миозиновых нитей.

Интересный эффект расщепления меридиональных рефлексов на два и более пиков был замечен ещё в ранних экспериментах на целой мышце лягушки с использованием лабораторных источников рентгеновского излучения [106]. Вскоре было предположено, что такое расщепление меридиональных рефлексов может быть вызвано интерференцией рентгеновских лучей, рассеянных двумя симметричными половинами саркомера [126, 127]. Позже Малинчик и Леднев получили дифракционные рентгенограммы покоящейся мышцы лягушки с высоким пространственным разрешением и предложили модель толстой нити, которая воспроизводила основные черты полученных рентгенограмм, в том числе интерференционное расщепление миозиновых меридиональных рефлексов [128–130]. В экспериментах с целой мышцей на источнике синхротронного излучения на этот эффект обратили внимание J. Bordas и коллеги [108]. Они предположили, как выяснилось позже, ошибочно, что этот рефлекс вызван двумя семействами миозиновых головок, имеющими близкую, но различную периодичность.

СЛОЕВЫЕ ЛИНИИ

Миозиновые слоевые линии

Миозиновые слоевые линии расположены параллельно экватору на расстояниях, кратных главному периоду миозиновой спирали, $1/43 \text{ нм}^{-1}$. В мышце лягушки в покое интенсивность всех миозиновых слоевых линий очень высока [106]. В этом состоянии головки миозиновых молекул упакованы вблизи ствола толстой нити [106,

130, 131]. В мышцах теплокровных животных интенсивности миозиновых слоевых линий при низкой температуре (около 5 °С) существенно ниже из-за беспорядка миозиновых головок, но возрастают до значений, характерных для холоднокровных животных, при увеличении температуры до 20 °С и выше [89, 132–134]. Такой переход от беспорядка к порядку при увеличении температуры связан с гидролизом АТФ [89, 134] или, более точно, с переходом миозиновых головок, связывающих АТФ или АДФ и P_i , из «открытого» состояния в «закрытое» [135]. Оказалось, что головка в «закрытом» состоянии находится преимущественно на стволе толстой нити и там контактирует с парной головкой в молекуле, формируя упорядоченную структуру [136], тогда как головки, находящиеся в открытом состоянии, уходят от ствола толстой нити и не упорядочены. Увеличение температуры или использование аналогов АТФ сдвигает равновесие между двумя состояниями [135, 137]. Обработка волокон N-этилмалеимидом, фиксирующим S1 в «открытом» состоянии, приводит к уменьшению интенсивностей миозиновых слоевых линий [138]. В ригоре внемеридиональные интенсивности миозиновых меридиональных рефлексов ниже, чем в расслабленной мышце, хотя некоторые из них, включая M2, M3 и M6, остаются заметными (рис. 12; [106, 108]).

Во время изометрического сокращения интенсивности «запрещённых» миозиновых меридиональных рефлексов M1, M2 и внемеридиональных миозиновых слоевых линий сильно снижаются по сравнению с расслабленным состоянием (рис. 12; [118, 108]). В изометрическом тетанусе мышцы лягушки при низкой температуре внемеридиональная интенсивность M1 составляет около 15 % от её значения в расслабленном состоянии [108]. Ещё более низкие относительные значения I_{M1} были найдены при изометрическом сокращении одиночных интактных волокон лягушки [109]. Если сокращающейся мышце позволить укорачиваться под малой нагрузкой, то I_{M1} будет примерно в три раза выше, чем в изометрическом сокращении, хотя будет составлять лишь примерно половину от её значения в расслабленном состоянии [99]. Поскольку доля присоединённых миозиновых головок падает, когда сокращающаяся мышца укорачивается с большой скоростью [139, 140], эти данные свидетельствуют о том, что внемеридиональные часть M1, а возможно, и внемеридиональные части других миозиновых слоевых линий в сокращающейся мышце возникают, главным образом, при дифракции рентгеновских лучей на отсоединённых миозиновых головках.

С другой стороны, есть данные, свидетельствующие о существенном вкладе в миозиновые слоевые линии слабосвязанных миозиновых головок, содержащих в своём активном центре либо АТФ [141], либо АДФ×Р_i [142]. Чтобы оценить вклад в интенсивность различных рентгеновских рефлексов слабосвязанных и отсоединённых головок, демембранизованным мышечным волокнам создавали условия, которые меняют соотношение числа сильно- и слабосвязанных, или присоединённых и отсоединённых, головок, регистрируя при этом изменения на дифракционных рентгенограммах [141, 142].

Актиновые слоевые линии

Актиновые слоевые линии соответствуют спирали с периодом $\sim 1/36 \text{ нм}^{-1}$ (рис. 9). Наиболее простая модель, описывающая основные актиновые рефлексы: меридиональный рефлекс при $(2,73 \text{ нм})^{-1}$, яркие слоевые линии, с осевым положением $\sim (5,9 \text{ нм})^{-1}$ и $\sim (5,1 \text{ нм})^{-1}$, которые остаются яркими даже в расслабленном состоянии мышцы, и первой слоевой линии в $(\sim 36 \text{ нм})^{-1}$, – это целочисленная спираль 13/6. Эта модель является приблизительной, т.к. актиновая нить очень подвижна, и в действительности не является ни целочисленной спиралью, ни даже периодической структурой [143]. Это подтверждается экспериментальными наблюдениями, показывающими, что ширина актиновых слоевых линий много больше, чем миозиновых (рис. 10). Для разных состояний тонких нитей или ориентированных гелей F-актина используют и другие, близкие, но более сложные модели, такие как 67/31, 132/61 или 69/32 [144]. В этой главе мы будем придерживаться наиболее простой номенклатуры, в которой А1 соответствует первой актиновой слоевой линии при $(\sim 36 \text{ нм}^{-1})$, А6 и А7 – слоевым линиям с осевыми положениями $\sim (5,9 \text{ нм})^{-1}$ и $\sim (5,1 \text{ нм})^{-1}$, соответственно.

Известно, что структура F-актина зависит от многих факторов. Изменения интенсивностей А1, А2 и А6 актиновых слоевых линий [53, 145], а также их положений, свидетельствующих об изменении осевого шага и угла между соседними мономерами актина в спирали [98, 99] были зарегистрированы сразу после начала электрической стимуляции интактной мышцы, т.е. в условиях, когда миозиновые головки еще не успевают присоединиться к актину, а также при укорочении мышцы с максимальной скоростью, вызывающей отсоединение большинства головок от актина. Сильное связывание миозиновых головок с актином также растягивает и закручивает актиновую спираль даже в отсутствие внешней растягивающей силы [101].

На рентгенограммах расслабленной мышцы актиновые слоевые линии, за исключением А6 и А7, слабые. Это объясняется тем, что миозиновые головки находятся вблизи толстых нитей и не дают вклад в эффективную электронную плотность тонких нитей.

Все актиновые слоевые линии становятся очень яркими в ригоре, поскольку в этом состоянии все миозиновые головки сильно и стереоспецифически связывают актин, тем самым контрастируя актиновую спираль (рис. 10; [106]). Ригорные значения интенсивностей слоевых линий часто используют для шкалирования интенсивностей в других физиологических или биохимических состояниях. Можно получить ещё большую интенсивность актиновых слоевых линий, если добавить в раствор, омывающий демембранизованные волокна, изолированные миозиновые головки. Для этого волокна вытягивают до длин саркомеров 3–4 мкм и инкубируют в растворе, содержащем S1 [146, 147].

