

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ТРОПОМОДУЛИНА — БЕЛКА, РЕГУЛИРУЮЩЕГО ДЛИНУ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ

© 2002 г.

А. С. КОСТЮКОВА

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Фрагменты тропомодулина, использованные для исследования его структуры. III. Белки, связывающиеся с тропомодулином. IV. Форма тропомодулина и его доменная организация. V. Атомная модель C-концевого домена. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Актиновые филаменты играют важную роль в ряде таких биологических функций как мышечное сокращение, организация цитоскелета, транспортировка органелл (см. обзоры [8, 10, 40]). Сеть коротких актиновых филаментов поддерживает мембраны клеток, сшитые в пучки филаменты являются рецепторами звука в стереоцилиях. Актиновые филаменты полярны, тупой (быстро растущий) и острый (медленно растущий) концы отличаются как по структуре, так и по динамическим свойствам. В мышцах быстро растущие концы актиновых филаментов обращены к Z-линии [4]. Длина актиновых филаментов постоянна в саркомерах поперечно-полосатых мышц, в каркасе, подстилающем мембраны эритроцитов, в стереоцилиях внутреннего уха и микроворсинках кишечных эпителиальных клеток. Так, например, короткие актиновые филаменты эритроцитов имеют длину 33 ± 5 нм [32], тогда как филаменты в саркомерах скелетных мышц — $1,1 \pm 0,025$ мкм [33]. Функции актина, зависящие от динамического равновесия между мономерами и полимерами, очень чувствительны к концентрации свободных мономеров. Для того, чтобы поддерживать определенную длину филаментов в каждой ткани, существуют механизмы, включающие в себя определение длины актинового филамента и его кэпирование как на быстро, так и на

медленно растущем концах, что препятствует спонтанной сборке/разборке филаментов. В настоящее время для быстро растущих концов известно несколько кэпирующих белков, таких, например, как гельзолин, профилин и Cap Z, в то время как для медленно растущих концов известен только один – тропомодулин [40].

Тропомодулин был впервые обнаружен в мембранах эритроцитов как тропомиозин-связывающий белок с молекулярной массой около 40000 [9]. Только спустя несколько лет было установлено, что этот белок специфически связывается с медленно растущим концом актиновых филаментов и таким образом меняет его динамические свойства [13, 41]. Кэпирование тропомодулином — процесс динамический, *in vivo* как мономеры актина, так и сам тропомодулин могут обмениваться со свободными молекулами. Тропомодулин широко распространен в животных клетках и в настоящее время известны четыре изоформы тропомодулина [1, 3, 39]. Эритроцитарный E (erythrocyte)-тип в основном находится в эритроцитах, в сердце и медленных скелетных мышцах. Скелетный Sk (skeletal)-тип превалирует в быстрых скелетных мышцах, замещая E-тип в процессе развития. Нейронный N (neuron)-тип был обнаружен в мозгах. Помимо этого обнаружен так называемый повсеместный U (ubiquitous)-тип. Аминокислотные составы этих изоформ имеют около 60–65 % идентичности. Кроме того, существует гомолог тропомодулина (продукт гена *Sanpodo*) у *Drosophila*, отвечающий за асимметричное деление клеток [7], и недавно обнаружены два более крупных родственных белка (около 64 кДа), названных лейомодинами [3].

Хотя функциональные свойства тропомодулина были достаточно хорошо изучены, до недавнего времени информация о его структуре ограничивалась немногими противоречивыми данными. Гидродинамические исследования указывали на то, что раствор тропомодулина содержит анизотропные мономеры [9]. Но на электронно-микроскопических фотографиях, полученных методом кругового напыления, молекулы тропомодулина выглядели как глобулярные частицы [11]. Впрочем, ввиду того, что размер этих частиц не соответствовал молекулярному весу тропомодулина, авторы предполагали, что они могут образовываться в результате ассоциации мономеров.

Информация об атомной структуре тропомодулина позволила бы прояснить механизм его функционирования, однако многочисленные попытки закристаллизовать тропомодулин оказались безуспешными. Во всех случаях, где не происходила агрегация, наблюдалось так называемое «вымасливание», что часто указывает на наличие в белке подвижных участков. Чтобы узнать, каковы структурные свойства тропомодулина, мы решили использовать другие методы исследования

структуры белков, такие как ограниченный протеолиз, круговой дихроизм (КД), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и малоугловое рентгеновское рассеивание.

