

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ

©2015 г. Л. В. НИКИТИНА, Г. В. КОПЫЛОВА,
Д. В. ЩЕПКИН, С. Р. НАБИЕВ, С. Ю. БЕРШИЦКИЙ

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

I. Введение. II. Изоформы сердечного миозина. III. Кальциевая регуляция сокращений сердечной мышцы. IV. Методы исследования молекулярных механизмов функционирования сердечной мышцы. V. Исследование молекулярных механизмов кальциевой регуляции сократимости сердечной мышцы. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Функциональные характеристики сердечной мышцы напрямую зависят от изоформного состава белков сократительного аппарата кардиомиоцита. В миокарде желудочков млекопитающих экспрессируется целый спектр изоформ сократительных и регуляторных белков, в частности: две изоформы миозина – V1 и V3 [1], две изоформы α -актина (сердечная и скелетная) [2], три изоформы цепей тропомиозина – α , β [3] и κ [4, 5]. Экспрессия изоформ белков зависит от вида животного, его возраста и гормонального статуса [1–3, 6].

Принятые сокращения: G-актин – глобулярный актин; F-актин – филаментарный актин; TnC – тропонин C; TnI – тропонин I; TnT – тропонин T; Tm – тропомиозин; V_{\max} – максимальная скорость укорочения мышцы; ТЦМ – тяжелые цепи миозина; ТММ – тяжелый меромиозин; ЛММ – легкий меромиозин; S1 – субфрагмент 1, или головка молекулы миозина; S2 – субфрагмент 2, или стержневая часть тяжелого меромиозина; A₂TmTn – регуляторная группа, состоящая из семи молекул G актина, одной молекулы тропомиозина и одной молекулы тропонина; NEM – N-этилмалеимид; pCa – отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция; pCa₅₀ – концентрация кальция, при которой достигается половина максимальной скорости скольжения или силы (кальциевая чувствительность); Xb – поперечный мостик; CaTnC – кальций-тропомиозин-тропомиозин-тропомиозин кооперативность; CaTnC-CaTnC – тропомиозин-тропомиозин кооперативность; АОД – акустооптический дефлектор.

Адрес для корреспонденции: l.nikitina@iip.uran.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-04-96027, 13-04-40101, 15-34-20136, 15-04-01558, программы РАН 0401-2014-0002 и Правительства Свердловской области.

Изоформный состав белков кардиомиоцита меняется также при изменении условий функционирования, в том числе при экспериментальном моделировании патологических состояний миокарда. Так, в экспериментах с вызванной перегрузкой давлением гипертрофией левого желудочка взрослых крыс происходит повторная экспрессия изоформ миозина, актина и тропомиозина, характерных для внутриутробного развития: изомиозин V1 заменяется на V3, сердечная изоформа актина – на скелетную и α -цепь тропомиозина – на β -цепь [7]. κ -Тропомиозин, который играет важную роль в миофибриллогенезе, также реэкспрессируется при дилатационной кардиомиопатии [4, 5]. В 90-х годах были обнаружены мутации белков, приводящие к патологическим состояниям. Так, наследственную гипертрофическую кардиомиопатию, являющуюся причиной сердечной недостаточности и внезапной остановки сердца, вызывают более 300 мутаций в 11 генах, которые кодируют белки саркомера. В 85% случаях эти мутации затрагивают β -тяжелую цепь миозина, α -изоформу тропомиозина, миозин-связывающий белок C, сердечный тропонин I и тропонин T [8–11].

Большинство работ по изучению изменений изоформного состава белков проведены либо на интактном сердце, либо на изолированных полосках миокарда, что не даёт ясного представления о роли каждой из этих изоформ в сокращении миокарда. Использование методов оптической ловушки и искусственной подвижной системы даёт возможность изучать феномены взаимодействия регуляторных и сократительных белков на уровне тонкого филамента, исключая эффекты, связанные с иными свойствами целой мышцы, и позволяют, комбинируя изоформы белков саркомера, изучать молекулярные механизмы и их роли в актин-миозиновом взаимодействии. В данном обзоре представлены и проанализированы результаты исследований влияния изоформ сердечного миозина на сократительную функцию миокарда и ее регуляцию на разных уровнях организации сердечной мышцы, включая наши собственные работы. В обзоре уделено внимание результатам исследований кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия и роли изоформ миозина и тропомиозина в реализации механизмов кооперативности в миокарде, полученных с применением методов искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом и оптической ловушки.

II. ИЗОФОРМЫ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА

Миозин, сократительный белок поперечнополосатых и гладких мышц, – биологический мотор, преобразующий химическую энергию гидролиза АТФ в механическую работу. Молекула миозина представляет собой гетерогексамер с молекулярной массой 450–500 кДа и длиной около 17 нм, состоящий из двух тяжёлых цепей (200–240 кДа), двух регуляторных (17–21 кДа) и двух существенных (16–22 кДа) лёгких цепей. Эти шесть полипептидных цепей удерживаются между собой за счёт нековалентных связей и образуют комплекс, называемый мономерным миозином. N-концевая часть каждой из тяжёлых цепей миозина формирует глобулярную головку, состоящую из двух главных доменов – моторного (каталитического) и регуляторного. В N-концевом моторном домене головки располагаются актин-связывающий и АТФазный центры, а С-концевой регуляторный домен представляет собой α -спиральный «рычаг», с которым ассоциированы лёгкие цепи миозина, выполняющие регуляторную и стабилизирующую функцию при генерации силы головкой миозина. Химотрипсин расщепляет молекулу миозина на тяжёлый (ТММ) и лёгкий (ЛММ) меромиозин. ТММ в свою очередь можно расщепить папаином на глобулярную головку (субфрагмент 1, или S1) и стержневой субфрагмент 2 (S2) [12].

В 1977 году австралийский ученый Джозеф Хох (Joseph F. Y. Hoh), впервые разделив в нативном пирофосфатном геле сердечный миозин, выделенный из желудочка крысы, получил три полосы, которые были определены по скорости миграции в геле: V1, V2 и V3. Сердечный миозин, экстрагированный из предсердия, разделился в этом же геле на 2 полосы, названные A1 и A2. Буквы означали принадлежность миозина: V – ventricular (желудочковый), A – atrial (предсердный). Таким образом были идентифицированы три желудочковые изоформы сердечного миозина V1, V2 и V3 и две предсердные A1 и A2 [1]. Измеренная в геле Ca^{2+} -АТФазная активность желудочковых изоформ сильно различалась и определялась соотношением 6,4:3,7:1. Также было выявлено, что желудочковые изоформы сердечного миозина различаются составом тяжёлых цепей (ТЦМ), но не лёгкими цепями. С помощью пептидного картирования было показано, что изоформа миозина V1 представляет собой гомодимер α -ТЦМ, V3 – гомодимер β -ТЦМ, а V2 – гетеродимер, состоящий из α - и β -ТЦМ [13]. Денатурирующий гель показывает наличие в миокарде желудочка двух изоформ тяжёлых цепей миозина, которые вместе с лёгкими цепями миозина желудочкового типа образуют изомиозины V1 и V3 [14]. В миокарде предсердий α - и β -ТЦМ вместе с лёгкими цепями

атриального типа формируют два вида изомиозинов: А1 (α - α) и А2 (β - β) [15].

Аминокислотные последовательности изоформ сердечного миозина V1 и V3 исследованных млекопитающих (мышь, крыса, кролик, человек) идентичны на 93 % [16]. Большинство из этих неидентичных аминокислотных остатков локализованы в пяти различных регионах молекулы: в основании каталитического домена и на стыке с существенной лёгкой цепью (аминокислотные остатки 32–36); у входа в АТФ-связывающий карман, а также в поверхностной петле 1 (аминокислотные остатки 210–214 и 349–351); в поверхностной петле 2, стягивающей актин-связывающую щель (аминокислотные остатки 619–641); в области шейки, или «рычага» (аминокислотные остатки 800–810); в субфрагменте 2 (аминокислотные остатки 1088–1094).

Для выяснения функциональной значимости этих аминокислотных замен были проведены исследования с использованием гибридных и мутантных миозинов. На трансгенных мышцах с помощью гибридных миозинов было показано, что поверхностные петли 1 и 2 не отвечают за различие в свойствах изоформ сердечного миозина [17]. Замена же в каталитическом домене сердечного миозина, когда гибридный миозин содержал каталитический домен β -ТЦМ, а остальная часть состояла из α -цепи, вела к значительным последствиям. Такой гибридный миозин обладал примерно такой же актин-активируемой АТФазной активностью, как и V3 изомиозин, а его кальций-активируемая АТФазная активность была сопоставима с активностью V1. В искусственной подвижной системе гибридный миозин передвигал актиновый филамент (F-актин) со скоростью, не отличающейся от скорости V1. Максимальная изометрическая сила папиллярной мышцы с таким гибридным миозином не отличалась по величине от силы, развиваемой мышцами, содержащими нативные изоформы сердечного миозина. Результаты этих исследований показывают, что разница в аминокислотных последовательностях между α - и β -ТЦМ как в каталитическом домене, так и в области «рычага», определяет различие в их механических и кинетических характеристиках [16, 18].

В экспериментах с мутантными животными точечные мутации, локализованные в актин-связывающем (R403Q и V606M) и нуклеотид-связывающем (R249Q, G256E и R453C) участках, а также в т.н. «конверторном» субдомене (R719Y и R723G) миозиновой головки, приводили к изменению механических и кинетических свойств миозина [19, 20]. Например, мутация R403Q вызывала увеличение генерации силы миозином, мутация же R453C приводила к обратному эффекту.

α - и β -тяжёлые цепи сердечного миозина существенно гомологичны у разных видов экспериментальных животных [16]. Так, последовательности α -ТЦМ крысы, кролика, хомяка и человека идентичны на 95%. Аминокислотная последовательность β -ТЦМ разных животных гомологична на 94%. Например, разница между изомиозинами V1 крысы и кролика составляет всего лишь восемь аминокислотных остатков, пять из которых находятся в головке миозина (преимущественно в моторном домене, в т.ч. в его актин-связывающих участках (остатки 2, 210, 442, 452 и 801), а три – в области стержня (остатки 1092, 1637 и 1681). Эти аминокислотные замены определяют различие гидролитических и механических свойств данных изомиозинов. Изоформы сердечного миозина V3 кролика и крысы различаются по четырём аминокислотным остаткам в положениях 424, 573, 1210 и 1368. Два из четырех таких остатков (424 и 573) локализованы в актин-связывающем и нуклеотид-связывающем участках, соответственно, и могут иметь функциональное значение. Эти различия в аминокислотной последовательности приводят к тому, что АТФазная активность изомиозина V3 крысы выше, и он двигает актиновый филамент с большей скоростью, чем соответствующий изомиозин кролика [16].

СВОЙСТВА ИЗОФОРМ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА

Было показано, что по своим гидролитическим и функциональным характеристикам изоформы сердечного миозина существенно различаются между собой у большинства видов млекопитающих. В биохимических исследованиях было обнаружено, что актин-активируемая АТФазная активность изоформы V1 по данным разных авторов в 1,6–3,5 раза выше, чем у V3 [21–23]. Ca^{2+} -АТФазная активность примерно в 2 раза выше у V1, чем у V3 [16, 21, 24, 25]. K^+ -EDTA-АТФазная активность изоформ сердечного миозина не различалась [24, 25]. Vanerjee и Morkin [26] показали, что актин-активируемая АТФазная активность сердечного миозина, выделенного из гипертиреоидных кроликов, который содержал преимущественно изоформу V1, примерно в 1,7 раза выше, чем из эутиреоидных, т.е. с преобладанием изоформы V3.