В то время как S1 без нуклеотида или комплекс S1.АДФ сильно связывается с актином, комплекс S1 с АТФ или АДФ и P_i имеет более слабое сродство к актину [38]. Состояние слабого связывания S1 с актином остаётся ещё малоизученным. Было показано, что при уменьшении ионной силы расслабляющего раствора, в котором находились демембранизованные волокна, обработанные N-фенилмалеимидом, интенсивность первой слоевой линии, I_{A1} , падает [141]. Такая обработка прекращает гидролиз АТФ и оставляет миозиновые головки в состояниях, для которых возможно только слабое связывание с актином. Кроме того, известно, что низкая ионная сила способствует слабому связыванию миозиновых головок с актином [148]. При этом не было обнаружено изменений I_{A6} , что позволяет предположить, что слабое связывание является нестереоспецифическим [141, 149, 150]. Такое присоединение возможно в широком диапазоне осевых и азимутальных углов между актиновым мономером и миозиновой головкой. Поскольку слабое связывание чувствительно к ионной силе [148], его природа, скорее всего, электростатическая.

В ранних синхротронных экспериментах, когда детекторы были только одномерные, заметных изменений в I_{A1} при развитии сокращения не было обнаружено [48]. Модель для объяснения этого эффекта была основана на предположении, что во время сокращения существенная часть миозиновых головок слабо связана с актином [151]. С появлением двумерных детекторов удалось зарегистрировать увеличение I_{A1} во время изометрического сокращения по сравнению с состоянием покоя [152]. Благодаря хорошей фокусировке рентгеновского луча (станции 2.1 и 16.1 SRS, Великобритания) и использованию длинной камеры, были получены рентгенограммы с

хорошим пространственным разрешением. На них удалось достоверно различить близко расположенные пики M1 и A1 первой слоевой линии в сокращающейся мышце и измерить их интенсивности в различных состояниях [108].

В мышце лягушки, сокращающейся при низкой температуре, I_{A1} составляет 10–15 % её значения в ригоре [120]. При повышении температуры сокращающейся мышцы I_{A1} возрастала примерно пропорционально увеличению силы, хотя число миозиновых головок, присоединённых к актину, оставалось неизменным, судя по измерениям динамической жёсткости волокон и интенсивности экваториального рефлекса 1,1 (120–122). В ходе изометрического сокращения при высокой температуре I_{A1} в мышцах лягушки составляла около трети её значения в ригоре [120]. При укорочении под малой нагрузкой, т.е. со скоростью близкой к максимальной, I_{A1} снижалась примерно вдвое [99] параллельно со снижением числа миозиновых головок, присоединённых к актину [153]. На рентгенограмме сокращающейся мышцы также видны и другие актиновые слоевые линии A2, A4, A5, хотя их интенсивность намного меньше, чем в ригоре [108].

Актин-миозиновые слоевые линии

На дифракционной рентгенограмме мышцы в состоянии ригора имеются две довольно яркие слоевые линии, периоды которых, ~23–24 нм и ~10,2–10,4 нм, не совпадают ни с миозиновым, ни с актиновым [106]. Было обнаружено, что эти слоевые отсутствуют на рентгенограмме расслабленной мышцы, но появляются при сокращении, когда мышца развивает силу ([108], рис. 10). Yagi объяснил наличие этих слоевых линий модуляцией функции размещения миозиновых головок на актиновых нитях с периодом толстой нити 14,5 нм и дал этому теоретическое обоснование [154]. Такая модуляция и приводит к появлению слоевых линий в $1/14,5 - 1/36 = \sim 1/24 \text{ нм}^{-1}$ для слоевой линии, обозначаемой AM_{-1} , и $1/14,5 + 1/36 = \sim 1/10,4 \text{ нм}^{-1}$ для AM_{+1} , где 36 нм – условный период актиновой нити. Ни отсоединённые головки, ни тонкие нити не дают вклад в эти слоевые линии. Точное решение задачи о дифракции на частично заполненной целочисленной рациональной спирали дано в [155].

V. МОДЕЛИ РЕНТГЕНОВСКОЙ ДИФРАКЦИИ НА МЫШЦЕ

Интерпретация рентгенодифракционных картин мышцы невозможна без математических моделей. Первые данные о спиральной структуре толстых и тонких нитей были получены из дифракционных рентгенограмм с помощью известного решения задачи о дифракции на спирали, с помощью которого была расшифрована структура ДНК [156].

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКВАТОРИАЛЬНЫХ РЕФЛЕКСОВ

Наиболее яркие экваториальные рефлексы вызваны дифракцией на семействах плоскостей (1,0) и (1,1) (рис. 9). Изменение интенсивностей этих рефлексов связывали с изменением доли присоединённых к актину миозиновых головок, не проводя при этом численного анализа [83, 157]. Если миозиновые головки находятся вблизи ствол толстых нитей, то рассеивающая масса сосредоточена в плоскостях (1,0), проходящих только по толстым нитям, а в плоскостях (1,1), проходящих по тонким и толстым нитям в соотношении 2:1, вклад массы головок существенно меньше, поэтому $I_{1,0} > I_{1,1}$. Такая ситуация наблюдается в расслабленной мышце. Наоборот, если все головки миозиновых молекул присоединены к тонким актиновым нитям, то $I_{1,1}$ возрастает, а $I_{1,0}$ падает. Такая картина наблюдается в ригоре. В сокращающейся мышце лишь часть миозиновых головок присоединена к актину и развивает активное усилие и поэтому отношение $I_{1,1}/I_{1,0}$ занимает промежуточное положение между рассмотренными крайними случаями.

Актиновые нити удерживаются в узлах гексагональной решётки только благодаря взаимодействию с ближайшими толстыми нитями. В расслабленной мышце миозиновые головки не присоединяются к актину, а лишь толкают его с трёх сторон, в активном сокращении и в ригоре головки связывают актин и поэтому лучше удерживают порядок актиновой решётки [92]. Таким образом, в зоне перекрытия беспорядок тонких нитей относится к 1-му роду, который подразумевает случайные отклонения от идеальных положений в решётке. Для этого типа беспорядка экваториальная интенсивность будет умножаться на тепловой фактор $T_R = \exp(-4\pi^2\Delta_{AR}^2R^2)$, где Δ_{AR} и R – среднеквадратическое отклонение актиновой нити от идеального положения (рис. 14) и радиальная координата рефлекса в обратном пространстве, соответственно [158]. Распределение интенсивности внутри рефлекса в этом случае не зависит от Δ_{AR} и вся интенсивность рефлекса умножается на T_R . Модельные вычисления показали, что количественно воспроизвести отношение $I_{1,1}/I_{1,0}$ можно, если предположить существенный беспорядок тонких нитей (Δ_{AR} до 3 нм),

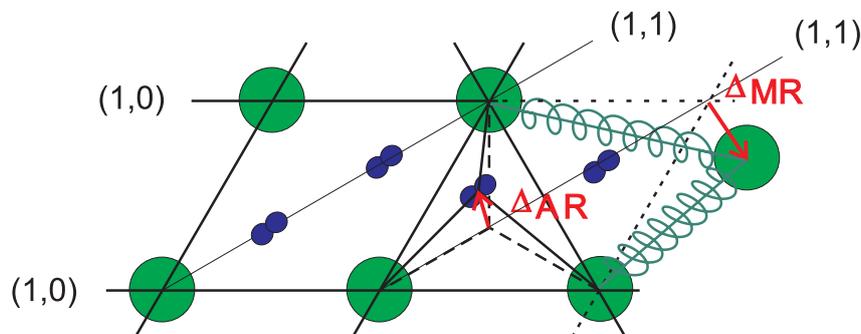


Рис. 14. Нарушения регулярности актин-миозиновой решётки.

особенно для мышц холоднокровных животных, лягушки или рыбы, в которых $I_{1,1}$ особенно мал (рис. 11). Этот вывод хорошо согласуется с электронными микрофотографиями тонких срезов расслабленных волокон кролика при высокой температуре, на которых виден значительный некоррелированный беспорядок тонких нитей [91], а отношение $I_{1,1}/I_{1,0}$ почти такое же, как в мышцах лягушки.