II. ФРАГМЕНТЫ ТРОПОМОДУЛИНА, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕГО СТРУКТУРЫ

Все структурные исследования тропомодулина в наших работах были выполнены на фрагментах тропомодулина Е-типа из *Gallus gallus* (рис. 1). При экспрессии целого белка препарат получался гетерогенным, по-видимому, из-за гидролиза С-концевого участка тропомодулина в процессе его выделения и очистки [17]. Поэтому, чтобы избежать гетерогенности, 15 С-концевых остатков были удалены, что не должно было существенно повлиять на основные функции тропомодулина, так как в других изоформах этот участок отсутствует. Возможно, эти С-концевые остатки ответственны за какие-то специфические функции Е-тропомодулина. Два фрагмента были экспрессированы в клетках *Escherichia coli BL21(DE3)plysE* с использованием сконструированного нами вектора *pET(His)Tmod(N39)*: Tmod (N39) с делецией 15 аминокислот на С-конце аутентичной молекулы (остатки с 1 по 344) и N-концевой фрагмент N11 (остатки с 1 по 91). Оба фрагмента содержали дополнительные метионин и 6 остатков гистидина на N-конце.

Для изучения доменной структуры тропомодулина был использован ограниченный протеолиз [17]. Несмотря на различную специфичность протеаз, использованных в наших экспериментах (трипсин, протеаза из *Staphylococcus aureus* V 8, эластаза, химотрипсин и термоллизин), во всех случаях картина протеолиза была очень похожа. В течение нескольких минут половина белка расщеплялась с образованием фрагмента с молекулярным весом около 20 кДа. Этот фрагмент был очень устойчив и мог сохраняться в реакционной смеси до нескольких дней. Для получения такого фрагмента в препаративных количествах была выбрана протеаза из *S. aureus* V 8. После того как молекулярная масса фрагмента была определена с помощью масс-спектропии (20627 Да), а его N-концевые аминокислоты были секвенированы (Gly-Leu-Asn-Ser-Val), удалось установить, что он соответствует С-концевой половине тропомодулина, со 160 по 344 остаток (см. рис. 1), поэтому полученный фрагмент был назван С20. Таким образом, для проведения структурных исследований в нашем распоряжении оказалось три типа рекомбинантных фрагментов тропомодулина - Tmod (N39), N11 и С20.

А

```

001 MSYRKELEKYRDLDEDKILGALTEEEELRKELEEEELDPDNALLPAGLRQDQTQKPRPTG 060
-----NNNNH--NNNNNNNNH-----
061 PFKREELMAHLEQQAQDKDREDLVVFTGEKRGKAWIPKQKMPDPVLESVTLPEPELEEAL 120
-----NNNNNNNNNNH-----H-----
121 ANASDAELCDIAAILGMHTLMSNQYUEALGSSTIVNKEGLNSVIKPTKYKVPVDEEPPNS 180
-----NNNNNNNNH-NH-----
181 TDVEETLKRIQNNDPDLLEEVNLNIMNIPVPTLKACAEALKTNTYVKKFSIVGTRSNDPV 240
-----NNNNNNNNH-----EEEE-----EEEE-----NNH
241 AFALAEMLKVNNTLKSLNVEENFISGSGILALVEALQSNSTSLIELRIDNQSQPLGNNVEM 300
NNNNNNH-----EEEE-----NNNNNNNNNNH-----EEEE-----NNNNH
301 EIANMLEKNTTLLKFGYHFTQQGPRLRASNAMNNNDLVRKRRLAELNGPIFPKCRGTG 359
NNNNH-----EEEE-----NNNNNNNNNNH-----NNH-----

```

Б

Tmod 1—359
Tmod (N39) 1—344
N11 1—91
C20 160—344

Рис. 1. (А) — аминокислотная последовательность E-пропомодулина [17] и соответствующая ей предсказанная вторичная структура [6] (H обозначает α -спираль, E — β -структуру).
 Жирным шрифтом выделен N-концевой участок фрагмента C20.
 (Б) — схема расположения фрагментов (темный участок обозначает His-tag).

III. БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ТРОПОМОДУЛИНОМ

В соответствии с литературными данными тропомодулин взаимодействует с тремя белками, расположенными на медленно растущем конце актиновых филаментов: тропомиозином, актином и небулином. Тропомиозин — вытянутый α -спиральный белок, состоящий из двух полипептидов, образующих coiled coil [36]. Молекулы тропомиозина лежат вдоль актинового филамента, образуя единую нить за счет взаимодействия N-конца одной молекулы с C-концом следующей молекулы, при этом N-конец тропомиозиновых молекул обращен к медленно растущему концу филамента. Предполагается, что тропомодулин взаимодействует с N-концевыми остатками тропомиозина (с 7 по 14) [38] и сайт связывания с тропомиозином находится в N-концевой части тропомодулина [34, 35].