Для многих типов мышц была определена связь между максимальной скоростью укорочения мышцы (V_{\max}), полученной в постнагрузочных сокращениях на трабекулах и папиллярных мышцах, и АТФазной активностью миозина, полученного из данной мышцы [27]. Maughan с соавторами [28] сравнили V_{\max} мышечного препарата из правого желудочка кролика, сердце которого было экспериментально

гипертрофированно, и актин-активируемую АТФазную активность миозина из этого препарата с теми же характеристиками мышцы из нормального сердца. В случае гипертрофированного сердца авторы наблюдали сравнимое уменьшение обоих параметров и предположили, что скорость укорочения отражает скорость циклирования поперечных мостиков миозина.

Schwartz и др. [29] сравнили максимальные скорости укорочения папиллярной мышцы крысы, содержащей преимущественно изомиозин V1, и папиллярной мышцы с преобладанием изомиозина V3 и показали, что V_{\max} первой мышцы в 4–5-раз превосходит V_{\max} второй. Для папиллярных мышц кролика это соотношение оказалось около 6 [30]. Хотя приведенные выше данные указывают на положительную корреляцию между АТФазной активностью и V_{\max} , эти характеристики не являются пропорциональными, в частности, из-за различий в активации [31].

В литературе нет единого мнения о влиянии содержания сердечных изомиозинов на силогенерирующую способность сердечной мышцы. Maughan с соавторами [28] сравнили максимальные силы, развиваемые химически демембранными волокнами, выделенными из правых желудочков эутиреоидных (V3) и гипертироидных (V1) кроликов, и не нашли различий между ними. Сходные результаты были получены в экспериментах на крысах с гипертрофией сердца.

В экспериментах на миофибриллах из желудочков мелких грызунов и человека найдено, что миофибриллы мышцей с α -ТЦМ развивают такую же силу, как миофибриллы человека с β -ТЦМ [32]. Препараты миокарда, содержащие преимущественно α - или β -ТЦМ, не различались величиной изометрической силы [33]. Немногочисленные исследования измерения силы миокарда крупных животных показали, что сердечная мышца, содержащая преимущественно β -ТЦМ, генерирует силу вдвое большую по сравнению с мышцей, содержащей α -ТЦМ [34].

III. КАЛЬЦИЕВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СОКРАЩЕНИЙ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

На молекулярном уровне силогенерация либо укорочение мышцы происходит за счёт циклического взаимодействия головок молекул миозина с актином тонкой нити, во время которого они присоединяются к ней, совершают рабочий шаг и отсоединяются, гидролизую АТФ. Процесс регуляции сокращений представляет собой активацию/инактивацию тонкого филамента кальций-регуляторной тропонин-

тропомиозиновой системой и определяется ходом изменения концентрации кальция в цитозоле, который, в свою очередь, регулируется электрической активацией клетки, т.е. потенциалом действия. Потенциал действия возникает в клетках рабочего миокарда в ответ либо на пейсмекерный, либо на внешний (в условиях эксперимента или использования кардиостимулятора) электрический импульс, который запускает кальциевые, калиевые и натриевые трансмембранные ионные токи. Все эти процессы охвачены целым рядом обратных связей. В частности, механические условия сокращений, а также образование и распад поперечных мостиков, влияют на кальциевую и электрическую активацию.

ВЫЗВАННЫЕ КАЛЬЦИЕМ СТРУКТУРНО-КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТОНКОГО ФИЛАМЕНТА

В тонком филаменте саркомера семь молекул G-актина, одна молекула тропомиозина и одна молекула тропонина образуют структурно-функциональную единицу – A_7TmTn , которая называется регуляторной группой [35]. Тропонин состоит из трёх взаимодействующих между собой субъединиц: TnC, TnI и TnT. Тропонин С ответственен за связывание кальция тропониновым комплексом, тропонин I – за связывание с актином и ингибирование АТФазной активности миозина, тропонин Т связывает тропониновый комплекс с тропомиозином [35]. При связывании кальция с TnC в тонком филаменте происходит ряд структурных изменений, которые делают возможным взаимодействие миозина с актином [36].

В модели McKillop и Geeves [37] тропомиозин на актиновом филаменте может находиться в трёх состояниях: блокирующем, закрытом и открытом. В отсутствие ионов кальция тропомиозин блокирует большинство миозин-связывающих мест (блокирующее состояние). Связывание кальция с TnC ведет к структурным изменениям в тропониновом комплексе, что позволяет тропомиозину азимутально смещаться по поверхности актинового филамента, открывая большинство, но не все, миозин-связывающих участков актина и делая тем самым возможным слабое, электростатическое, связывание миозина с актином (закрытое состояние). Это присоединение головок миозина к сильно-связывающим, гидрофобным участкам на актине ведёт к дальнейшему смещению тропомиозина из закрытого состояния в открытое, при этом все миозин-связывающие участки актина становятся доступны миозиновым головкам [37, 38]. В таком положении тропомиозина становится возможной генерация силы поперечными мостиками.

КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ

Функция поперечнополосатых мышц реализуется с участием ряда кооперативных (аллостерических) эффектов. Для описания зависимости силы, развиваемой мышцей, от концентрации ионов кальция Donaldson и Kerrick [39] использовали уравнение Хилла: $F = F_0[Ca^{2+}]^h / (K^h + [Ca^{2+}]^h)$, где h – коэффициент кооперативности Хилла, F_0 – максимальная сила, K^h – концентрация ионов кальция, при которой достигается сила, равная половине максимальной силы, называемая кальциевой чувствительностью. Поскольку обычно концентрация ионов кальция выражается в pCa ($-\log_{10}[Ca^{2+}]$), уравнение можно переписать: $F = F_0 / [1 + 10^{h(pCa_{50} - pCa)}]$, где pCa_{50} – концентрация ионов кальция, необходимая для полумаксимальной активации мышцы. Коэффициент кооперативности Хилла отражает степень кооперативности кальциевой активации. Из теоретических представлений следует, что связывание кальция с одним сайтом ТnC контролирует силу в отношении один к одному, т. е. $h = 1$. Если же, как в скелетной мышце, кальций связывается с двумя сайтами ТnC, то h может увеличиваться до 1,2 [40] при условии, что сайты независимы и связывание с обоими сайтами необходимо для активации. Однако экспериментальные данные показывают другие значения: коэффициент кооперативности Хилла изометрической силы обычно лежит в диапазоне от 2 до 5–6 в скелетной и сердечной мышцах [41, 42].

Концепция кооперативности сформулирована Gordon с соавт. [35] на примере активации скелетной мышцы. Сила, развиваемая мышцей в изометрическом состоянии, зависит от количества сильно-связанных поперечных мостиков и силой, развиваемой каждым из них. В свою очередь это определяется количеством актин-связывающих участков, доступных для сильного связывания миозина. Из особенностей структуры молекул актина и миозина следует, что к семи мономерам актина может быть присоединено не более четырех головок миозина. Во время изометрического сокращения только 20–40 % из всех поперечных мостиков (Xb) присоединены в каждый момент времени [35, 43–46], что соответствует примерно 1–2 головкам миозина на семь актиновых мономеров.

Упрощенная механо-химическая модель цикла поперечного мостика [35] описывает взаимодействие одной молекулы миозина с одной молекулой актина тонкого филамента. Из особенностей структуры саркомера следует, что активация вовлекает множество потенциальных взаимодействий миозина с молекулами актина вдоль

каждого тонкого филамента. Эта активация должна вовлекать кооперативность внутри и между регуляторными единицами (A_7TnTm).

Известно несколько механизмов кооперативности, благодаря которым при связывании ионов кальция с TnC через конформационные изменения в тонком филаменте с последующим образованием поперечного мостика происходит кооперативное увеличение количества Xb вдоль актинового филамента. В регуляции сокращения сердечной мышцы ключевую роль, по мнению ряда исследователей, играют два механизма кооперативности [36, 40, 47, 48]:

1) кооперативность Xb-CaTnC – сродство TnC к кальцию вдоль актиновых нитей саркомеров тем выше, чем больше поперечных мостиков образовалось на этих нитях;

2) кооперативность CaTnC-CaTnC – сродство TnC к кальцию тем выше, чем больше образовалось самих кальций-тропониновых комплексов вдоль актиновых нитей.

Показано, что эти механизмы лежат в основе влияния механических условий сокращений миокарда на активацию/инактивацию его сократительной функции [49–54]. Известно, что увеличение расстояния между актиновыми и миозиновыми нитями в ходе укорочения саркомера («lattice spacing») уменьшает вероятность образования поперечных мостиков, что через кооперативность Xb-CaTnC уменьшает концентрацию кальций-тропониновых комплексов, в то время как кооперативность CaTnC-CaTnC усиливает этот эффект. Т.е. происходит инактивация сердечной мышцы. И наоборот, увеличение длины мышцы способствует ее активации.

В рамках математической модели сократительной активности миокарда было установлено, что именно эта цепочка внутриклеточных событий определяет широкий спектр экспериментально установленных механо-механических, механо-кальциевых и механо-электрических обратных связей в ходе циклов «сокращение-расслабление» миокарда [55, 56]. Как показывает анализ модели, именно данная цепочка событий является причиной таких фундаментальных эффектов, характерных для сердечной мышцы, как ее грузозависимое расслабление и инактивация в ответ на кратковременные деформации в ходе изометрического цикла «сокращение-расслабление». В модели показано, что эта цепочка событий ответственна за механозависимые различия во временном ходе изменения концентрации кальция в цитозоле и длительностях потенциалов действия, обнаруженные в классических исследованиях на папиллярных мышцах и трабекулах [57–59], и впоследствии подтвержденные в других работах [60–65], в

том числе и на изолированных клеточных препаратах [66, 67]. Таким образом, сформировалось подкрепленное большим количеством экспериментальных и теоретических работ представление о роли указанных механизмов кооперативности в регуляции сократительного цикла сердечной мышцы, а также в ритмоинотропных явлениях в нормальных и патологических условиях [68, 69].

Кооперативность $Xb-CaTnC$ охватывает обратными связями сократительные и регуляторные белки миокарда в процессе активации тонкой нити. При этом существующие в сердце млекопитающих две изоформы миозина обладают разными гидролитическими, кинетическими и механическими характеристиками. Возникает вопрос о возможной модуляции регуляторных механизмов активации тонкой нити через данный тип кооперативности изоформами миозина. Вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую регуляцию сокращений миокарда традиционно изучался на фрагментах ткани сердечной мышцы и изолированных кардиомиоцитах [70–73]. В этих экспериментах регистрировались связи rCa -сила и rCa -скорость, при этом определялись коэффициент кооперативности и кальциевая чувствительность.