Толстые нити удерживаются в узлах решётки белками М-линии и, возможно, другими белками саркомера, которые препятствуют их смещению в осевом и радиальном направлениях. Такая структура может обладать беспорядком 2-го рода, который характеризуется отсутствием дальнего порядка, а расстояние до ближайшего соседа подчинено некоторому фиксированному распределению с определённым среднеквадратическим отклонением от среднего значения. Для такого «жидкого» беспорядка характерно увеличение ширины рефлексов вместе с ростом его индекса [158]. Действительно, на рентгенограмме мышцы рефлекс 1,1 немного шире, чем 1,0, а ширина рефлексов более высоких порядков ещё больше (рис. 11). Это наблюдение подтверждает, что в актин-миозиновой решётке присутствует беспорядок и 1-го, и 2-го рода, параметры которых очень трудно определить из экспериментальных данных. Было предпринято несколько попыток восстановить проекцию электронной плотности на экваториальную плоскость, используя Фурье-синтез (например, [88, 159, 160]), но оказалось, что результат моделирования сильно зависит от плохо определяемых параметров, а именно, фаз экваториальных рефлексов. Таким образом, использование экваториальных рефлексов для количественных оценок актин-миозинового взаимодействия оказалось не очень удобным.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИФРАКЦИОННОЙ ДИАГРАММЫ
РАССЛАБЛЕННОЙ МЫШЦЫ

Первая пространственная модель мышцы, учитывающая все известные на тот момент данные о геометрии толстых нитей, была предложена Малинчиком и Ледневым для интерпретации рентгенодифракционной картины расслабленной мышцы [129, 130]. Они параметризовали отклонения миозиновых головок от своих правильных, соответствующих осевому периоду спирали, положений на стволе толстой нити, вызванные С-белком и оптимизировали выбор параметров, сравнивая результаты расчётов на одномерной модели с экспериментальным профилем меридиональной интенсивности. Это позволило им объяснить появление запрещённых меридиональных рефлексов на рентгенограмме расслабленной скелетной мышцы. Более того, они предложили модель толстой нити, аппроксимируя миозиновые головки линейкой близко расположенных сфер. Разупорядоченность упаковки миозиновых нитей в гексагональные ячейки описывали как беспорядок 2-го рода. По этой модели были рассчитаны интенсивности миозиновых слоевых линий и сопоставлены с экспериментально наблюдаемыми. Из этого сопоставления можно было приблизительно оценить расположение миозиновых головок у ствола толстой нити.

Более детальному моделированию рентгенограммы расслабленной мышцы была посвящена целая серия работ группы J. Squire (см., например, [160–162]). Для реконструкции миозиновых головок на стволе толстой нити в расслабленном состоянии авторы использовали рентгенограммы плавниковой мышцы камбалы, т.к. в ней, как и в многих других мышцах рыб, гексагональная упаковка толстых и тонких нитей описывается простой элементарной ячейкой, следовательно, её строение ближе к кристаллическому. Идея состояла в том, чтобы, используя рентгенограммы мышцы в различных состояниях, создать «кино», воспроизводящее движение миозиновых головок в активной мышце, а также их положения в покое и в состоянии ригора. «Кадром 0» стало состояние расслабленной мышцы. Используя данные о расположении миозиновой решётки в саркомере, постоянно улучшающиеся данные электронной микроскопии, а затем и белковой кристаллографии о структуре миозиновой головки, они конструировали различные модели строения А-зоны в состоянии расслабления, используя большой набор параметров, задающий положение миозиновых головок в пространстве, и сравнивали полученные результаты с данными рентгеновской дифракции [131, 161, 162]. Последняя из опубликованных моделей содержит 24 независимых

параметра, и наилучший набор параметров обеспечивает квадратичный R -фактор 1,19 % по 56 рефлексам [162].

Параллельно работы по моделированию дифракции покоящейся мышцы продолжала исследовательская группа д-ра Leero Yu в Национальном Институте здоровья США, в составе которой в течение нескольких лет работал ученик В.В. Леднева, С.Б. Малинчик. На основе текущих представлений о структуре миозиновой головки они моделировали структуру толстой нити, учитывая тепловой беспорядок миозиновых головок 1-го рода. Сравнивая результаты моделирования с экспериментальными данными, они показали, что с повышением температуры покоящейся мышцы миозиновые головки располагаются у ствола толстой нити и контрастируют миозиновую спираль [133]. Этот же подход был использован в последующих работах этой группы для изучения положения миозиновых головок в покоящейся мышце в различных состояниях [142, 150, 163].

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕНТГЕНОГРАММ СОСТОЯНИЙ АКТИВНОГО СОКРАЩЕНИЯ И РИГОРА

Переход от «кадра 0» к моделированию таких состояний, в которых миозиновые головки были бы присоединены к актину, а именно, активного сокращения и ригора, усложняется, во-первых, необходимостью рассматривать полную трёхмерную актин-миозиновую решётку, а, во-вторых, наличием неизвестной функции размещения миозиновых головок на тонкой нити. Поэтому, для упрощения задачи моделирования, обычно пренебрегали либо особенностями распределения присоединённых миозиновых головок на актине, либо формой присоединённых головок.

В первом типе моделей рассматривают только одну эффективную миозиновую головку, полагая, что её электронная плотность есть средняя плотность всех поперечных мостиков, и что в зоне перекрытия толстых и тонких нитей миозиновые головки присоединены к актину с одним и тем же периодом, равным периоду рефлекса МЗ. Такую модель использовали для описания изменений меридиональных рефлексов МЗ, М6 и более высоких порядков. Первая из этих моделей давала лишь качественное описание экспериментальных данных [49].

С появлением атомной структуры S1 и моделей актин-миозинового связывания стало возможным проведение количественных расчётов изменений интенсивности меридиональных рефлексов [2]. Изменения конфигурации миозиновых головок были рассчитаны по известной кристаллографической атомной модели актин-миозинового комплекса ([164], номер в базе данных белковых структур, PDB – 2mys). Конформационные изменения в миозиновой головке, соответствующие

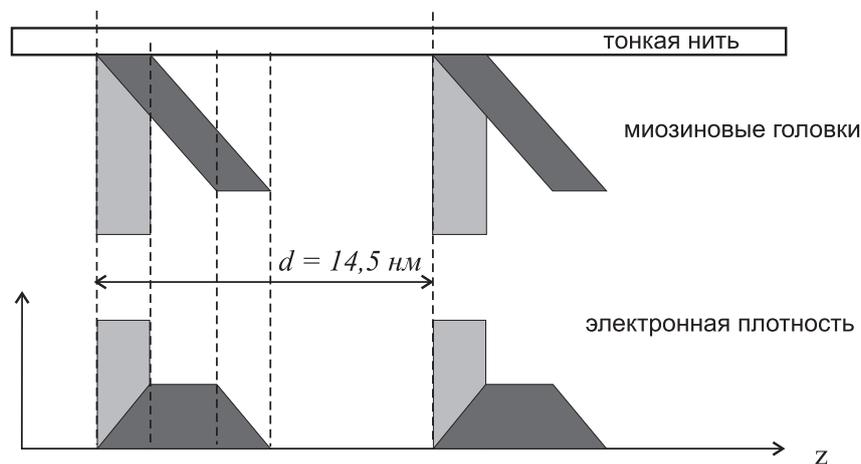


Рис. 15. Простая модель рабочего шага миозиновой головки, объясняющая изменения рентгеновского рефлекса МЗ в ответ на ступенчатое укорочение волокна. Вверху – поперечные мостики, аппроксимированные четырёхугольниками, внизу – проекция электронной плотности головок на ось волокна (по [49]).

«повороту рычага» (рис. 5, 16) моделировали поворотом домена лёгких цепей, LCD, вокруг конвертера в плоскости, задаваемой осью актина и прямой, проходящей через аминокислотные остатки Cys707 (шарнир между каталитическим доменом и «рычагом») и Lys843 (точка соединения субфрагментов S1 и S2 миозина). Центр вращения шейки совпадал с координатами Ca атома аминокислотного остатка Cys707 [60, 62]. Каталитический домен присоединённых головок при «повороте рычага» считали неподвижным. Упругий изгиб «шейки» S1 под действием внешних сил рассчитывали по формулам изгиба защемлённой балки [2].