Вывод о том, что тропомодулин связывается с актином, был основан на его способности ингибировать полимеризацию актина как в присутствии, так и в отсутствие тропомиозина [41], но непосредственно связывание не детектировалось. Аффинность тропомодулина к медленно растущему концу актинового филамента в отсутствие тропомиозина невелика ($K_d \sim 0,3-0,4 \mu\text{M}$), в то время как в его присутствии повышается во много раз ($K_d \sim 50 \text{pM}$) [42]. Моноклональные антитела, полученные к C-концевой части тропомодулина, не влияли на его способность связываться с тропомиозином, однако они ингибировали его кэпирующую активность в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [14]. На основании результатов, полученных в этих экспериментах, авторы сделали вывод, что за кэпирование актиновых филаментов отвечает C-концевая часть тропомодулина.

Сравнительно недавно было обнаружено, что тропомодулин связывается с тремя N-концевыми модулями небулина (M1–M2–M3) [25], однако сайт связывания тропомодулина с небулином неизвестен. Небулин обнаружен в скелетных мышцах позвоночных, это гигантский белок с молекулярной массой 800000, вытянутый вдоль основного желоба актиновых филаментов [22, 27], его N-конец также обращен к медленно растущему концу филаментов. Молекула небулина состоит в основном из коротких повторов, которые, скорее всего, образуют α -спираль [27, 28]. Неизвестно, может ли небулин вызывать изменение сродства тропомодулина к медленно растущим концам актиновых филаментов, аналогичное тому, что происходит при добавлении тропомиозина.

Для того чтобы проверить, способны ли полученные нами фрагменты взаимодействовать с тропомиозином, актином и небулином, были проведены эксперименты по связыванию тропомодулина с этими белками [17, 19]. Для этого были использованы два метода — сшивки глутаровым альдегидом комплексов, образующихся в смеси белков с

фрагментами тропомодулина, и инкубация иммобилизованных на нитроцеллюлозных мембранах белков с биотинилированными фрагментами тропомодулина. Было показано, что фрагменты Tmod (N39) и N11 образуют комплексы с тропомиозином, в то время как фрагмент C20 не образует. C20 связывается с небулином, таким образом, сайт связывания с этим белком должен находиться в С-концевой части молекулы тропомодулина. Было обнаружено взаимодействие Tmod (N39) и C20 с актином, причем для C20 такое взаимодействие было слабее. К нашему удивлению оказалось, что N11 тоже взаимодействует с актином. В качестве возможного объяснения мы предположили, что N-концевая часть молекулы, связывающаяся с тропомиозином, способна также связываться с поверхностью актина, близкой к тропомиозину.

IV. ФОРМА ТРОПОМОДУЛИНА И ЕГО ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ И ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Согласно предсказанию вторичной структуры, сделанному при помощи нескольких программ [5, 6], тропомодулин — α -спиральный белок, N-концевая половина которого содержит несколько α -спиральных участков, в то время как С-концевая половина состоит из чередующихся α -спиралей и β -структур (см. рис. 1). Проведенный с помощью программы MultiCoil [43] анализ тропомодулина показал, что участок с 10 по 50 аминокислоту имеет высокую вероятность формирования тройной coiled coil. Были измерены спектры кругового дихроизма Tmod (N39), C20 и N11 (рис. 2), и вычисленное по ним содержание α -спиралей [24] составило 44 % для Tmod (N39) и 46% для C20 (35% и 40% соответственно по предсказанию). Спектр фрагмента N11 нельзя было использовать для расчетов по той же программе вторичных структур, но судя по форме спектра, структура этого фрагмента представляла собой смесь α -спиралей и неупорядоченного клубка, что совпадает с предсказанием. Исходя из значения молярной эллиптичности на 222 нм, содержание α -спиралей в N11 около 35% (30% согласно предсказанию).

В молекуле E-тропомодулина имеется всего один остаток триптофана (Trp103), расположенный в N-концевой части молекулы. Спектр флуоресценции Tmod (N39), снятый при длине волны возбуждения 295 нм, имел максимум при 350 нм; это означает, что данный остаток триптофана экспонирован в растворе — эффект, обычно наблюдаемый у денатурированных белков или у белков с разупорядоченной третичной структурой. Снятый в ближнем ультрафиолете спектр кругового дихроизма Tmod (N39) также выглядел как спектр денатурированного