IV. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Методы оптической ловушки и искусственной подвижной системы позволяют изучать функциональные характеристики изолированных молекул саркомерных белков сердечной мышцы. С помощью этих методов можно исследовать механические взаимодействия регуляторных и сократительных белков непосредственно на уровне тонкой нити, что дает возможность избежать сложностей интерпретации результатов, связанных со свойствами целой мышцы, либо кардиомиоцита. Рассмотрим возможности этих методов.

МЕТОД ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

Метод лазерной оптической ловушки используется для измерения механических и кинетических характеристик взаимодействия *одиночных* молекул миозина, в частности, сердечного, с филаментарным актином. Суть метода состоит в следующем. Луч лазера, сфокусированный высокоапертурным объективом, образует «оптическую ловушку» (английские термины: *optical trap* или *optical tweezers*), способную захватывать и удерживать в фокусе микроскопические

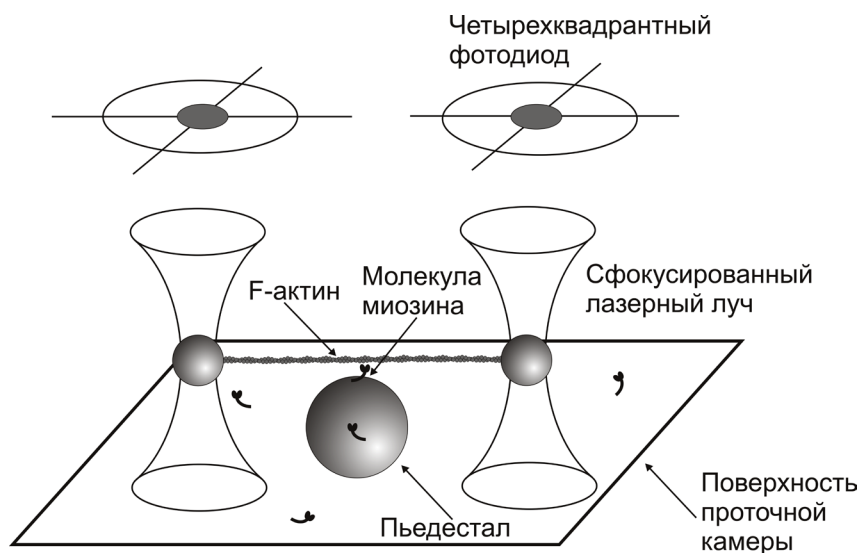


Рис. 1. Принципиальная схема метода оптической ловушки.

Нить актина прикреплена к двум полистироловым шарикам диаметром 1 мкм, удерживаемым в сфокусированных лучах лазера. Изображения шариков проецируются на квадрантные фотодиоды для регистрации их положения и движения. На поверхности проточной камеры укреплен стеклянный шарик, пьедестал, вдвое большего размера, покрытый молекулами исследуемого миозина в очень низкой концентрации. При приближении актиновой нити к пьедесталу одиночная молекула миозина взаимодействует с ней.

объекты с силами порядка 10^{-12} – 10^{-11} Н [74, 75]. На основе этого явления в лаборатории биологической подвижности Института иммунологии и физиологии УрО РАН была создана установка для исследования механических характеристик одиночных молекул миозина [76]. В установке два луча инфракрасного лазера удерживают в растворе два полистироловых шарика диаметром 1 мкм, покрытых NEM-миозином, который служит «клеем», необратимо связывающим филаментарный актин (рис. 1). Флуоресцентно окрашенная актиновая нить клеится к этим шарикам, образуя измерительный зонд в форме гантели, и растягивается между ними с смещением одного из лучей с помощью двухкоординатного акусто-оптического дефлектора (рис. 2). К поверхности проточной камеры, в которой проводится эксперимент, крепятся стеклянные шарики несколько большего диаметра, 1,7 мкм, которые используются как пьедестал для молекул миозина, свойства которого изучаются. «Гантель» с помощью пьезоэлектрического

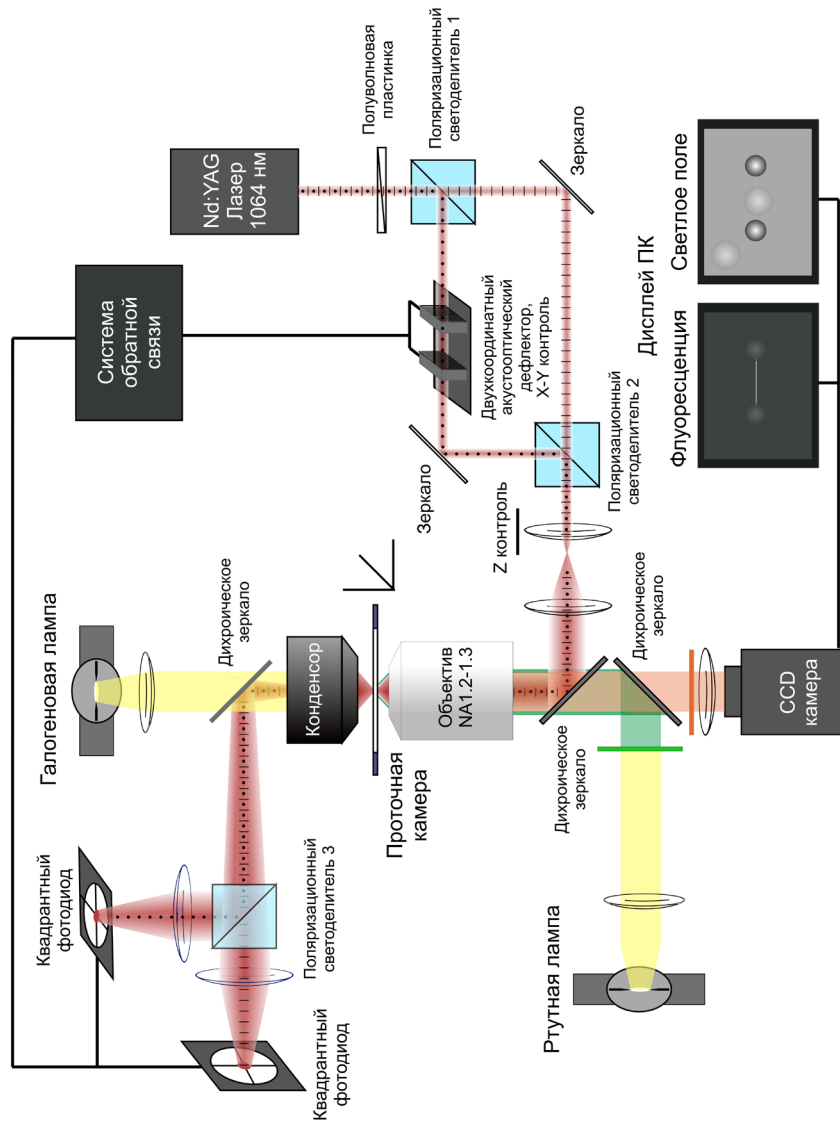


Рис. 2 – Блок-схема экспериментальной установки оптической ловушки.
Окончание подписи к рис. 2 см. на сл. стр.

Окончание подписи к рис. 2.

Установка построена на базе инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver (Carl Zeiss, Германия). Полуволновая пластинка поворачивает плоскость поляризации вертикально поляризованного луча инфракрасного лазера (Nd:YLF, 1064 nm, 5 W; Инверсия-Файбер, Россия) под углом 45°, а поляризационный светоделитель раскладывает его на два ортогонально поляризованных луча. Один из лучей проходит через двухкоординатный акустооптический дефлектор (АОД), состоящий из двух перпендикулярно ориентированных акустооптических кристаллов, функционально представляющих собой дифракционные решетки, период которых задаётся частотой генератора электрических колебаний. Изменение периода решётки меняет положение первого максимума дифракции прошедшего луча по каждой из двух координат. Таким образом, АОД позволяет быстро (<10 мкс) двигать луч в фокальной плоскости. Второй поляризационный светоделитель собирает подвижный и неподвижный лучи в один, размер которого увеличивается системой из двух линз так, чтобы он целиком заполнял заднюю апертуру объектива. Дихроическое зеркало отражает луч в оптическую систему микроскопа, а в обратном направлении пропускает в объектив видеокамеры изображение флуоресцентно окрашенных актиновых нитей или изображение шариков в проходящем свете. Прошедшие через объектив лучи, каждый из которых захватывает в проточной камере полистироловый шарик, собираются высокоапертурным иммерсионным конденсором (NA 1.4) и разводятся третьим поляризационным светоделителем в соответствии с их поляризациями на квадрантные фотодиоды (ФД20КП, Россия), которые служат для регистрации отклонений удерживаемых шариков. Сигналы фотодиодов используются в схеме обратной связи для управления АОД. Ртутная лампа служит для возбуждения флуоресценции тетраметилродамина (TRITC), которым окрашены актин и удерживаемые в ловушке шарики, с помощью набора фильтров (Filter Set 20; Carl Zeiss, Германия). Во флуоресцентном режиме производится сборка «гантели». Для поиска «пьедесталов», покрытых одиночными молекулами миозина, в режиме проходящего света используется галогеновая лампа.

наноманипулятора подводится к пьедесталу, где в присутствии АТФ происходит взаимодействие молекулы миозина с актиновой нитью. По смещению положения шариков, регистрируемого квадрантными фотодиодами, записываются одиночные взаимодействия, или «события», сопровождающиеся отклонением шариков из фокуса луча. Из распределения амплитуд событий определяются, в зависимости от используемого режима работы ловушки, то есть, с обратной связью или без неё, либо средняя сила, либо размер шага одиночных молекул миозина, соответственно, а также длительность взаимодействий.

На рисунке 3 приведены примеры экспериментальных записей шага (А) и силы (Б) одиночной молекулы миозина.

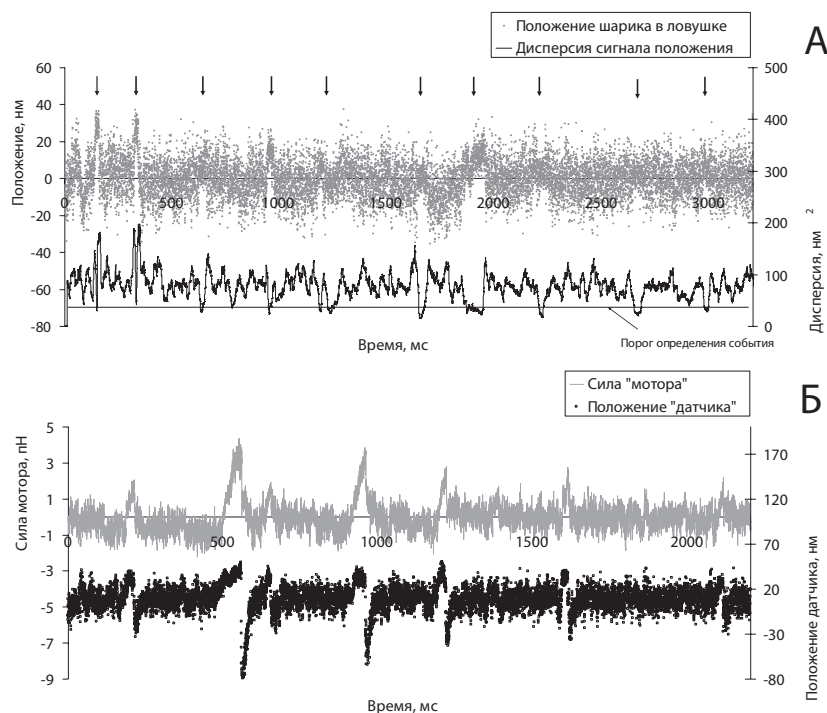


Рис. 3. Примеры экспериментальных записей перемещения (А) и силы (Б), развиваемой одиночной молекулой миозина, полученных в наших исследованиях.