Каталитический домен (аминокислотные остатки 1–770) присоединённой миозиновой головки оставался неизменным, а шейка изгибалась как балка с однородной изгибной жёсткостью, защемлённая в точке, соответствующей аминокислотному остатку Gly770 под действием момента внешней силы, приложенной к дальнему концу балки, или аминокислотному остатку Trp829. Ось балки совпадала с прямой, проходящей через Gly770 и Trp829. В расчётах полагали, что смещение каждой сферы перпендикулярно оси балки и лежит в плоскости, проходящей через ось балки и вектор приложенной силы. Величину смещения рассчитывали по формуле $d_{829} = (3L - x)x^2 / 2L^3$ [165], где $L = 8,47$ нм – длина отрезка [Gly770, Trp829] или длина балки, x – расстояние от Gly770 до проекции сферы на ось балки, а d_{829} – смещение Trp829. Эта модель была использована нами для расчёта

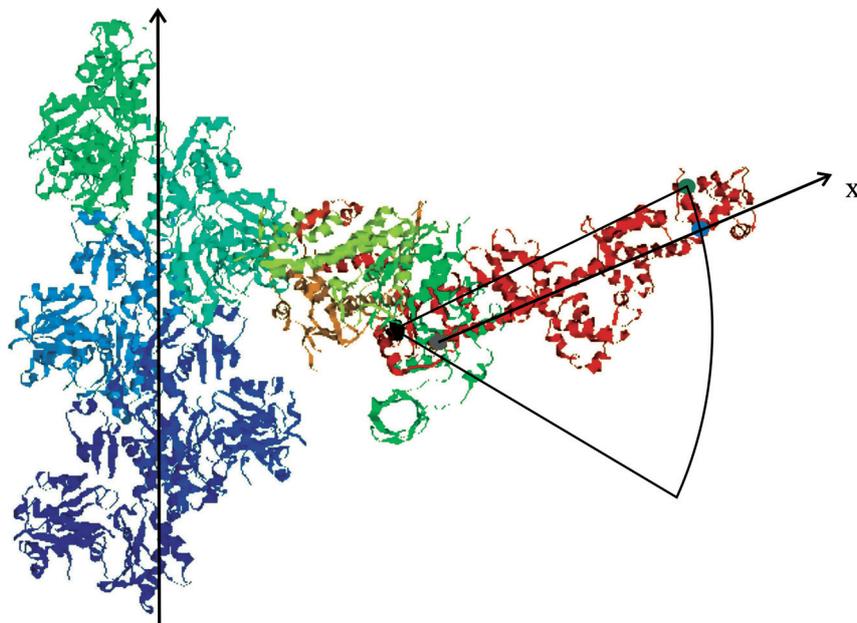


Рис. 16. Модель сильного связывания миозиновой головки с актином (по [56]; актин – 1atn.pdb, S1 – 2mys.pdb).

Пять мономеров актина показаны слева оттенками синего и зелёного цветов, обозначена ось тонкой нити, стрелка показывает направление к М-линии. Важные для моделирования изменений формы головки аминокислотные остатки показаны цветными кружками: Cys707 – чёрным, Gly770 – серым, Trp829 – голубым, Lys843 – зелёным. Ось x совпадает с осью «рычага» [Gly770, Trp829] (см. текст).

изменений интенсивности I_{M3} при синусоидальных изменениях длины волокна в активном сокращении и в ригоре [2].

Недавно нами была предложена структурно-кинетическая модель работы поперечного мостика (рис. 17) [78]. В её основе лежали следующие экспериментальные результаты: рост I_{A1} и рост напряжения в ответ на скачок температуры происходят одновременно [77, 78]; жёсткость волокна в активном сокращении не зависит от температуры [121, 122] и после скачка температуры нет изменений интенсивности рефлекса 1,1 [77], что указывает на то, что рост напряжения с температурой происходит при постоянстве числа миозиновых мостиков, присоединённых к тонким нитям. Мы полагаем, что рост интенсивности актиновых слоевых линий после скачка температуры вызывается изменением конфигурации взаимодействия мостиков с актином, а именно, их переходом из нестереоспецифического

присоединения в стереоспецифическое связывание. Синхронный рост напряжения и контрастирования актиновой спирали головками миозина показывает, что стереоспецифическое «застёгивание» головок на актине является необходимой фазой силогенерации мостика. Падение $I_{1,0}$ при относительном постоянстве $I_{1,1}$ также свидетельствует в пользу перехода нестереоспецифически присоединённых головок в стереоспецифически связанное состояние, поскольку когда каталитический домен нестереоспецифически присоединённой головки встраивается в спираль актина, то хвостовой домен головки миозина отходит от ствола толстой нити, снижая тем самым $I_{1,0}$, хотя общая масса, связанная с тонкой нитью, а следовательно и $I_{1,1}$, не меняется [120].

Модель предполагает, что миозиновая головка до гидролиза АТФ может присоединиться к актину только нестереоспецифически, т.е. под различными осевыми и азимутальными углами, а её прочное связывание с актином возможно лишь после расщепления АТФ на АДФ и фосфат. В первых трёх биохимически различных состояниях миозиновая головка присоединена к актину нестереоспецифически и не развивает силу. После гидролиза головка быстро и обратимо «застёгивается» в стереоспецифически связанное состояние и только потом происходит поворот рычага. И застёгивание, и поворот рычага, являются силогенерирующими переходами. Эта модель, основанная на современных биохимических представлениях о кинетике гидролиза АТФ миозином, количественно объясняет наши экспериментальные данные, а именно изменения интенсивности рентгеновского рефлекса МЗ и первой актиновой слоевой линии А1 в ответ на скачок температуры [78], и включает в себя «модель рычага», используемую многими авторами для объяснения изменений интенсивности МЗ в экспериментах с изменениями длины активно сокращающихся волокон.

Томограммы электронно-микроскопических срезов изометрически сокращающихся летательных мышц насекомых, полученных быстрым замораживанием [166, 167], показали существенные отличия в конфигурации моторного домена по сравнению с реконструкциями акто-S1 комплекса. На этих томограммах были обнаружены не только миозиновые головки, моторные домены которых связаны с актином примерно так же, как и в ригорном комплексе *in vitro*, а их «шейные» домены повернуты на различные углы, но и головки, у которых каталитические домены присоединены к актину под различными осевыми и азимутальными углами. Эти данные хорошо согласуются с нашей моделью и дополнительно свидетельствуют о том, что механизм развития силы актин-миозиновым мотором сложнее, чем просто поворот длинной «шейки».