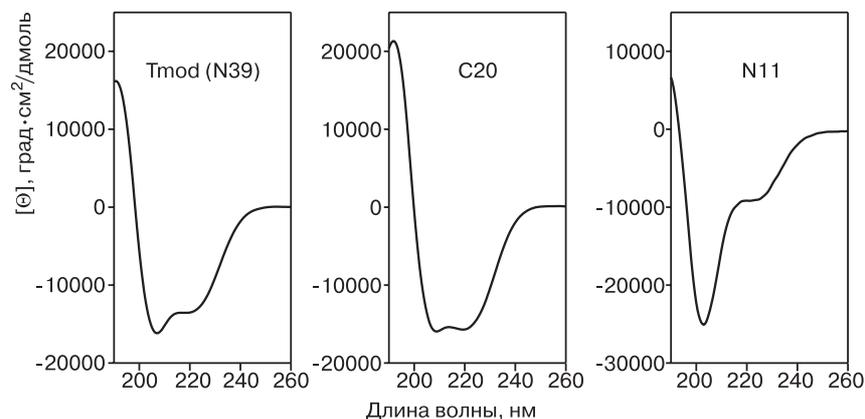


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма для Tmod (N39), фрагмента C20 и фрагмента N11.

белка. Все эти результаты, а также тот факт, что N-концевая часть Tmod (N39), в отличие от С-концевой, неустойчива к действию протеаз с различной специфичностью, позволили предположить, что функционально различные N- и С-концевые участки тропомодулина сильно различаются и по своей структуре. С-концевая часть молекулы должна быть компактной, в то время как N-концевая часть может быть очень вытянута и/или разупорядочена. Чтобы проверить эти предположения, были использованы два других структурных метода — малоугловое рентгеновское рассеивание и дифференциальная сканирующая калориметрия.

МАЛОУГЛОВОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЙВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ

Исследование Tmod (N39) и C20 методом малоуглового рентгеновского рассеивания подтвердило, что Tmod (N39) представляет собой удлинённую молекулу [12]. Радиус инерции этой молекулы (38,09 Å) слишком велик для белка с таким молекулярным весом, в то время как C20 должен быть более глобулярным, поскольку его радиус инерции (18,96 Å) близок к таковому значению у глобулярных белков сходного веса. Были построены модели молекул (рис. 3); кривые рассеивания, рассчитанные по этим моделям, совпадали наилучшим образом с экспериментальными кривыми. Предполагается, что молекула Tmod (N39) состоит из двух доменов с размерами 40 Å × 60 Å × 20—30 Å и 50 Å × 50 Å × 20—30 Å, соответственно. Второй домен слегка наклонен (около 40°) относительно оси первого и имеет сходную форму с C20, который выглядит как эллипсоид вращения с длиной 54 Å и шириной

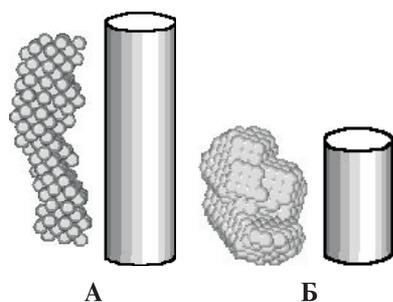


Рис. 3. Модели для Tmod (N39) (А) и фрагмента С20 (Б), полученные с помощью двух различных программ подгонки [12].

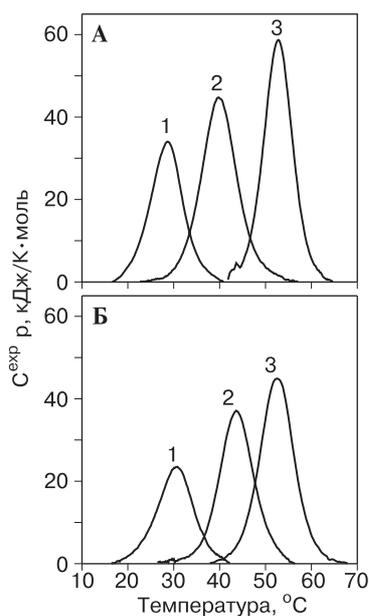


Рис. 4. Температурная зависимость избыточного теплопоглощения для Tmod (N39) (А) и фрагмента С20 (Б), измеренная в 25 мМ глицин–НСl при различных значениях рН: 2,7 (кривая 1); 3,0 (кривая 2); 3,6 (кривая 3).

35 Å. Исходя из этого мы предположили, что первый домен соответствует N-концевой, а второй — С-концевой половине молекулы.