(А). «Событие», т.е. время от присоединения молекулы миозина к актину до её отсоединения определяли по падению дисперсии положения шарика в ловушке ниже заданного уровня (нижняя дорожка), как было предложено ранее [77]. «События» обозначены вертикальными стрелками. Величину перемещения, или шаг, определяли по разнице уровня сигнала в присоединенном и отсоединенном состоянии миозина.

(Б). Для измерения силы использовали режим изометрического клампа [78]. Положением шарика в неподвижном луче, «датчике», контролировалось положение управляемого АОД подвижного шарика, «мотора» с помощью обратной связи.

Исследование механических и кинетических характеристик изоформ сердечного миозина методом оптической ловушки

С помощью оптической ловушки были измерены механические и кинетические характеристики одиночных молекул изоформ сердечного миозина [79, 80]. На уровне изолированных молекул максимальная скорость V_{\max} , с которой молекула миозина может двигать актиновый филамент, определяется как $V_{\max} = d/t_{\text{он}}$, где d – шаг головки миозина,

а t_{on} – время, в течение которого она связана с актиновой нитью. Оптическая ловушка позволяет измерять параметры, определяющие среднюю силу F_{avg} , развиваемую молекулой миозина: $F_{\text{avg}} = F \times f$, где F – сила, развиваемая одиночной молекулой миозина, а f – доля времени АТФазного цикла миозина, в течение которой молекула присоединена к актину и генерирует силу (duty ratio), т.е. $f = t_{\text{on}} / t_{\text{cycle}}$. Ранее в экспериментах на оптической ловушке было найдено, что изоформы сердечных миозинов не различаются параметрами d и F , т.е. теми, что описывают механику головки миозина, но различаются кинетическими параметрами t_{on} и f . Эти параметры и определяют различие в V_{max} и F_{avg} изоформ сердечных миозинов [79, 80].

В экспериментах на оптической ловушке мы также не обнаружили различий в механических характеристиках изоформ сердечного миозина кролика: средний шаг составил $11,6 \pm 2$ нм и $12,5 \pm 3$ нм для изоформ V1 и V3, соответственно [81]. Однако средняя длительность шага изоформ различалась: среднее время жизни актин-миозинового комплекса для V1 оказалось равным $54,2 \pm 1,3$ мс, а для V3 – $62,1 \pm 2,7$ мс. Значения средней силы для обеих изоформ статистически значимо не различались: $1,8 \pm 0,7$ пН и $2,1 \pm 0,5$ пН для V1 и V3, соответственно. Величины силы, развиваемой изоформами сердечного миозина, в наших экспериментах отличались от таковых в предыдущем исследовании [80] примерно в 2 раза. Это различие может быть объяснено использованием разного типа нагружения миозина. В работе группы Warshaw [80] жёсткость измерялась в статическом режиме, тогда как в наших экспериментах жёсткость была измерена в режиме динамического нагружения [78]. Что касается продолжительности актин-миозинового взаимодействия под нагрузкой, мы также обнаружили статистически достоверные различия: изоформа V1 под нагрузкой в среднем находилась $55,4 \pm 5$ мс, а V3 – $72,4 \pm 4$ мс, что согласуется с результатами экспериментов в искусственной подвижной системе, указывающими на более высокую силотенерирующую способность изомиозина V3 по сравнению с V1 в соответствии с ранее приведённой формулой $F_{\text{avg}} = F \times f$ [22, 82].

МЕТОД ИСКУССТВЕННОЙ ПОДВИЖНОЙ СИСТЕМЫ

В отличие от оптической ловушки, метод искусственной подвижной системы (*in vitro motility assay*) даёт возможность исследовать механические и кинетические характеристики ансамбля молекул миозина, иммобилизованных на поверхности рабочей камеры. Суть метода состоит в следующем. Исследуемый моторный белок, в данном случае изоформы сердечного миозина, фиксируется на внутренней

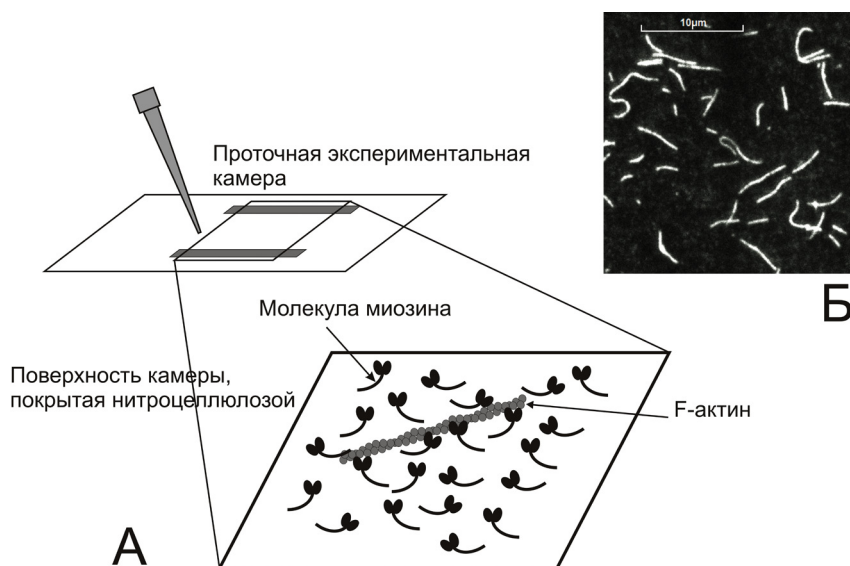


Рис. 4. (А). Схематическое изображение внутренней поверхности проточной камеры, покрытой молекулами миозина, и актинового филамента на этой поверхности. (Б). Изображение флуоресцентно окрашенных актиновых филаментов на экране монитора.

поверхности проточной камеры, покрытой нитроцеллюлозой, после чего в камеру заливается раствор, содержащий флуоресцентно окрашенный филаментарный актин [83]. Актин взаимодействует с миозином, образуя ригорный комплекс (рис. 4). Проточную камеру помещают на предметный столик инвертированного флуоресцентного микроскопа с интенсифицированной видеокамерой, соединенной с компьютером, с помощью которой актиновые филаменты визуализируются на экране монитора в виде светящихся нитей (рис. 4). При добавлении в камеру раствора, содержащего АТФ, филаменты движутся по миозиновой поверхности. Видеоизображение движения филаментов записывается на жесткий диск компьютера и впоследствии анализируется. При помощи специализированного программного обеспечения [84] измеряются скорости скольжения филаментов по поверхности, покрытой миозином или его протеолитическими фрагментами, такими как ТММ или S1.

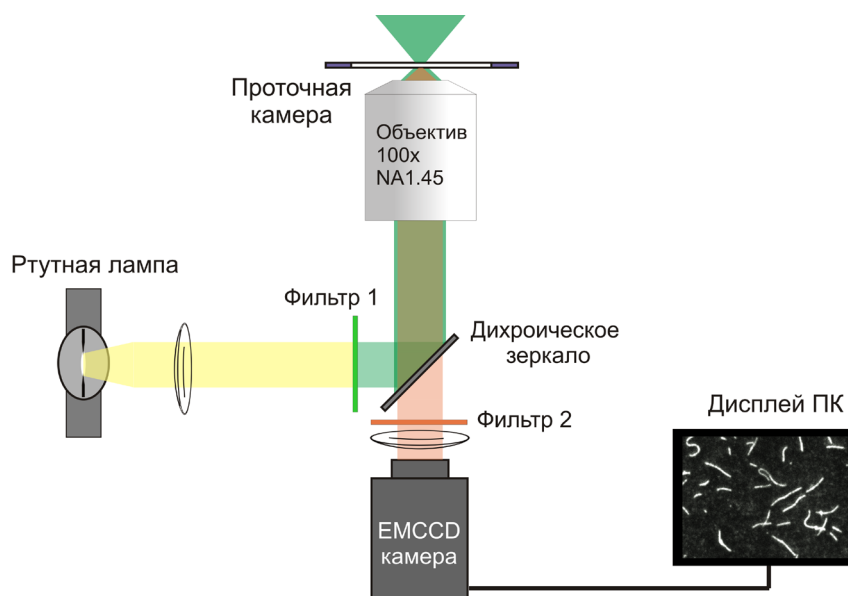


Рис. 5 – Блок-схема экспериментальной установки для регистрации флуоресцентно окрашенных актиновых филаментов и их движения методом искусственной подвижной системы.

Узкополосный зеленый фильтр 1 выделяет из излучения ртутной лампы свет с длиной волны 546 нм для возбуждения флуоресценции TRITC, который отражается в объектив дихроическим зеркалом. Флуоресценция TRITC с длиной волны 575 нм проходит через дихроическое зеркало и дополнительно фильтруется эмиссионным фильтром 2. Изображение флуоресцентно окрашенного филаментарного актина регистрируется с помощью EMCCD видеокамеры iXon-897BV (Andor Technology, Ирландия). Для экспериментов используется масляно-иммерсионный объектив Alpha Plan-Fluar 100×1,45 NA (Carl Zeiss, Германия).

Экспериментальная установка

Установка для регистрации флуоресцентно окрашенных актиновых филаментов или регулируемых тонких нитей и измерения скорости их движения *in vitro* (рис. 5) была собрана на базе инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа (Axiovert 200 M, Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH), укомплектованного ртутной лампой HBO 100 и набором фильтров (Filter Set 20; Carl Zeiss) для флуорофора тетраметилродамина (TRITC). Видеоизображение движущихся филаментов записывалось на жесткий диск компьютера и обрабатывалось с помощью программного обеспечения GMimPro [84].

*Определение силы, развиваемой миозином,
в искусственной подвижной системе*

Для измерения силы в искусственной подвижной системе разработано несколько методов, которые позволяют определять либо абсолютные, либо относительные величины сил. Для определения абсолютных сил используются стеклянная микроигла [22], центрифужный микроскоп [85], лазерный пинцет [80]. Следует заметить, что все эти методы применяются редко в связи со сложностью и трудоёмкостью экспериментальных процедур. Для измерения относительных сил используются агенты, препятствующие движению филаментов по миозиновой поверхности. Это актин-связывающие белки, такие как филамин, α -актинин [86] и NEM-обработанный миозин [87], который необратимо связывается с актином. При использовании NEM-обработанного миозина его смешивают в разных пропорциях с немодифицированным исследуемым миозином и строят зависимость скорости скольжения филаментов от его процентного состава. По наклону такой зависимости определяют относительную силу исследуемого миозина. Результаты такого подхода хорошо согласуются с прямыми измерениями изометрической силы с помощью стеклянной микроиглы [22].