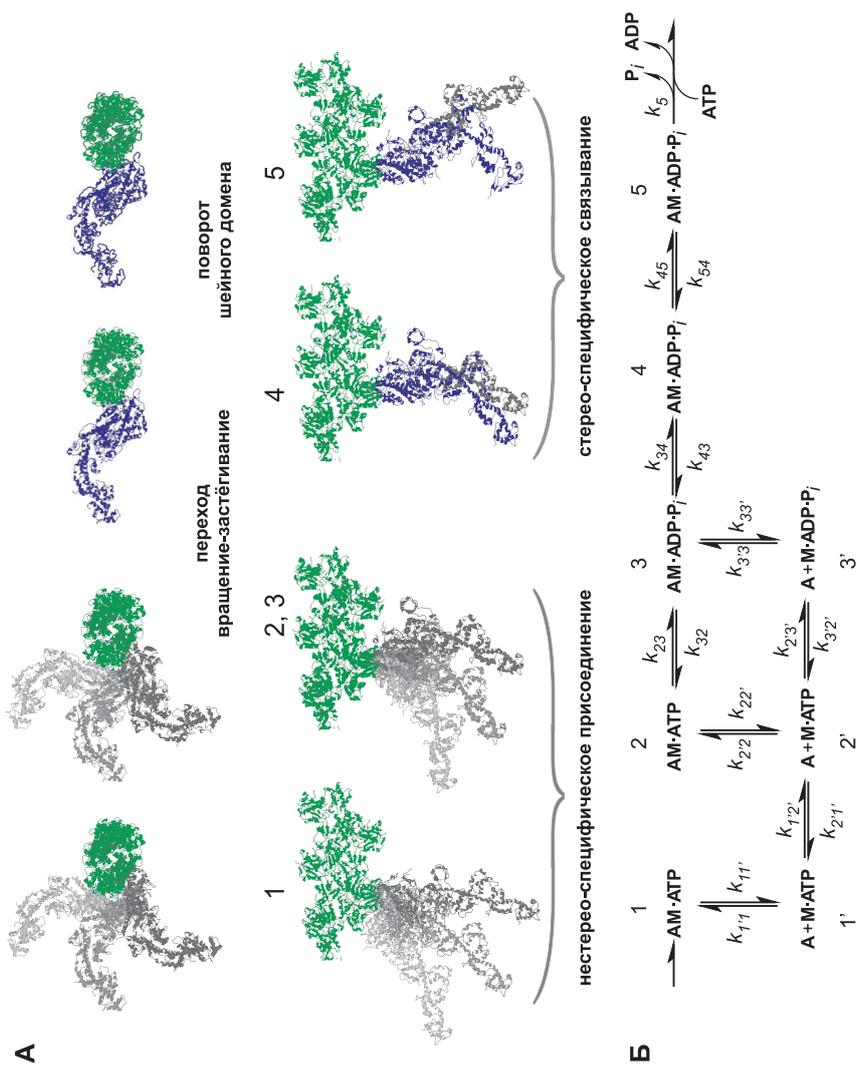


Рис. 17. Подпись к рис. дана на сл. стр.

Рис. 17. Структурная и кинетическая схема механизма генерации силы головками молекулы миозина [78].

А. Различные состояния (1–5) головки миозина (показаны серым и синим цветом), присоединённой к нити актина (зелёный цвет) показаны в двух проекциях: в верхнем ряду ось актиновой нити перпендикулярна, в нижнем – параллельна плоскости рисунка. В нижнем ряду *Z*-линия саркомера находится справа. *Б.* Кинетическая схема биохимического цикла мостика, используемая в модели. Пре- и пост-гидролизные состояния 2 и 3 структурно идентичны, но отличаются биохимически. В состояниях 1, 2 и 3 головки в осевом направлении жёсткие, но могут присоединяться к актину под разными углами в осевом и азимутальном направлении. Полный диапазон азимутальных и осевых углов $\pm 60^\circ$ и $\pm 30^\circ$, соответственно; на рисунке показаны центральное и крайние положения головок. Распределение по азимутальным и осевым углам случайное, равномерное во всём телесном секторе. Сила или перемещение создаются как переходом «вращение-застёгивание» (шаг 3 \rightarrow 4) со средним осевым вращением субфрагмента 1 как твёрдого тела на 26° , так и при повороте шейного домена (шаг 4 \rightarrow 5), со средним осевым вращением на 50° по отношению к моторному домену. Ненапряжённые формы головок в силогенерирующих состояниях 4 и 5 показаны серым цветом (правое положение в паре, нижний ряд на *А*), напряжённые – синим цветом (левое положение). А, М, АТФ, АДФ и P_i на кинетической схеме (*Б*) обозначают актин, субфрагмент 1 миозина, аденозин-трифосфат, аденозин-дифосфат и неорганический фосфат, соответственно. Головки могут обратимо отсоединяться из состояний 1, 2 и 3 в состояния 1', 2' и 3', соответственно.

Вместо того, чтобы усложнять задачу перебором множества конфигураций присоединённой миозиновой головки, можно подобрать функцию расстановки головок на тонкой нити и, возможно, их ориентацию в пространстве, используя прямое моделирование интенсивностей слоевых линий и известные данные о структуре актин-миозиновой решётки. Первая работа в этой области была посвящена интерпретации рентгенограммы летательной мышцы насекомых в ригоре [168]. Авторы рассмотрели единичную ячейку актин-миозиновой решётки в летательной мышце, исходя из особенностей дифракционной картины, выбрали пространственную группу симметрии, и проверили различные предположения относительно формы и конфигурации присоединённой головки и функции размещения их на актине, основываясь на предварительных данных электронной микроскопии. Было получено удовлетворительное соответствие расчётных и экспериментальных данных, на основании чего был сделан вывод о том, что поперечный мостик в ригоре наклонён под углом примерно 45° к оси актина, головки взаимодействуют примерно с третью актиновых мономеров и, самое главное, в этой работе был впервые предложен метод интерпретации всей двумерной рентгенодифракционной картины актин-миозиновой решётки, а не анализ отдельных рефлексов.

Несколько моделей расстановки миозиновых головок в единичной ячейке без учёта их формы было рассмотрено в работе [169]. Было показано, что для наличия на рентгенограмме семейства ярких актиновых слоевых линий, характерных для состояния ригора, миозиновые головки должны связывать актин с периодичностью его спирали. Если же позволить миозиновым головкам присоединяться к ближайшему по осевой координате мономеру актина, допуская большие азимутальные углы поворота головок, то для такой расстановки более яркими на рентгенограмме будут миозиновые слоевые линии, т.е. такое правило выбора мономера актина может быть, например, при слабом связывании.

Модели такого рода можно усовершенствовать, используя доступные атомные структуры мономера актина, миозиновой головки, а также модели сильного актин-миозинового связывания [164, 170], для построения прямых моделей актин-миозиновой решётки в состояниях ригора и активного сокращения. Основная трудность построения модели трёхмерной актин-миозиновой решетки в зоне перекрытия толстых и тонких нитей в саркомере состоит в том, что для каждой из сотен миозиновых головок, выступающих из одной из шести миозиновых нитей в элементарной ячейке, нужно найти тот из сотен актиновых мономеров, расположенных на одной из шести актиновых нитей, с которым он связывается во время активного сокращения или в состоянии ригора. Один из подходов к решению этой задачи даёт «принцип минимума упругой энергии», согласно которому миозиновая головка присоединяется к тому актиновому мономеру на одной из соседних тонких нитей, для которого энергия упругой деформации миозиновой головки, затрачиваемая при таком связывании, минимальна [171]. В результате применения этого принципа размещение миозиновых головок на актиновой нити определяется всего двумя параметрами: отношением продольной и трансверсальной жесткостей актин-миозинового комплекса и долей миозиновых головок, присоединенных к актину в данном состоянии. Расчёты полной двумерной рентгенодифракционной картины, проведенные с использованием такой модели, показали хорошее совпадение с экспериментальными данными [125, 171]. С помощью этой модели также удалось выявить на экспериментальной рентгенограмме те рентгеновские рефлексы, по изменению интенсивности которых можно определить некоторые характеристики актин-миозинового взаимодействия в мышце: число миозиновых головок, стереоспецифически присоединенных к актину, их конформацию (поворот «рычага»), осевые перемещения центра масс головок и др.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря достижениям рентгеновской кристаллографии в последние два десятилетия удалось выяснить важные детали атомного строения основных элементов актин-миозинового мотора мышц: мономерного и фибриллярного актина и миозиновой головки в различных структурных и биохимических состояниях. Данные о структуре актин-миозинового комплекса, полученные с помощью современной электронной микроскопии, обладают меньшим разрешением и позволяют охарактеризовать лишь одну стадию взаимодействия миозина с актином и АТФ – прочный комплекс, возникающий после сброса продуктов реакции гидролиза АТФ из активного центра головки. Сведения о характере структурной перестройки актин-миозинового комплекса, лежащей основе мышечного сокращения, до сих пор фрагментарны и неполны. Одним из традиционных методов изучения ультраструктуры поперечно-полосатых мышц является малоугловая рентгеновская дифракция. Благодаря развитию современных синхротронных источников рентгеновского излучения и быстродействующих детекторов этот метод по-прежнему актуален, так как он позволяет получить структурную информацию о движении миозиновых головок в сокращающейся мышце с временным разрешением до 20 мкс и пространственным разрешением некоторых дифракционных рефлексов до 0,2 нм. Хотя рентгенодифракционные эксперименты служат источником богатой информации, содержательный анализ данных этих экспериментов в терминах молекулярных движений требует развития математических моделей и их параметрического анализа. Можно надеяться, что эти данные в совокупности с новыми результатами, полученными методами современной биохимии в сочетании с точечными мутациями основных сократительных белков, помогут восстановить картину биохимических и структурных изменений, лежащих в основе механо-химического преобразования энергии актин-миозиновым мотором мышц.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Huxley, H.* (1951) *Disc. Faraday Soc.*, **11**, 148.
2. *Dobbie, I., Linari, M., Piazzesi, G., Reconditi, M., Koubassova, N., Ferrenczi, M.A., Lombardi, V., Irving, M.* (1998) *Nature*, **396**, 383–387.
3. *Piazzesi, G., Reconditi, M., Linari, M., Lucii, L., Sun, Y.B., Narayanan, T., Boesecke, P., Lombardi, V., Irving, M.* (2002) *Nature*, **415**, 659–662.
4. *Kuehne, W.* (1859) *Archiv fur Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin.*, 748–835.
5. *Schipiloff, C., Danilowsky, A.* (1881) *Vertheilung in Muscelbündel (Hoppe-Seyl. Z.)*, **5**, 349–365.