Третичная структура тропомодулина была исследована с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии [18]. Нейтральные значения рН оказались непригодными для этих исследований, так как и Tmod (N39), и С20 необратимо агрегировали в этих условиях и на кривых теплопоглощения не было выявлено кооперативных тепловых переходов. Избежать агрегации можно было путем добавления в растворы образцов мочевины в концентрации от 2,5 до 4,5 М (денатурация мочевиной для обоих фрагментов происходила при одной и той же концентрации 6 М). Однако, хотя фрагменты плавилась обратимо и кооперативно, присутствие мочевины усложняло расчеты термодинамических параметров. Было обнаружено, что при кислых значениях рН в растворе (рН 2,6–3,6), тепловая денатурация Tmod (N39) и С20 полностью обратима и высококооперативна (рис. 4). Обратимость и кооперативность плавления этих образцов также подтвердилась измерением кругового дихроизма при 222 нм, причем плавление вторичной и третичной структуры происходило одновременно. Спектры КД Tmod (N39) и С20 при рН 3 не отличались существенно от таковых при нейтральных значениях рН. Судя по значениям энтальпии, рассчитанным из по-

Рис. 5. Взаимосвязь между энтальпией, Q_d , и температурой перехода, T_d .

Линия 1 представляет собой линейную регрессию для значений Q_d , полученных из кривых теплопоглощения для Tmod (N39) (\blacktriangle) и линия 2 — для фрагмента C20 (\blacktriangledown).

лученных методом ДСК кривых плавления, как Tmod (N39), так и C20 содержали только один кооперативно плавящийся домен. Температура перехода и избыточное теплопоглощение этих образцов уменьшались с понижением pH в растворе. На рис. 5 приведена зависимость избыточного теплопоглощения (Q_d) от температуры перехода. Прямая, проведенная через эти точки и экстраполированная к значению температуры 110 °C, дает значение $Q_d \sim 10$ кал/г для C20, что сравнимо со стандартным значением (12–13 кал/г), экспериментально полученным для маленьких глобулярных белков [31]. Для Tmod (N39) $Q_d \sim 5,5$ кал/г, почти в два раза меньше, чем для C20. Это значит, что в молекуле Tmod (N39), и, следовательно, в молекуле тропомодулина C-концевая часть, соответствующая большей части фрагмента C20 (около 85 %), представляет собой компактный кооперативно плавящийся домен, в то время как N-концевая часть не имеет кооперативно плавящейся третичной структуры. Этот результат дополнительно подтверждался тем фактом, что хотя при повышении температуры содержание α -спиралей во фрагменте N11 уменьшалось, процесс плавления этого фрагмента не являлся кооперативным, и в ДСК экспериментах не наблюдалось никакого пика теплопоглощения (рис. 6).

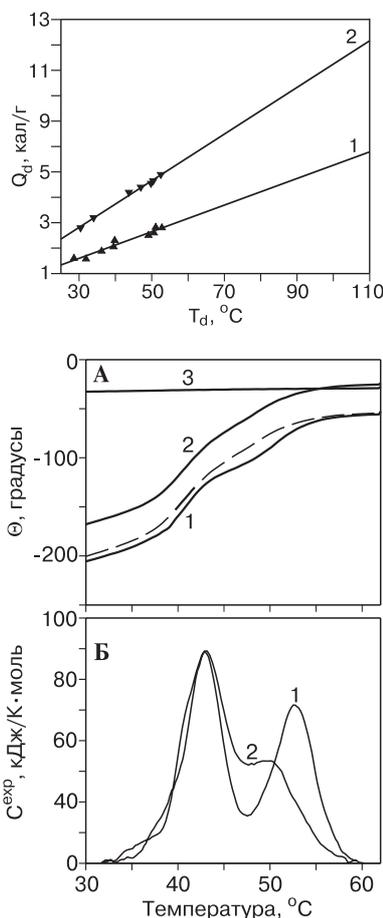


Рис. 6. Влияние связывания фрагмента N11 на тепловую денатурацию тропомиозина.

(А) — температурная зависимость кругового дихроизма, измеренного при 222 нм.

(Б) — температурная зависимость избыточного теплопоглощения.

Кривые, полученные для смеси тропомиозина и фрагмента N11 в молярном соотношении 10 : 1 (1), для тропомиозина (2) и для фрагмента N11 (3). Прерывистая линия представляет собой сумму значений КД для несмешанных тропомиозина и фрагмента N11.

ИЗМЕНЕНИЯ, ПРОИСХОДЯЩИЕ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ТРОПОМИОЗИНОМ

Несмотря на то, что фрагмент N11 не имеет кооперативно плавящейся третичной структуры, его добавление к тропомиозину, выделенному из сердечной мышцы, существенным образом меняло картину плавления последнего (рис. 6). Как известно, плавление тропомиозина многостадийный процесс [29], и при формировании его комплекса с N11 основные изменения происходили в высокотемпературном переходе. Температура этого перехода увеличивалась на 3–4 градуса, избыточная теплота денатурации также увеличивалась с 1290 кДж/моль до 1600 кДж/моль. В процессе формирования комплекса тропомиозина с N11 увеличивалось содержание α -спиралей и, судя по данным ДСК, происходящие структурные изменения приводили к увеличению стабильности этих белков.