Вместо химически модифицированного миозина можно использовать актин-связывающий белок α -актинин, анкерный белок, который, являясь структурным компонентом Z-линии, образует сшивки вдоль нити актина. Концентрация α -актинина, необходимая для торможения движения филаментов, линейно зависит от концентрации головок миозина на поверхности проточной камеры и развиваемой ими силы. В экспериментах Malmqvist с соавт. [23] сравнивались наклоны зависимости концентрации α -актинина от концентрации скелетного миозина цыпленка, гладких мышц и изоформ сердечного миозина кролика. Было обнаружено, что относительные средние изометрические силы были такими же, как и полученные с помощью микроиглы. В экспериментах на искусственной подвижной системе было показано [88], что α -актинин не влияет на свойства самих мышечных белков и на их взаимодействие между собой. Эти исследования подтверждают, что α -актинин – хороший инструмент для измерения относительной силы миозина в искусственной подвижной системе.

*Метод искусственной подвижной системы
с регулируемым тонким филаментом*

Метод искусственной подвижной системы позволяет изучать механизмы кальциевой регуляции сокращения скелетной и сердечной мышц с использованием реконструированных тонких филаментов, состоящих из актина и регуляторных белков – тропонина и тропомиозина [83, 86, 89–93]. В зависимости от задачи исследования тонкий филамент может содержать различные изоформы регуляторных белков, а также их мутанты [94, 95].

В такой системе можно регистрировать зависимости силы миозина и скорости движения тонкого филамента от концентрации кальция: связи pCa -сила и pCa -скорость, соответственно, что дает возможность напрямую исследовать характеристики актин-миозинового взаимодействия и его кальциевую регуляцию, исключая эффекты, связанные с механическими свойствами и биохимическими процессами в мышечной ткани. Метод позволяет сравнивать характеристики изоформ сократительных и регуляторных белков и их комбинаций.

В 1989 году Honda с соавторами [93] впервые наблюдали кальций-зависимое движение филаментарного актина, содержащего тропомиозин и тропонин, по поверхности с иммобилизованным миозином. В дальнейшем этот подход стал применяться для исследования молекулярных механизмов кальциевой регуляции сокращений как скелетных, так и сердечной мышц. Был разработан метод энзиматического расщепления тонких нитей в демембранизированном мышечном волокне и последующей их реконструкции с использованием актина и регуляторных белков [96, 97]. Было показано, что функционально нативные и реконструированные тонкие филаменты не различаются [92]. С помощью двойного окрашивания регуляторных белков Sata с соавторами [98] доказали, что они равномерно встраиваются в структуру тонкого филамента. Они также обнаружили, что при понижении pH и температуры, а также при увеличении концентрации неорганического фосфата кальциевая чувствительность сократительных белков уменьшается таким же образом, как в мышечных препаратах. Таким образом, было доказано, что реконструированные тонкие филаменты полноценны в структурном и функциональном отношении, а метод искусственной подвижной системы с реконструированным тонким филаментом может успешно использоваться для изучения взаимодействия белков и его регуляции.

Методы оптической ловушки и искусственной подвижной системы имеют определённые ограничения. Искусственная система, состоящая только из ключевых взаимодействующих белков сократительного и кальций-регуляторного аппаратов мышцы, лишена модуляторов связей между ними, существующих в сердечной клетке *in vivo*. Однако использование оптической ловушки и искусственной подвижной системы позволяют включать другие белки саркомера и сфокусированно изучать их вклад в актин-миозиновое взаимодействие и его регуляцию. В частности, с помощью этого подхода мы исследовали модулирующую роль миозин-связывающего белка С [99, 100]. Аналогичные исследования могут быть проведены и с другими белками.

V. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОЙ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИМОСТИ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

В экспериментах в искусственной подвижной системе было найдено, что скорость скольжения как филаментарного актина, так и регулируемой тонкой нити по изомиозину V1 примерно в 2 раза выше, чем по V3 [22, 101]. По нашим данным это различие составляет 1,7 раза. При добавлении регуляторных белков к F-актину скорость его скольжения по обеим изоформам сердечного миозина выросла в 3,8 раза [82].

Вопрос о различии скоростей скольжения F-актина и регулируемого тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция по одному и тому же моторному белку в искусственной подвижной системе активно обсуждается. Ряд авторов наблюдал увеличение скорости скольжения тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция при использовании скелетных [90, 91, 102] и сердечных регуляторных белков [82], в то время как другие исследователи [93, 98] такого эффекта не обнаружили. Различие в результатах может быть объяснено методическими отличиями, например, в составе буфера, используемого для экспериментов [93].

Gordon с соавторами [91] объясняли большую скорость скольжения регулируемого тонкого филамента по сравнению со скоростью F-актина увеличением актин-активируемой АТФазной активности миозина в присутствии регулируемого тонкого филамента по отношению к АТФазной активности с чистым актином. Это может быть связано с возможным влиянием регуляторных белков на актин-миозиновое взаимодействие. Увеличение скорости движения тонкого филамента может быть объяснено: 1) взаимодействием скелетно-

мышечных тропонина и тропомиозина с актином, которое меняет структуру актина и, таким образом, влияет на взаимодействие актина с миозином [103, 104]; 2) наличием возможного контакта моторной части головки миозина с центральной частью молекулы тропомиозина, который может участвовать в активации тонких нитей [105, 106].

С использованием актин-связывающего белка α -актинина в экспериментах на искусственной подвижной системе как с нерегулируемым, так и с регулируемым тонким филаментом мы измерили относительную силу при двух концентрациях изомиозинов V1 и V3, загружаемых в проточную камеру, – 300 мкг/мл (насыщающая концентрация) и 200 мкг/мл, при насыщающей концентрации свободного кальция (pCa 4) [82]. Изометрическая сила, развиваемая изомиозином V3, была в 2 раза выше, чем у V1 при обеих концентрациях миозина, что соответствует данным других исследователей, полученным в искусственной подвижной системе как с F-актином [22, 23], так и с регулируемым тонким филаментом [107]. Следует отметить, что для обеих изоформ количество α -актинина, остановившего движение филаментов, было в 6 раз выше при концентрации миозина 300 мкг/мл, чем при концентрации 200 мкг/мл.

В настоящее время с использованием метода искусственной подвижной системы интенсивно исследуются механизмы регуляции сократимости сердечной мышцы. В основном изучается влияние различных изоформ регуляторных белков в норме и при патологии. При этом молекулярные механизмы вклада кооперативности в регуляцию взаимодействия сократительных белков остаются мало исследованными.

Зависимость pCa -сила – это основная характеристика кооперативных эффектов в мышцах. Традиционно связь pCa -сила регистрируется на сканированных мышечных волокнах [70, 108] или кардиомиоцитах [71]. Noguchi с соавторами [107] первыми в экспериментах на искусственной подвижной системе получили зависимость pCa -сила изоформ сердечного миозина кролика. При анализе полученных данных авторам не удалось выявить вклада различных изомиозинов в кальциевую регуляцию. Частично это связано с тем, что их анализ был недостаточен. Авторы не определяли значения коэффициента кооперативности Хилла, хотя из рис. 5 их статьи видно, что наклоны зависимостей pCa -сила отличаются, а значит должны различаться и коэффициенты кооперативности. Поскольку авторы не приводят значений коэффициента Хилла, неизвестно, является ли это отличие статистически достоверным.

Мы исследовали вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую активацию тонкого филамента. В экспериментах с регулируемым тонким филаментом с использованием актин-связывающего белка α -актинина были получены зависимости pCa -[α -актинин] для двух концентраций (200 и 300 мкг/мл) загружаемых в проточную камеру изомиозинов V1 и V3 [82]. Кривые pCa -[α -актинин] для V1 и V3 имели форму сигмоиды.

Кривые pCa -сила были получены нормированием концентрации α -актинина при данном pCa на его минимальную концентрацию, останавливающую движение филаментов, при насыщающей концентрации кальция. При сравнении характеристик связей pCa -сила изоформ сердечного миозина V1 и V3 при разных концентрациях миозина оказалось, что расхождения в коэффициентах Хилла и кальциевой чувствительности для разных изомиозинов наблюдались при меньшей концентрации белка. Также выяснилось, что для каждого изомиозина коэффициент кооперативности возрастает с понижением концентрации белка. Проанализировав изменения коэффициента Хилла при разных концентрациях миозина, мы предположили, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов с V1 выше, чем с V3 [82]. Что касается кальциевой чувствительности, то данные, полученные из кривых pCa -сила [82] и pCa -скорость [89] показывают, что изоформа миозина V3 обладает большей чувствительностью к кальцию.

Более детальную информацию о кооперативном влиянии миозина на кальциевую регуляцию сократительной активности дает связь сила-скорость. Уровень кальция и механические условия [109, 110] через механизмы кооперативности могут модулировать зависимость сила-скорость. Мы ожидали, что соотношение сила-скорость изоформ сердечного миозина, зарегистрированное в искусственной подвижной системе при разных концентрациях кальция, будет различаться в случае, если вклад этих изоформ в кооперативность Хб-СаТnC различен.

В экспериментах на искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом и α -актинином в качестве нагрузки были получены зависимости сила-скорость изомиозинов V1 и V3 при двух концентрациях кальция: насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0). Полученные кривые имели форму, отличающуюся от классической гиперболы, зарегистрированной А.В. Хиллом (Archibald V. Hill) на скелетной мышце [111]. В области малых нагрузок кривая имела гиперболическую форму, а при больших – отклонялась от неё аналогично результатам других исследователей [85, 112].

Наличие негиперболической части кривой сила-скорость, зарегистрированной на препаратах сердечной и скелетных мышц [30, 70, 112, 113], связывали с особенностями методов регистрации данной кривой, а не с поведением поперечных мостиков. Присутствие негиперболического участка на кривых сила-скорость, полученных на центрифужном микроскопе для изоформ сердечного миозина крысы [85], а также на кривых, полученных в нашем исследовании на изоформах сердечного миозина кролика [89], свидетельствует о том, что особенность такой формы кривой сила-скорость существует на уровне актин-миозинового взаимодействия и зависит от состава сократительных белков.

Результаты нашего исследования связи сила-скорость показали, что максимальная скорость скольжения тонкого филамента по изоформе V1 больше, чем по изоформе V3, а максимальная сила, развиваемая изомиозином V1, меньше силы V3 как при насыщающей, так и при ненасыщающей концентрациях кальция. Связи сила-скорость изоформ миозина, зарегистрированные при разных уровнях кальция различаются, и это различие может быть связано с тем, что вклад изоформ в кооперативность Xb-CaTnC различен. При изменении концентрации кальция кривизна связи сила-скорость изоформы V3 меняется в большей степени, что свидетельствует о её большей чувствительности к изменению концентрации кальция.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДА ИЗОФОРМ ТРОПОМИОЗИНА В РЕГУЛЯЦИЮ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Используя искусственную подвижную систему, мы исследовали возможный вклад изоформ тропомиозина в регуляцию сократительной активности миокарда. В частности, мы оценили регуляторное влияние изоформ тропомиозина на взаимодействие изоформ сердечного миозина с актином.