6. *Huxley, A.F.* Reflections on Muscle. 1980. The Sherrington Lectures XIV. Liverpool, University Press.
7. *Engelhardt, W.A., Lyubimova, M.N.* (1939) *Nature*, **144**, 668–669.
8. *Энгельгардт В.А., Любимова М.Н.* (1939) *Биохимия*, **4**, 716–736.
9. *Straub, F.* (1943) *Actin Studies from the Inst. of Med. Chem. Univ. Szeged* (reprinted by S. Karger, Basel-New York), **2**, 3.
10. *Szent-Györgyi, A.* (1951) *Nature*, **167**, 380–381.
11. *Hanson, J., Huxley, H. E.* (1953) *Nature*, **172**, 530–532.
12. *Huxley, A.F., Niedergerke, R.M.* (1954) *Nature*, **173**, 971–973.
13. *Huxley, H.E., Hanson, J.* (1954) *Nature*, **173**, 973–976.
14. *Филатов В.Л., Катруха А.Г., Буларгина Т.В., Гусев Н.Б.* (1999) *Биохимия*, **64**, 1155–1174.
15. *Гусев Н.Б.* (2000) *Соросовский образовательный журнал* **6**, 24–32.
16. *Vailey, K.* (1948) *Biochem. J.*, **43**, 271–279.
17. *Li, X.E., Holmes, K.C., Lehman, W., Jung, H., Fischer, S.* (2010) *J. Mol. Biol.*, **395**, 327–339.
18. *Frye, J., Klenchin, V. A., Rayment, I.* (2010) *Biochemistry*, **49**, 4908–4920.
19. *Ebashi, S.* (1963) *Nature*, **200**, 1010.
20. *Ebashi, S., Ebashi, F.J.* (1964) *Biochem.*, **55**, 604–613.
21. *Ebashi, S., Kodama, A.* (1965) *J. Biochem.*, **58**, 107–108.
22. *Huxley, H.* (1972) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **37**, 361–376.
23. *Haselgrove, J.* (1972) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **37**, 341–352.
24. *Parry, D.A., Squire, J.M.J.* (1973) *Mol. Biol.*, **75**, 33–55.
25. *Ebashi, S., Kodama, A.J.* (1966) *Biochem.* **59**, 425–426.
26. *Соловьева О.Э., Кацнельсон Л.Б., Коновалов П.В., Мархасин В.С.* Современные проблемы биомеханики. М: МГУ, 2006, **11**, 131–151.
27. *Поглазов Б.Ф., Левицкий Д.И.* Миозин и биологическая подвижность. М.: Наука, 1982. 160 с.
28. *Cope, M., Whisstock, J., Rayment, I., Kendrick-Jones, J.* (1996) *Structure*, **4**, 969–987.
29. *Foth, B.J., Goedecke, M.C., Soldati, D.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 3681–3686.
30. *Margossian, S.S., Lowey, S.J.* (1973) *Mol. Biol.*, **74**, 301–311.
31. *Margossian, S.S., Lowey, S.J.* (1973) *Mol. Biol.*, **74**, 313–330.
32. *Подлубная З.А.* (1987) В сб. «Структура и функции белков сократительных систем». Л., 32–70.
33. *Luther, P.K., Bennett, P.M., Knupp, C., Craig, R., Padrón, R., Harris, S.P., Patel, J., Moss, R.L.* (2008) *J. Mol. Biol.*, **384**, 60–72.
34. *Huxley, H.E.* (1957) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 631–648.
35. *Huxley, H.E.* (1958) *Sci. Am.*, **199**, 67–72.
36. *Reedy, M.K., Holmes, K.C., Tregear, R.T.* (1965) *Nature*, **207**, 1276–1280.
37. *Huxley, H.E.* (1969) *Science*, **164**, 1356–1365.
38. *Lynn, R.W., Taylor, E.W.* (1971) *Biochemistry*, **10**, 4617–4624.
39. *Bagshaw, C.R., Trentham, D.R.* (1974) *Biochem J.*, **141**, 331–349.
40. *Zoghbi, M.E., Woodhead, J.L., Moss, R.L., Craig, R.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 2386–2390.
41. *Stewart, M.A., Franks-Skiba, K., Chen, S., Cooke, R.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 430–435.
42. *Cooke, R.* (1986) *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **21**, 53–118.
43. *Holmes, K.C.* (1997) *Curr. Biol.*, **7**, R112–118.
44. *Huxley, A.F., Simmons, R.M.* (1971) *Nature*, **233**, 533–538.
45. *Rosenbaum, G., Holmes, K.C., Witz, J.* (1971) *Nature*, **230**, 434–437.
46. *Huxley, H.E., Holmes, K.C.* (1997) *J. Synchrotron Radiat.*, **4**, 366–379.