Сайт связывания с тропомодулином картирован на тропомиозине в районе остатков 7–14 [38]. Ранее было показано, что первые 11 N-концевых остатков не образуют третичной структуры в растворе [29]. Мы предполагаем, что формирование комплекса тропомодулина с тропомиозином происходит следующим образом. Без взаимодействия N-концевая часть тропомодулина и N-конец тропомиозина не имеют регулярной третичной структуры. В результате связывания происходят существенные конформационные изменения: формируется тройная coiled coil, что приводит к образованию дополнительного кооперативно плавящегося домена, стабилизирующего комплекс.

V. АТОМНАЯ МОДЕЛЬ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Данные, полученные при исследовании тропомодулина вышеперечисленными методами, объяснили причину неудачи попыток его закристаллизовать — наличие в молекуле большого неупорядоченного участка. В связи со структурными особенностями N- и C-концевых половин тропомодулина фрагмент C20 представлялся удобным объектом для кристаллизации. Поскольку было обнаружено, что при нейтральных и щелочных значениях pH как Tmod (N39), так и C20 склонны агрегировать в присутствии солей, а при кислых значениях pH фрагменты стабильны и не агрегируют, буфер с pH 3,0 был выбран как исходный раствор для поиска условий кристаллизации [20]. Мы предположили, что C20 (как и тропомодулин) связывает катионы при нейтральных и щелочных значениях pH, что и приводит к агрегации.

При понижении рН до 3 катионы диссоциировали с белка и удалялись в процессе диализа. Далее, добавление полиэтиленгликоля в качестве осадителя, соли цинка и буфера, поднимающего рН раствора до значения, близкого к изоточке С20 ($pI = 6,8$), приводило к быстрому росту кристаллов. В течение нескольких дней в таких условиях вырастали кристаллы до 1 мм длиной. Мы предположили, что увеличение значения рН в растворе позволяло фрагменту С20 связывать катионы цинка в сайтах, критических для кристаллизации. Поэтому цинк был использован как тяжелый металл для расчета фаз структурных факторов белка методом многоволновой аномальной дисперсии (МАД). Атомная модель молекулы С20 была построена и уточнена при разрешении 1,45 Å [19].

СТРУКТУРА С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА

После определения атомной структуры стало очевидно, что молекулы С20 в кристаллах соединяются через катион цинка, при этом катион оказывается координированным двумя молекулами: Asp 288 и His 318 одной молекулы, Asp 194 и Asp 196 другой (рис. 7 Б). Оба сайта связывания расположены в местах, которые могут быть важны для функционирования белка. Хотя почти все актин-связывающие белки регулируются катионами, до сих пор не было обнаружено подобной регуляции для тропомодулина. Столь специфичные сайты связывания металлов, обнаруженные в тропомодулине, могут означать их возможную физиологическую роль.

Первые 19 аминокислотных остатков фрагмента С20 (Gly160–Pro178) не имеют четкой электронной плотности и, скорее всего, разупорядочены. Мы полагаем, что они являются частью связующей перемычки между двумя функциональными доменами тропомодулина. Атомная структура С20 представляет собой правозакрученную суперспираль из чередующихся α -спиралей и β -структур, оси спиралей слегка наклонены к β -структурной стороне (рис. 7 А). Это структура, типичная для LRR (leucine rich repeat) белков [15]. И действительно, С-концевой фрагмент содержит четыре характерных для таких белков повтора аминокислотной последовательности $a\alpha LxxNxx\alpha\alpha\alpha\alpha$, где L и N — консервативные Leu и Asn, a — Leu, Val, Ala, Ile, Phe или Met, α — любой другой остаток (рис. 8). Расстояние между повторами составляет 28—29 остатков. Несмотря на сходство структурных повторов фрагмента аминокислотная последовательность и укладка первого повтора сильно отличаются от других. Консервативные остатки аспарагина находятся в начале $\alpha\beta$ -петель повторов 2—5. Эти остатки образуют водородные связи как с расположенными рядом петлями,