В миокарде млекопитающих экспрессируются изоформы цепей тропомиозина α и β , а также продукт альтернативного сплайсинга – κ . Экспрессия изоформ тропомиозина, как и изоформ миозина, зависит от вида животного и меняется в онтогенезе [3, 114]. α -Цепь тропомиозина преобладает в сердцах взрослых особей крыс, мышей, кроликов и человека. В сердцах крыс и мышей β -цепи тропомиозин экспрессируется главным образом во время гестационного периода. Изменения в экспрессии изоформ также происходят при сердечных патологиях. Было показано [7], что увеличение экспрессии β -цепи тропомиозина происходит в сердцах взрослых крыс

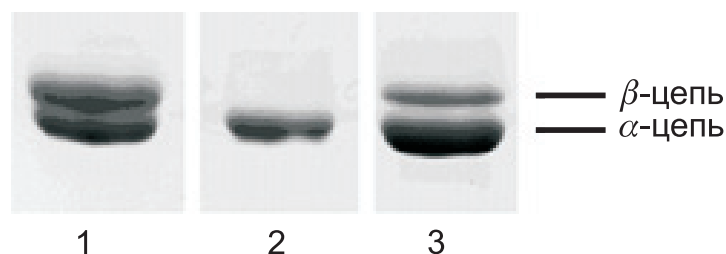


Рис. 6. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS препаратов тропомиозина, полученных из различных источников.

- 1 – тропомиозин из *m. psoas* кролика (60% α :40% β)-Тm;
- 2 – тропомиозин, экстрагированный из миокарда кролика (α - α)-Тm;
- 3 – тропомиозин, полученный из сердца быка ((90% α :10% β)-Тm).

и мышей при гипертрофии, обусловленной перегрузкой давлением. В экспериментах с искусственной гиперэкспрессией β -цепи тропомиозина до 50–60% в сердцах взрослых крыс и мышей обнаружено увеличение кальциевой чувствительности связи рСа-сила, уменьшение максимальной скорости расслабления и, как следствие, возникновение диастолической дисфункции [115]. Дальнейшее увеличение экспрессии β -тропомиозина до 75–80% вело к смерти животного вскоре после рождения [114].

Мы использовали изоформы тропомиозина из мышц разных видов животных, содержащих различное соотношение α - и β -цепей (рис. 6). Гомодимер α -цепей тропомиозина (α - α)-Тm был получен из миокарда кролика, а α - β -тропомиозин (90% α : 10% β)-Тm – из сердечной мышцы быка. Для моделирования ситуаций, характерных для ряда сердечных патологий, при которых увеличивается экспрессия β -цепи, тропомиозин с большим содержанием β -цепи был выделен из *m. psoas* кролика (60% α : 40% β)-Тm.

Мы обнаружили, что тропомиозин с разным содержанием α - и β -цепей по-разному влияет на скорость движения актин-тропомиозиновых филаментов [116]. Тропомиозин с большим содержанием β -цепи ингибирует скорость скольжения актин-тропомиозиновых филаментов по обеим изоформам сердечного миозина. Точный механизм такого эффекта неизвестен, но можно предложить ряд гипотез, основанных на данных литературы. В работах с дрожжевым [117] и скелетным [118] актином было обнаружено, что разные изоформы тропомиозина связываются с различными участками F-актина, и что для связывания с актином имеет значение не длина молекулы тропомиозина, а её аминокислотная последовательность.

Кроме аминокислотной последовательности тропомиозина на регуляцию актин-тропомиозинового филамента влияет аминокислотная последовательность актин-связывающего домена миозина. Согласно работе Ajtai с коллегами [119], важную роль во взаимодействии миозина с актином играет С-петля миозина. Меняя нативную последовательность С-петли в гладкомышечном миозине на последовательность сердечного и скелетного миозина, авторы показали, что такие химерные миозины по-разному взаимодействуют с актин-тропомиозином филаментом.

Мы исследовали роль β -цепи тропомиозина в кальциевой активации, для чего были зарегистрированы зависимости рСа-скорость тонких филаментов, содержащих тропомиозины с разным содержанием α - и β -цепей. Коэффициенты кооперативности Хилла зависимости рСа-скорость достоверно не различались для всех комбинаций изоформ миозина с изоформами тропомиозина [120]. Кальциевая чувствительность связи рСа-скорость изоформы V1 не зависела от содержания β -цепи тропомиозина, а изоформы V3 увеличивалась с ростом доли β -цепи в тропомиозине [120].

Из наших данных следует, что для взаимодействия сердечного миозина с актин-тропомиозиновым филаментом имеет значение изоформный состав как миозина, так и тропомиозина. Иными словами, в сердечной мышце существует взаимное влияние миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие. Обоюдное влияние изоформ миозина и тропомиозина в сердечной мышце может играть важную роль в поддержании ее эффективной работы в процессе онтогенеза и при патологических состояниях.

Известно, что экспрессия изоформ сердечного миозина зависит от вида животного, его возраста и гормонального статуса [121]. Так, при гипертиреозе происходит увеличение экспрессии изоформы V1. При гипотиреозе, а также при патологиях сердца, вызванных перегрузкой давлением при искусственном или естественном стенозе аорты или митрального клапана, происходит увеличение экспрессии изоформы V3 [122]. Преимущественная экспрессия гена, кодирующего медленную β -цепь миозина, ведёт к уменьшению максимальной скорости сокращения сердечной мышцы и оказывает отрицательный инотропный эффект. Преимущественная экспрессия миозина V3 с низкой АТФазной активностью при хронической перегрузке сердца является механизмом экономии энергии, способствующим адаптации сердечной мышцы к изменению условий её функционирования [34, 122]. Наши исследования связей рСа-сила показали, что изомиозин V3 обладает более высокой кальциевой чувствительностью по сравнению с изомиозином V1, а значит активация тонкого филамента в

случае изомиозина V3 происходит при более низкой концентрации кальция. В условиях сердечной недостаточности это может являться еще одним механизмом адаптации сердечной мышцы.

Известно, что при гипертрофии сердца меняется экспрессия изоформ не только миозина, но и тропомиозина [7]. Результаты наших исследований показывают, что наибольшая кальциевая чувствительность связи pCa-скорость достигается в сочетании изоформы миозина V3 с тропомиозином с высоким содержанием β -цепи. В этом проявляется компенсаторная роль увеличения доли β -цепи тропомиозина.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание функционирования сердечной мышцы, его нарушений при патологиях и выработка методов коррекции невозможны без знания молекулярных механизмов, лежащих в его основе. Такие фундаментальные зависимости как pCa-скорость, pCa-сила и сила-скорость, характеризующие функциональное состояние мышцы, определяются свойствами сократительных и регуляторных белков саркомера. Современные методы биологии, такие как оптическая ловушка и искусственная подвижная система, позволяют исследовать свойства изолированных молекул миозина, в частности, их механические и кинетические характеристики, а также механизмы регуляции их взаимодействия с актином, особенно актуальные для работы сердечной мышцы. Оптическая ловушка позволяет охарактеризовать свойства одиночных молекул изоформ миозина, а с помощью искусственной подвижной системы можно оценивать их поведение в ансамбле и эффекты, вызываемые регуляторными белками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A., Hale, P. (1977) Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **10**, 1053–1076.
2. Vandekerckhove, J., Bugaisky, G., Buckingham, M. (1986) Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1838–1843.
3. Perry, S.V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function (2001) *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **22**, 5–49.
4. Karam, C.N., Warren, C.M., Rajan, S., de Tombe, P.P., Wieczorek, D.F., Solaro, R.J. (2011) Expression of tropomyosin- κ induces dilated cardiomyopathy and depresses cardiac myofibrillar tension by mechanisms involving cross-bridge dependent activation and altered tropomyosin phosphorylation. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **31**, 315–22.

5. Rajan, S., Jagatheesan, G., Karam, C.N., Alves, M.L., Bodi, I., Schwartz, A., Bulcao, C.F., D'Souza, K.M., Akhter, S.A., Boivin, G.P., Dube, D.K., Petrashevskaya, N., Herr, A.B., Hullin, R., Liggett, S.B., Wolska, B.M., Solaro, R.J., Wieczorek, D.F. (2010) Molecular and functional characterization of a novel cardiac-specific human tropomyosin isoform. *Circulation*, **121**, 410–418.
6. Boussouf, S.E., Maytum, R., Jaquet, K., and Geeves, M.A. (2007) Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **28**, 49–58.
7. Izumo, S., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1988) Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 339–343.
8. Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Benaiche, A., Isnard, R., Dubourg, O., Burbani, M., Gueffet, J.P., Mil-laire, A., Desnos, M., Schwartz, K., Hainque, B., Komajda, M. (2003) EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*, **107**, 2227–2232.
9. Rajan, S., Ahmed, R.P., Jagatheesan, G., Petrashevskaya, N., Boivin, G.P., Urboniene, D., Arteaga, G.M., Wolska, B.M., Solaro, R.J., Liggett, S.B., Wieczorek, D.F. (2007) Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ. Res.*, **101**, 205–214.
10. Sheehan, K.A., Arteaga, G.M., Hinken, A.C., Dias, F.A., Ribeiro, C., Wieczorek, D.F., Solaro, R.J., Wolska, B.M. (2011) Functional effects of a tropomyosin mutation linked to FHC contribute to maladaptation during acidosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **50**, 442–450.
11. Konno, T., Chang, S., Seidman, J.G., Seidman, C.E. (2010) Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr. Opin. Cardiol.*, **25**, 205–209.
12. Lowey, C., Cohen, C. (1962) Studies on the structure of myosin. *J. Mol. Biol.*, **4**, 293–307.
13. Pope, B., Hoh, J.F.Y., Weeds, A. (1980) The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Lett.*, **118**, 205–208.
14. Narolska, N.A., Eiras, S., van Loon, R.B., Boontje, N.M., Zaremba, R.S., Berg, S.R., Stooker, W., Huybregts, M.A., Visser, F.C., van der Velden, J., Stienen, G.J. (2005) Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **26**, 39–48.
15. Chizzonite, R.A., Everett, A.W., Prior, G., Zak, R. (1984) Comparison of myosin heavy chains in atria and ventricles from hyperthyroid, hypothyroid, and euthyroid rabbits. *J. Biol. Chem.*, **259**, 15564–15571.
16. Alpert, N.R., Brosseau, C., Federico, A., Krenz, M., Robbins, J., Warshaw, D.M. (2002) Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, 1446–1454.
17. Krenz, M., Sanbe, A., Bouyer-Dalloz, F., Gulick, J., Kleivitsky, R., Hewett, T. E., Osinska, H. E., Lorenz, J. N., Brosseau, C., Federico, Alpert, N.R., Warshaw, D.M., Perryman, M.B., Helmke, S.M., Robbins, J. (2003) Analysis of Myosin Heavy Chain Functionality in the Heart. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17466–17474.
18. Krenz, M., Sadayappan, S., Osinska, H.E., Henry, J.A., Beck, S., Warshaw D.M., Robbins J. (2007) Distribution and Structure-Function Relationship