47. Huxley, H., Simmons, R., Faruqi, A., Kress, M., Bordas, J., Koch, M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78**, 2297–2301.
48. Huxley, H.E., Simmons, R.M., Faruqi, A.R., Kress, M., Bordas, J., Koch, M.H. (1983) J. Mol. Biol., **169**, 469–506.
49. Irving, M., Lombardi, V., Piazzesi, G., Ferenczi, M. A. (1992) Nature, **354**, 156–158.
50. Sheetz, M. P., Spudich, J. A. (1983) Nature, **303**, 31–35.
51. Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K., Oosawa, F. (1984) Nature, **307**, 58–60.
52. Kron, S.J., Spudich, J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **83**, 6272–6276.
53. Kress, M., Huxley, H.E., Faruqi, A.R., Hendrix, G.J. (1986) Mol. Biol., **188**, 325–342.
54. Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C. (1990) Nature, **347**, 37–44.
55. Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. (1990) Nature, **347**, 44–49.
56. Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., Milligan, R.A. (1993) Science, **261**, 50–58.
57. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., Narita, A. (2009) Nature, **457**, 441–445.
58. Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J.B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M., Rayment, I. (1995) Biochemistry, **34**, 8960–8972.
59. Smith, C.A., Rayment, I. (1996) Biochemistry, **35**, 5404–5417.
60. Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., Cohen, C. (1998) Cell, **94**, 559–571.
61. Houdusse, A., Kalabokis, V.N., Himmel, D., Szent-Györgyi, A.G., Cohen, C. (1999) Cell, **97**, 459–470.
62. Houdusse, A., Szent-Györgyi, A.G., Cohen, C. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 11238–11243.
63. Bauer, C.B., Holden, H.M., Thoden, J.B., Smith, R., Rayment, I. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 38494–38499.
64. Coureux, P.-D., Wells, A.L., Ménétrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L., Houdusse, A. (2003) Nature, **425**, 419–423.
65. Sweeney, H.L., Houdusse, A. (2004) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., **359**, 1829–1841.
66. Sweeney, H.L., Houdusse, A. (2010) Cell, **141**, 573–582.
67. Yang, Y., Gourinath, S., Kovács, M., Nyitrai, L., Reutzel, R., Himmel, D.M., O’Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Györgyi, A.G., Brown, J.H., Cohen, C. (2007) Structure, **15**, 553–564.
68. Manstein D.J., Ruppel K.M., Spudich J.A. (1989) Science **246**, 656–658.
69. Geeves, M.A., Holmes, K.C. (2005) Adv. Protein Chem., **71**, 161–193.
70. Uyeda, T.Q., Abramson, P.D., Spudich, J.A. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 4459–4464.
71. Reubold, T.F., Eschenburg, S., Becker, A., Kull, F.J., Manstein, D.J. (2003) Nat. Struct. Biol. **10**, 826–830.
72. Conibear, P.B., Bagshaw, C.R., Fajer, P.G., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A. (2003) Nat. Struct. Biol., **10**, 831–835.
73. Málnási-Csizmadia, A., Woolley, R.J., Bagshaw, C.R. (2000) Biochemistry, **39**, 16135–16146.
74. Málnási-Csizmadia, A., Pearson, D.S., Kovács, M., Woolley, R.J., Geeves, M.A., Bagshaw C.R. (2001) Biochemistry, **40**, 12727–12737.
75. Бэгуоу К. Мышечное сокращение. М. Мир, 1985. 159 с.
76. Huxley, H.E. (1953) Proc. R. Soc. Lond. B., **141**, 59–62.
77. Bershitsky, S.Y., Tsaturyan, A.K., Bershitskaya, O.N., Machanov, G.I., Brown, P., Burns, R., Ferenczi, M.A. (1997) Nature, **388**, 186–190.
78. Ferenczi, M.A., Bershitsky, S.Y., Koubassova, N., Siththanandan, V.,

- Helsby, W.I., Panine, P., Roessle, M., Narayanan, T., Tsaturyan, A.K.* (2005) *Structure*, **13**, 131–141.
79. *Tsaturyan, A.K., Bershitsky, S.Y., Burns, R., He, Z.H., Ferenczi, M.A.* (1999) *J. Physiol.* **520**, 681–696.
80. *Bershitsky, S.Y., Ferenczi, M.A., Koubassova, N.A., Tsaturyan, A.K.* (2009) *Front. Biosci.*, **14**, 3188–3213.
81. *Fortune, N.S., Geeves, M.A., Ranatunga, K.W.* (1989) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **10**, 113–123.
82. *Squire, J.M.* The structural basis of muscle contraction. 1981. Plenum, New York.
83. *Huxley, H.E.* (1968) *J. Mol. Biol.*, **37**, 507–520.
84. *Haselgrove, J.C., Huxley, H.E.* (1973) *J. Mol. Biol.*, **77**, 549–568.
85. *Matsubara, I., Yagi, N., Hashizume, H.* (1975) *Nature*, **255**, 728–729.
86. *Hoskins B.K., Ashley C.C., Pelc R., Rapp G., Griffiths, P.J.* (1999) *J. Mol. Biol.*, **290**, 77–97.
87. *Colson B. A., Locher M.R., Bekyarova T., Patel J.R., Fitzsimons D.P., Irving T.C., Moss R.L.* (2010) *J. Physiol.*, **588**, 981–993.
88. *Malinchik, S., Yu, L.C.* (1995) *Biophys. J.*, **68**, 2023–2031.
89. *Wray, J.J.* (1987) *Muscle Res. Cell Motil.*, **8**, 62a.
90. *Rapp, G., Schrumpf, M., Wray, J.* (1991) *Biophys. J.*, **59**, 35.
91. *Bennett, P.M., Tsaturyan, A., Bershitsky, S.* (2002) *J. Microsc.*, **206**, 152–160.
92. *Bershitsky, S.Y., Koubassova, N.A., Bennett, P.M., Ferenczi, M.A., Sheshtakov, D.A., Tsaturyan, A.K.* (2010) *Biophys. J.*, **99**, 1827–1834.
93. *Cecchi, G., Griffiths, P., Bagni, M., Ashley, C., Maeda, Y.* (1991) *Biophys. J.*, **59**, 1273–1283.
94. *Matsubara, I., Goldman, Y., Simmons R.M.* (1984) *Mol. Biol.*, **173**, 15–33.
95. *Fuchs, F., Martyn, D.A.* (2005) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 199–212.
96. *Farman, G.P., Allen, E.J., Gore, D., Irving, T.C., de Tombe, P.P.* (2007) *Biophys. J.*, **92**, L73–75.
97. *Huxley, H.E., Stewart, A., Sosa, H., Irving, T.* (1994) *Biophys. J.*, **67**, 2411–2421.
98. *Wakabayashi, K., Sugimoto, Y., Tanaka, H., Ueno, Y., Takezawa, Y., Amemiya, Y.* (1994) *Biophys. J.* **67**, 2422–2435.
99. *Bordas, J., Svensson, A., Rothery, M., Lowy, J., Diakun, G.P., Boesecke, P.* (1999) *Biophys. J.* **77**, 3197–3207.
100. *Takezawa, Y., Sugimoto, Y., Wakabayashi, K.* (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **453**, 309–316.
101. *Tsaturyan, A.K., Koubassova, N., Ferenczi, M.A., Narayanan, T., Roessle, M., Bershitsky, S.Y.* (2005) *Biophys. J.*, **88**, 1902–1910.
102. *Linari, M., Dobbie, I., Reconditi, M., Koubassova, N., Irving, M., Piazzesi, G., Lombardi, V.* (1998) *Biophys. J.*, **74**, 2459–2473.
103. *Tamura, T., Wakayama, J., Inoue, K., Yagi, N., Iwamoto, H.* (2009) *Biophys. J.*, **96**, 1045–1055.
104. *Yagi, N., O'Brien, E.J., Matsubara, I.* (1981) *Biophys. J.*, **33**, 121–138.
105. *Squire, J.M., Harford, J.J., Edman, A.C., Sjoström, M.J.* (1982) *Mol. Biol.*, **155**, 467–494.
106. *Huxley, H.E., Brown, W.* (1967) *J. Mol. Biol.*, **30**, 383–434.
107. *Martin-Fernandez, M.L., Bordas, J., Diakun, G., Harries, J., Lowy, J., Mant, G.R., Svensson, A., Towns-Andrews, E.J.* (1994) *Muscle Res. Cell Motil.*, **15**, 319–348.
108. *Bordas, J., Diakun, G.P., Diaz, F.G., Harries, J.E., Lewis, R.A., Lowy, J., Mant, G.R., Martin-Fernandez, M.L., Towns-Andrews E.* (1993) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **14**, 311–324.
109. *Piazzesi, G., Reconditi, M., Dobbie, I., Linari, M., Boesecke, P., Diat, O., Irving, M., Lombardi, V.* (1999) *J. Physiol.*, **514**, 305–312.