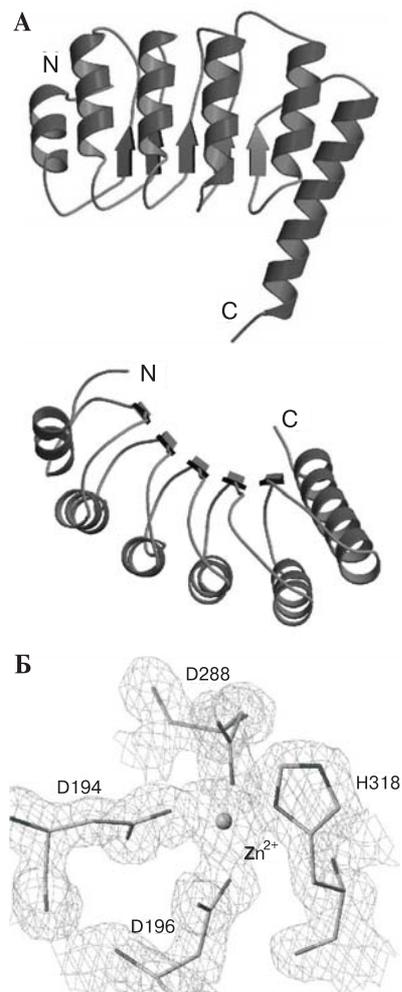


Рис. 7. (А) — ленточная диаграмма атомной модели С-концевой половины тропомодулина (фрагмента С20) (вид с двух позиций).

(Б) — участок карты электронной плотности вокруг Zn^{2+} , координированного в кристалле между двумя соседними молекулами С20.

так и с основной цепью внутри того же повтора, что образует так называемую аспарагиновую лесенку [16]. С20 — первый LRR домен с аспарагиновой лесенкой в $\alpha\beta$ -петлях, в остальных известных LRR белках консервативный аспарагин расположен в $\beta\alpha$ -петлях.

Молекула С20 имеет форму подковы. Ее внутренняя сторона декорирована 5 короткими экспонированными β -структурами: Glu199–Asn201, Lys228–Ser230, Ser256–Asn258, Glu284–Arg286 и Lys314–Gly316. Наружная сторона представлена короткой N-концевой α -спиралью (Val183–Gln191) и четырьмя LRR α -спиралями (Val210–Thr222, Asp238–Val250, Gly266–Ser278, Asn296–Glu307). В этих α -спиралях консервативны только остатки, ответственные за стабилизацию структуры, в то время как остатки, экспонированные в раствор, не консервативны. С-концевая α -спираль ($\alpha 6$) существенно отличается от остальных по длине (21 остаток от Gln 322 до Arg 342, в то время как в остальных α -спиралях по 9–13 остатков) и положению. Она отклонена от оси, общей для остальных α -спиралей, в сторону β -структурной стороны (рис. 7А). Эта спираль, видимо, присутствует во всех изоформах тропомодулина.