- of Myosin Heavy Chain Isoforms in the Adult Mouse Heart. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24057–24064.
19. Schmitt, J.P., Debold, E.P., Ahmad, F., Armstrong, A., Frederico, A., Conner, D.A., Mende, U., Lohse, M.J., Warshaw, D., Seidman, C.E., Seidman, J.G. (2006) Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 14525–14530.
 20. Tyska, M.J., Hayes, E., Giewat, M., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Warshaw, D.M. (2000) Single-Molecule Mechanics of R403Q Cardiac Myosin Isolated From the Mouse Model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ. Res.*, **86**, 737–744.
 21. Banerjee, S.K., Kabbas E.G., Morkin E. (1977) Enzymatic properties of the heavy meromyosin subfragment of cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits. *J. Biol. Chem.*, **252**, 6925–6929.
 22. VanBuren, P., Harris, D.E., Norman, R.A., Warshaw, D.M. (1995) Cardiac V1 and V3 myosins differ in their hydrolytic and mechanical activities in vitro. *Circ. Res.*, **77**, 439–444.
 23. Malmqvist, U.P., Aronsham, A., Lowey, S. (2004) Cardiac myosin isoforms from different species have unique enzymatic and mechanical properties. *Biochemistry*, **43**, 15058–15065.
 24. Litten, R.Z., Martin, B.J., Low, R.B., Alpert, N.R. (1982) Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. *Circ. Res.*, **50**, 856–864.
 25. Yamashita, H., Sugiura, S., Serizawa, T., Sugimoto, T., Iizuka, M., Katayama, E., Shimmen, T. (1992) Sliding velocity of isolated rabbit cardiac myosin correlates with isozyme distribution. *Am. J. Physiol.*, **263**, 464–472.
 26. Banerjee, S.K., Morkin E. (1977) Actin-activated adenosine triphosphatase activity of native and N-ethylmaleimide-modified cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits. *Circ. Res.*, **41**, 630–634.
 27. Barany, M. (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, **50**, 197.
 28. Maughan, D., Low, E., Litten, R., Brayden, J., Alpert N. (1979) Calcium-activated muscle from hypertrophied rabbit hearts. Mechanical and correlated biochemical changes. *Circ. Res.*, **44**, 279–287.
 29. Schwartz, K., Lecarpentier, Y., Martin, J.L., Lompre, A.M., Mercadier, J.J., Swynghedauw, B. (1981) Myosin isozymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **13**, 1071–1075.
 30. Pagani, E.D., Julian, F.J. (1984) Rabbit papillary muscle myosin isozymes and the velocity of muscle shortening. *Circ. Res.*, **54**, 586–594.
 31. Saeki, Y. (1995) Crossbridge dynamics under various inotropic states in cardiac muscle: evaluation by perturbation analysis. *Jpn. J. Physiol.*, **45**, 687–705.
 32. Stehle, M., Kruger, P., Scherer, K., Brixius, R.H., Schwinger, G. Pfitzer (2002) Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mouse, guinea pig, and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level. *Basic Res. Cardiol.*, **97**, 127–135.
 33. Fitzsimons, D.P., Patel, J.R., Moss, R.L. (1999) Aging dependent depression in the kinetics of force development in rat skinned myocardium. *Am. J. Physiol.*, **276**, 1511–1519.
 34. Alpert, N.R. Mulieri, L.A., Hasenfuss, G. (1991) The heart and cardiovascular system. New York: Raven Press. 111–128.

35. Gordon, A.M., Homsher, E., Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.*, **80**, 853–924.
36. Gordon, A.M., Regnier, M., Homsher, E. (2001) Skeletal and cardiac muscle contractile activation: troponin «rocks and rolls». *News Physiol. Sci.*, **16**, 49–55.
37. McKillop, D.F., Geeves, M.A. (1993) Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.*, **65**, 693–701.
38. Pirani, A., Vinogradova, M.V., Curmi, P.M.G., King, W.A., Fletterick, R.J., Craig, R., Tobacman, L.S., Xu, C., Hatch, V., Lehman, W. (2006) An Atomic Model of the Thin Filament in the Relaxed and Ca²⁺-Activated States. *J. Mol. Biol.*, **357**, 707–717.
39. Donaldson, S.K., Kerrick, W.G. (1975) Characterization of the effects of Mg²⁺ on Ca²⁺ and Sr²⁺-activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, **66**, 427–444.
40. Grabarek, Z., Grabarek, J., Leavis, P.C., Gergely, J. (1983) Cooperative binding to the Ca-specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14098–14102.
41. Brandt, P.W., Diamond, M.S., Rutchik, J.S., Schachat, F.H. (1987) Cooperative interactions between troponin-tropomyosin units extend the length of the thin filament in skeletal muscle. *J. Mol. Biol.*, **195**, 885–896.
42. Brandt, P.W., Colomo, F., Piroddi, N., Poggesi, C., Tesi, C. (1998) Force regulation by Ca²⁺ in skinned single cardiac myocytes of frog. *Biophys. J.*, **74**, 1994–2004.
43. Tsaturyan, A.K., Bershitsky, S.Y., Koubassova, N.A., Fernandez, M., Narayanan, T., Ferenczi, M.A. (2011) The fraction of myosin motors that participate in isometric contraction of rabbit muscle fibers at near-physiological temperature. *Biophys. J.*, **101**, 404–410.
44. Linari, M., Caremani, M., Lombardi V. (2007) Stiffness and fraction of myosin motors responsible for active force in permeabilized muscle fibers from rabbit psoas. *Biophys. J.*, **92**, 2476–2490.
45. Linari, M., Dobbie, I., Lombardi V. (1998) The stiffness of skeletal muscle in isometric contraction and rigor: the fraction of myosin heads bound to actin. *Biophys. J.*, **74**, 2459–2473.
46. Wu, S., Liu, J., Taylor, K.A. (2010) Electron tomography of cryofixed, isometrically contracting insect flight muscle reveals novel actin-myosin interactions. *PLoS One*. pii:e12643.
47. Wang, Y., Kerrick, W.G.L. (2002) The off rate of Ca²⁺ from troponin C is regulated by force-generating cross bridges in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **92**, 2409–2418.
48. Turtle, C.W., Korte, F.S., Razumova, M.V., Regnier, M. (2011) Reducing thin filament Ca²⁺ affinity with a cTnC variant (L57Q) reduces force but enhances cross-bridge dependence of cooperative activation in demembrated rat trabeculae. *Biophys. J.*, **100**, 453a–453a.
49. Godt, R.E., Maughan, W.M. (1995) Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit. *Pflug. Arch.*, **391**, 334–337.
50. McDonald, K.S., Moss, R.L. (1995) Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca²⁺ sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ. Res.*, **77**, 199–205.
51. Fuchs F., Wang, Y.P. (1996) Sarcomere length versus interfilament spacing as determinants of cardiac myofilament Ca²⁺ sensitivity and Ca²⁺ binding. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **28**, 1375–1383.

52. Smith, S.H., Fuchs, F. (2002) Length dependence of cardiac myofilament Ca^{2+} sensitivity in the presence of substitute nucleoside triphosphates. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **34**, 547–554.
53. Moss, R.L., Razumova, M., Fitzsimons, D.P. (2004) Myosin cross-bridge activation of cardiac thin filaments: implications for myocardial function in health and disease. *Circ. Res.*, **94**, 1290–1300.
54. Fuchs, F., Martyn, D. (2005) Length-dependent Ca^{2+} activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **26**, 199–212.
55. Izakov, V., Katsnelson, L.B., Blyakhman, F.A., Markhasin, V.S., Shklyar, T.F. (1991) Cooperative effects due to calcium binding by troponin and their consequences for contraction and relaxation of cardiac muscle under various conditions of mechanical loading. *Circ. Res.*, **69**, 1171–1184.
56. Solovyova, O., Katsnelson, L.B., Kononov, P., Lookin, O., Moskvina, A.S., Protsenko, Yu.L., Vikulova, N., Kohl, P., Markhasin, V.S. (2006) Activation sequence as a key factor in spatio-temporal optimization of myocardial function. *Phil. Transact. R. Soc. Lond.*, **364**, 1367–1383.
57. Allen, D.G., Kurihara, S. (1982) The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.*, **327**, 79–94.
58. Lab, M.J. (1982) Contraction-excitation feedback in myocardium. Physiological basis and clinical relevance. *Circ. Res.*, **50**, 757–766.
59. Lab, M.J., Allen, D.G., Orchard, C. (1984) The effects of shortening on myoplasmic calcium concentration and on the action potential in mammalian ventricular muscle. *Circ. Res.*, **55**, 825–829.
60. Vahl, C.F., Timek, T., Bonz, A., Fuchs, H., Dillman, R., Hagl, S. (1998) Length dependence of calcium- and force-transients in normal and failing human myocardium. *J. Mol. Cell.*, **30**, 957–966.
61. Ishikawa, T., Kajiwara, H., Kurihara, S. (1999) Modulation of Ca^{2+} transient decay by tension and Ca^{2+} removal in hyperthyroid myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H289–H299.
62. Wakayama, Y., Miura, M., Sugai, Y., Kagaya, Y., Watanabe, J., ter Keurs, H.E.D.J., Shirato, K. (2001) Stretch and quick release of rat cardiac trabeculae accelerates Ca^{2+} waves and triggered propagated contractions. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **281**, H2133–H2142.
63. Luers, C., Fialka, F., Elgner, A., Zhu, D., Kockskamper, J., von Lewinski, D., Pieske, B. (2005) Stretch-dependent modulation of $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and pH_i in rabbit myocardium – a mechanism for the slow force response. *Cardiovasc. Res.*, **68**, 454–463.
64. Monasky, M.M., Varian, K.D., Davis, J.P., Janssen, P.M.L. (2008) Dissociation of force decline from calcium decline by preload in isolated rabbit myocardium. *Pflug. Arch.*, **456**, 267–276.
65. Ter Keurs, H.E.D.G. (2011) Electromechanical coupling in the cardiac myocyte; stretch-arrhythmia feedback. *Pflug. Arch.*, **462**, 165–175.
66. Ruwhof, C., van Wamel, J.T., Noordzij, L.A., Aydin, S., Harper, J.C., van der Laarse, A. (2001) Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell. Calcium*, **29**, 73–83.
67. Yasuda, S., Sugiura, S., Yamashita, H., Nishimura, S., Saeki, Y., Momomura, S., Katoh, K., Nagai, R., Sugi, H. (2003) Unloaded shortening increases peak of Ca^{2+} transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H470–H475.