110. Brunello, E., Bianco, P., Piazzesi, G., Linari, M., Reconditi, M., Panine, P., Narayanan, T., Hellsby, W.I., Irving, M., Lombardi, V. (2006) *J. Physiol.*, **577**, 971–984.
111. Linari, M., Piazzesi, G., Dobbie, I., Koubassova, N., Reconditi, M., Narayanan, T., Diat, O., Irving, M., Lombardi, V. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7226–7231.
112. Reconditi, M., Linari, M., Lucii, L., Stewart, A., Sun, Y.B., Boesecke, P., Narayanan, T., Fischetti, R.F., Irving, T., Piazzesi, G., Irving, M., Lombardi, V. (2004) *Nature*, **428**, 578–581.
113. Huxley, H., Reconditi, M., Stewart, A., Irving, T. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**, 743–761.
114. Huxley, H., Reconditi, M., Stewart, A., Irving, T. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**, 762–772.
115. Juanhuix, J., Bordas, J., Campmany, J., Svensson, A., Bassford, M.L., Narayanan, T. (2001) *Biophys. J.*, **80**, 1429–1441.
116. Oshima, K., Takezawa, Y., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Irving, T.C., Wakabayashi, K. (2007) *J. Mol. Biol.*, **367**, 275–301.
117. Yagi, N., Iwamoto, H., Wakayama, J., Inoue, K. (2005) *Biophys. J.*, **89**, 1150–1164.
118. Huxley, H.E., Faruqi, A.R., Kress, M., Bordas, J., Koch, M.H.J. (1982) *J. Mol. Biol.*, **158**, 637–684.
119. Linari, M., Brunello, E., Reconditi, M., Sun, Y.B., Panine, P., Narayanan, T., Piazzesi, G., Lombardi, V., Irving, M. (2005) *J. Physiol.*, **567**, 459–469.
120. Tsaturyan, A.K., Bershitsky, S.Y., Burns, R., Ferenczi, M.A. (1999) *Biophys. J.*, **77**, 354–372.
121. Bershitsky, S.Y., Tsaturyan, A.K. (2002) *J. Physiol.*, **540**, 971–988.
122. Piazzesi, G., Reconditi, M., Koubassova, N., Decostre, V., Linari, M., Lucii, L., Lombardi, V. (2003) *J. Physiol.*, **549**, 93–106.
123. Irving, M., Piazzesi, G., Lucii, L., Sun, Y.B., Harford, J.J., Dobbie, I.M., Ferenczi, M.A., Reconditi, M., Lombardi, V. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 482–485.
124. Bagni, M.A., Colombini, B., Amenitsch, H., Bernstorff, S., Ashley, C.C., Rapp, G., Griffiths P.J. (2001) *Biophys. J.*, **80**, 2809–2822.
125. Koubassova, N.A., Bershitsky, S.Y., Ferenczi, M.A., Tsaturyan, A.K. (2008) *Biophys. J.*, **95**, 2880–2894.
126. Rome, E. (1972) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **37**, 331–339.
127. Haselgrove, J.C. (1975) *J. Mol. Biol.*, **92**, 113–143.
128. Малинчик С.Ю., Леднев В.В. (1986) Доклады Академии наук СССР, **289**, 1258–1262.
129. Малинчик С.Ю., Леднев В.В. (1987) Доклады Академии наук СССР, **293**, 238–242.
130. Malinchik, S.B., Lednev, V.V. (1992) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 406–419.
131. Hudson, L., Harford, J.J., Denny, R.C., Squire, J.M. (1997) *J. Struct. Biol.*, **137**, 154–163.
132. Xu, S., Gu, J., Rhodes, T., Belknap, B., Rosenbaum, G., Offer, G., White, H., Yu, L. (1999) *Biophys. J.*, **77**, 2665–2676.
133. Malinchik, S., Xu, S., Yu, L.C. (1997) *Biophys. J.*, **73**, 2304–2312.
134. Xu, S., Malinchik, S., Gilroy, D., Kraft, T., Brenner, B., Yu, L. (1997) *Biophys. J.*, **73**, 2292–2303.
135. Xu, S., Offer, G., Gu, J., White, H., Yu L. (2003) *Biochemistry*, **42**, 390–401.
136. Woodhead, J.L., Zhao, F.-Q., Craig, R., Egelman, E.H., Alamo, L., Padrón R. (2005) *Nature*, **436**, 1195–1199.
137. Urbanke, C., Wray, J. (2001) *Biochemistry*, **358**, 165–173.
138. Yagi, N. (1992) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**, 457–463.

139. Ford, L.E., Huxley, A.F., Simmons, R.M. (1977) *J. Physiol.*, **269**, 441–515.
140. Yagi, N., Takemori, S., Watanabe, M. (1993) *J. Mol. Biol.*, **231**, 668–677.
141. Xu, S., Gu, J., Melvin, G., Yu, L. (2002) *Biophys. J.*, **82**, 2111–2122.
142. Xu, S., Gu, J., Belknap, B., White, H., Yu, L.C. (2006) *Biophys. J.*, **91**, 3370–3382.
143. Reisler, E., Egelman, E.H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 36133–36137.
144. Oda, T., Namba, K., Maeda, Y. (2005) *Biophys. J.*, **88**, 2727–2736.
145. Yagi, N., Matsubara, I. (1989) *J. Mol. Biol.*, **208**, 359–363.
146. Kraft, T., Mattei, T., Radocaj, A., Piep, B., Nocula, C., Furch, M., Brenner, B. (2002) *Biophys. J.*, **82**, 2536–2547.
147. Iwamoto, H., Oiwa, K., Kovács, M., Sellers, J.R., Suzuki, T., Wakayama, J., Tamura, T., Yagi, N., Fujisawa, T. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**, 249–264.
148. Brenner, B., Yu, L.C., Podolsky, R.J. (1984) *Biophys. J.*, **46**, 299–306.
149. Brenner, B., Yu, L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5252–5256.
150. Gu, J., Xu, S., Yu, L.C. (2002) *Biophys. J.*, **82**, 2123–2133.
151. Huxley, H.E., Kress, M. (1985) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **6**, 153–161.
152. Yagi, N. (1991) *Adv. Biophys.*, **27**, 35–43.
153. Stehle, R., Brenner, B. (2000) *Biophys. J.*, **78**, 1458–1473.
154. Yagi, N. (1996) *Acta Cryst. D.*, **52**, 1169–1173.
155. Tsaturyan, A.K. (2002) *Acta Crystallogr. A*, **58**, 292–294.
156. Cochran, W., Crick, F.H.C., Vand, V. (1952) *Acta Cryst.*, **5**, 581–586.
157. Yu, L.C. (1989) *Biophys. J.*, **55**, 433–440.
158. Вайнштейн Б.К. Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах. М.: Издательство АН СССР, 1963. 372 с.
159. Squire, J., Harford, J. (1984) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **170**, 221–236.
160. Harford, J., Squire, J. (1986) *Biophys. J.*, **50**, 145–155.
161. Al-Khayat, H.A., Hudson, L., Reedy, M.K., Irving, T.C., Squire, J.M. (2003) *Biophys. J.*, **85**, 1063–1079.
162. Al-Khayat, H.A., Squire, J.M. (2006) *J. Struct. Biol.*, **155**, 218–229.
163. Xu, S., White, H.D., Offer, G.W., Yu, L.C. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 3673–3681.
164. Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M. (1993) *Science*, **261**, 58–65.
165. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. М. Наука, 1987. Т. VII. Теория упругости.
166. Taylor, K.A., Schmitz, H., Reedy, M.C., Goldman, Y.E., Franzini-Armstrong, C., Sasaki, H., Tregear, R.T., Poole, K., Lucaveche, V., Edwards, R.J., Chen, L.F., Winkler, H., Reedy, M.K. (1999) *Cell*, **99**, 421–431.
167. Wu, S., Liu, J., Reedy, M.C., Tregear, R.T., Winkler, H., Franzini-Armstrong, C., Sasaki, H., Lucaveche, C., Goldman, Y.E., Reedy, M.K., Taylor, K.A. (2010) *PLoS One*, **9**, e12643.2010.
168. Holmes, K.C., Tregear, R.T., Barrington Leigh, J. (1980) *Proc. R. Soc. B.*, **207**, 13–33.
169. Squire, J.M., Harford, J.J. (1988) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **9**, 344–358.
170. Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F.J., Jahn, W., Schroeder, R.R. (2003) *Nature*, **425**, 423–427.
171. Koubassova, N.A., Tsaturyan, A.K. (2002) *Biophys. J.*, **83**, 1082–1097.