68. Sulman, T., Katsnelson, L.B., Solovyova, O., Markhasin, V.S. (2008) Mathematical modeling of mechanically modulated rhythm disturbances in homogeneous and heterogeneous myocardium with attenuated activity of Na⁺-K⁺ pump. *Bulletin of Math. Biol.*, **70**, 910–949.
69. Katsnelson, L.B., Solovyova, O., Balakin, A., Lookin, O., Kononov, P., Protsenko, Yu., Sulman, T., Markhasin, V.S. (2011) Contribution of mechanical factors to arrhythmogenesis in calcium overloaded cardiomyocytes: model predictions and experiments. *Progress in Bioph. Mol. Biol.*, **107**, 81–89.
70. Edman, K.A., Nilsson, P.E. (1972) Relationships between force and velocity of shortening in rabbit papillary muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **85**, 488–500.
71. Metzger, J.M., Wahr, P.A., Michele, D.E., Albayya, F., Westfall, M.V. (1999) Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca²⁺-activated tension development in single adult cardiac myocytes. *Circ. Res.*, **11**, 1310–1317.
72. Fitzsimons, D.P., Patel, J. R., Moss, R. L. (1998) Role of myosin heavy chain composition in kinetics of force development and relaxation in rat myocardium. *J. Physiol.*, **513**, 171–183.
73. Rundell, V.L., Manaves, V., Martin, A.F., de Tombe, P.P. (2005) Impact of beta-myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, 896–903.
74. Ashkin, A., Dziedzic, J.M. (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, **235**, 1517–1520.
75. Finer, J.T., Simmons, R.M., Spudich, J.A. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, **368**, 113–118.
76. Набиев С.Р., Овсянников Д.А., Бершицкий Б.Ю., Бершицкий С.Ю. (2008) Оптическая ловушка как инструмент для исследования моторных белков. *Биофизика*, **53**, 929–935
77. Molloy, J.E., Burns, J.E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R.T., White, D.C.S. (1995) Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*, **378**, 209–212.
78. Takagi, Y., Homsher, E.E., Goldman, Y.E., Shuman, H. (2006) Force generation in single conventional actomyosin complexes under high dynamic load. *Biophys. J.*, **90**, 1295–1307.
79. Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Momomura, S., Chaen, S., Omata, M., Sugi, H. (1998) Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation. *Circ. Res.*, **82**, 1029–1034
80. Palmiter, K.A., Tyska, M.J., Dupius, D.E., Alpert, N.R., Warshaw, D.M. (1999) Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms. *J. Physiol.*, **519**, 669–678.
81. Nabiev, S.R., Schepkin, D.V., Копылова, G.V., Bershitsky, S.Y. (2012) Comparison of the characteristics of the single interactions of rabbit muscle proteins isoforms. *Biological Motility: Fundamental and Applied Science*. Pushchino. 138–140.
82. Никитина Л.В., Копылова Г.В., Щепкин Д.В., Кацнельсон Л.Б. (2008) Исследование взаимодействия сократительных и регуляторных белков миокарда кролика методом искусственных подвижных систем. *Биохимия*, **73**, 219–227.
83. Kron, S.J., Spudich, J.A. (1986) Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass sur-

- face. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6272–6276.
84. Mashanov, G.I., Molloy, J.E. (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells. *Biophys. J.*, **92**, 2199–2211.
85. Sugiura, S., Yamashita, H., Sata, M., Momomura, S., Serizawa, T., Oiwa, K., Chaen, S., Shimmen, T., Sugi, H. (1995) Force-velocity relations of rat cardiac myosin isozymes sliding on algal cell actin cables in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 69–75.
86. Bing, W., Knott, A., Marston, S. (2000) A simple method for measuring the relative force exerted by myosin on actin filaments in the in vitro motility assay: evidence that tropomyosin and troponin increase force in single thin filaments. *Biochem. J.*, **350**, 693–699.
87. Haeberle, J.R., Hemric, M.E. (1995) Are actin filaments moving under unloaded conditions in the in vitro motility assay? *Biophys. J.*, **68**, 306–310.
88. VanBuren, P., Alix, S.L., Gorga, J.A., Begin, K.J., LeWinter, M.M., Alpert, N.R. (2002) Cardiac troponin T isoforms demonstrate similar effects on mechanical performance in a regulated contractile system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **282**, 1665–1671.
89. Никитина Л.В., Копылова Г.В., Щепкин Д.В., Кацнельсон Л.Б. (2008) Оценка механической активности сердечных изомиозинов V1 и V3 методом искусственных подвижных систем с регулируемой тонкой нитью. *Биофизика*, **53**, 956–962.
90. Копылова Г.В., Кацнельсон Л.Б., Овсянников Д.А., Бершицкий С.Ю., Никитина Л.В. (2006) Применение метода *in vitro* подвижных систем для исследования кальций-механической связи в скелетной и сердечной мышцах. *Биофизика*, **51**, 781–785.
91. Gordon, A.M., LaMadrid, M.A., Chen, Y., Luo, Z., Chase, P.B. (1997) Calcium regulation of skeletal muscle thin filament motility in vitro. *Biophys. J.*, **72**, 1295–1307.
92. Homsher, E., Kim, B., Bobkova, A., Tobacman, L.S. (1996) Calcium regulation of thin filament movement in an *in vitro* motility assay. *Biophys. J.*, **70**, 1881–1892.
93. Honda, H., Asakura, S. (1989) Calcium-triggered movement of regulated actin *in vitro*. A fluorescence microscopy study. *J. Mol. Biol.*, **205**, 677–683.
94. Dyer, E.C., Jacques, A.M., Hoskins, A.C., Ward, D.G., Gallon, C.E., Messer, A.E., Kaski, J.P., Burch, M., Kentish, J.C., Marston, S.B. (2009) Functional analysis of a unique troponin c mutation, GLY159ASP, that causes familial dilated cardiomyopathy, studied in explanted heart muscle. *Circ. Heart Fail.*, **2**, 456–64.
95. Song, W., Dyer, E., Stuckey, D., Leung, M.C., Memo, M., Mansfield, C., Ferenczi, M., Liu, K., Redwood, C., Nowak, K., Harding, S., Clarke, K., Wells, D., Marston, S. (2010) Investigation of a transgenic mouse model of familial dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **49**, 380–389.
96. Funatsu, T., Anazawa, T., Ishiwata S. (1994) Structural and functional reconstitution of thin filaments in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **15**, 158–171.
97. Fujita, H., Yasuda, K., Niitsu, S., Funatsu, T., Ishiwata, S. (1996) Structural and functional reconstitution of thin filaments in the contractile apparatus of cardiac muscle. *Biophys. J.*, **71**, 2307–2318.
98. Sata, M., Yamashita, H., Sugiura, S., Fujita, H., Momomura, S., Serizawa, T. (1995) A new in vitro motility assay technique to evaluate

- calcium sensitivity of the cardiac contractile proteins. *Pflugers Arch.*, **429**, 443–445.
99. Shaffer, J.F., Razumova, M.V., Tu, An-Yue, Regnier, M., Harris, S.P. (2007) Myosin S2 is not required for effects of myosin binding protein-C on motility. *FEBS Lett.*, **581**, 1501–1504.
100. Shchepkin, D.V., Kopylova, G.V., Nikitina, L.V., Katsnelson, L.B., Bershitsky, S.Y. (2010) Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an *in vitro* motility assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**, 159–163.
101. Sugiura, S., Yamashita, H. (1998) Functional characterization of cardiac myosin isoforms. *J. Physiol. (Japanese)*, **48**, 173–179.
102. Fraser, I.D., Marston, S.B. (1995) *In vitro* motility analysis of actin-tropomyosin regulation by troponin and calcium. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7836–7841.
103. Lu, X., Tobacman, L.S., Kawai, M. (2006) Temperature-dependence of isometric tension and cross-bridge kinetics of cardiac muscle fibers reconstituted with a tropomyosin internal deletion mutant. *Biophys. J.*, **91**, 4230–4240.
104. Landis, C., Back, N., Homsher, E., Tobacman, L. S. (1999) Effects of tropomyosin internal deletions on thin filament function. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1279–31285.
105. Matyushenko, A.M., Artemova, N.V., Shchepkin, D.V., Kopylova, G.V., Bershitsky, S.Y., Tsaturyan, A.K., Sluchanko, N.N., Levitsky, D.I. (2014) Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule. *FEBS J.*, **281**, 2004–2016.
106. Щепкин Д.В., Матюшенко А.М., Копылова Г.В., Артемова Н.В., Бершицкий С.Ю., Цатурян А.К., Левицкий Д.И. (2013) Стабилизация центральной части тропомиозина изменяет чувствительность актин-миозинового взаимодействия к ионам кальция. *Acta Naturae*, **5**, С. 54–57.
107. Noguchi, T., Camp, P. Jr., Alix, S.L., Gorga J.A., Begin, K.J., Leavitt, B.J., Ittleman, F.P., Alpert, N.R., LeWinter, M.M., Van'Buren, P. (2003) Myosin from failing and non-failing human ventricles exhibit similar contractile properties. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **35**, 91–97.
108. Bottinelli, R., Coviello, D.A., Redwood, C.S., Pellegrino, M.A., Maron, B.J., Spirito, P., Watkins, H., Reggiani, C. (1998) A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed *in vivo* and associated with an increased calcium sensitivity. *Circ. Res.*, **82**, 106–115.
109. De Clerck, N.M., Claes, V.A., Brutsaert, D.L. (1977) Force-velocity relations of single cardiac muscle cells: calcium dependency. *J. Gen. Physiol.*, **69**, 221–241.
110. Katsnelson, L.B., Markhasin, V.S., Nikitina, L.V., Ryvkin, M.V. (1997) Analysis of force-velocity relationship in cardiac muscle by means of mathematical modeling. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **8**, 228.
111. Hill A.V. (1938) The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. R. Soc. London.*, **126**, 136–195.
112. Hennekes, R., Kaufmann, R., Steiner, R. (1978) Why does the cardiac force-velocity relationship not follow a Hill hyperbola? Possible implications of feedback loops involved in cardiac excitation-contraction coupling. *Basic. Res. Cardiol.*, **73**, 47–67.

113. Katsnelson, L.B., Nikitina, L.V., Chemla, D., Solovyova, O.E., Coirault, C., Lecarpentier, Y., Markhasin, V.S. (2004) Influence of viscosity on myocardium mechanical activity: A mathematical model. *J. Theor. Biol.*, **230**, 385–405.
114. Muthuchamy, M., Boivin, G.P., Grupp, I.L., Wieczorek, D.F. (1998) Beta-tropomyosin overexpression induces severe cardiac abnormalities. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **30**, 1545–1557.
115. Muthuchamy, M., Grupp, I.L., Grupp, G., O'Toole, B.A., Kier, A.B., Boivin, G.P., Neumann, J., Wieczorek, D.F. (1995) Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart. *J. Biol. Chem.*, **270**, 30593–30603.
116. Shchepkin, D.V., Kopylova, G.V., Nikitina, L.V. (2011) Study of reciprocal effects of cardiac myosin and tropomyosin isoforms on actin-myosin interaction with *in vitro* motility assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **415**, 104–108.
117. Chen, W., Wen, K.K., Sens, A.E., Rubenstein, P.A. (2006) Differential interaction of cardiac, skeletal muscle, and yeast tropomyosins with fluorescent (pyrene235) yeast actin. *Biophys. J.*, **90**, 1308–1318.
118. Sliwinska, M., Zukowska, M., Borys, D., Moraczewska, J. (2011) Different positions of tropomyosin isoforms on actin filament are determined by specific sequences of end-to-end overlaps. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **68**, 300–312.
119. Ajtai, K., Halstead, M.F., Nyitrai, M., Penheiter, A.R., Zheng, Y., Burghardt, T.P. (2009) The myosin C-loop is an allosteric actin contact sensor in actomyosin. *Biochemistry*, **48**, 5263–5275.
120. Nikitina, L.V., Shchepkin, D.V., Kopylova, G.V. (2014) Study of effects of tropomyosin isoforms on the regulation of actin-myosin interaction in myocardium with *in vitro* motility assay. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.*, **35**, 147.
121. Lompre, A.M., Schwartz, K., d'Albis, A., Lacombe, G., van Thiem, N., Swynghedauw, B. (1979) Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature*, **282**, 105–107.
122. Katz, A.M. (2001) Physiology of the heart. Lippincott: Williams & Wilkins, 718 p.