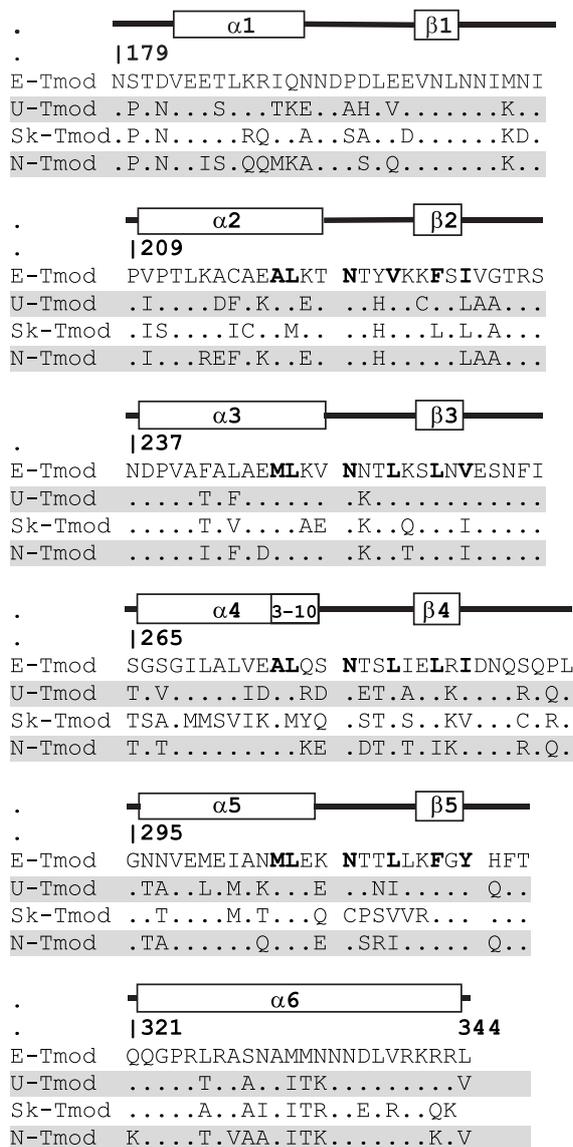


Рис. 8. Вторичная структура и сравнение аминокислотных последовательностей, соответствующих фрагменту C20 в различных изоформах тропомодулина (показаны только аминокислоты 179–344, имеющие электронную плотность): E-Tmod (название гена TMOD1) [17]; U-Tmod (TMOD3) [3]; Sk-Tmod (TMOD4) [1]; N-Tmod (TMOD2) [39]. Жирным шрифтом выделены характерные для LRR белков повторы аминокислотной последовательности axaLxxNxxаххаха.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До недавнего времени в литературе было описано два возможных способа связывания тропомодулина с тропомиозином на медленно растущих концах актиновых филаментов. Согласно одной модели тропомодулин — это глобулярный белок, присоединяющийся к тропомиозину коротким гибким N-концевым участком [11]. По другой модели тропомодулин — глобулярный белок, связывающийся тропомиозин по подобию желоба, который формируется N-концевой частью [38]. В обеих моделях большая часть тропомодулина глобулярна. Каким образом происходит кэпирование — непонятно.

Типичная для LRR структура, обнаруженная в тропомодулине, позволяет предположить, как происходит кэпирование тропомодулином медленно растущего конца актиновых филаментов. К настоящему времени богатые лейцинами повторы обнаружены в первичной структуре многих белков различного происхождения [2]. Как правило, эти белки имеют сходную структуру и вовлечены в белок — белковые взаимодействия. Из атомных структур комплексов таких белков с лигандами известно, что лиганд связывается с β -структурной частью LRR белка, причем сила взаимодействия может сильно различаться [16, 26, 30]. Основываясь на известных структурах комплексов, наиболее вероятно, что к актину обращена β -структурная часть C-концевого домена тропомодулина. Тот факт, что экспонированные в раствор остатки, образующие β -структуры, консервативны, поддерживает это предположение. Поскольку аффинность тропомодулина к медленно растущим концам актиновых филаментов в отсутствие тропомиозина крайне низка [41], взаимодействие тропомодулина с актином, скорее всего, не является сильным, а стало быть тропомодулин может просто закрывать актин, стерически препятствуя его дальнейшей полимеризации.

Электростатический потенциал на поверхности C20 распределен таким образом, что α -спиральная сторона заряжена в основном отрицательно, в то время как большой участок, включающий β -структурную сторону и $\alpha\beta$ -петли, заряжен положительно. Большая положительно заряженная область на поверхности тропомодулина скорее всего взаимодействует с F-актином, почти вся поверхность которого заряжена отрицательно за исключением гипотетического места связывания тропомиозина. Принимая во внимание тот факт, что одной молекулы тропомодулина достаточно для полной блокировки роста филамента, и тропомодулин конкурирует с мономерным актином на

медленно растущем конце [42], мы предположили, что С20 может имитировать соединение мономерного актина с F-актином. В результате такой стыковки конец спирали $\alpha 6$, на котором расположен кластер из четырех положительно заряженных аминокислот, оказывается в начале основного желоба актинового филамента, внутренняя поверхность которого заряжена отрицательно. Предполагается, что этот желоб является местом связывания небулина [22, 25], и спираль $\alpha 6$, как наиболее удаленная от N-концевого участка связывания тропомиозина, может быть кандидатом для связывания небулина.

Мы предложили новый механизм связывания и кэпирования медленно растущих концов актиновых филаментов (рис. 9). N-концевая

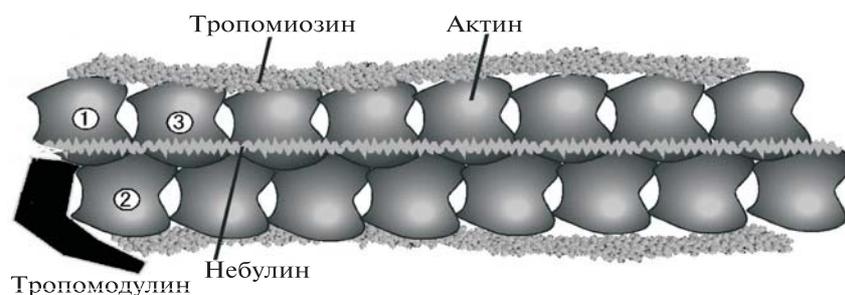


Рис. 9. Модель медленно растущего конца актинового филамента.

часть тропомодулина, вытянутая и подвижная в растворе, взаимодействует с тропомиозином таким образом, что вытягивается вдоль него, приобретая регулярную структуру в процессе формирования комплекса. С-концевая половина выдвигается за пределы тропомиозина и актинового филамента, что подтверждается данными, полученными методом кругового напыления [11]. Во время связывания тропомодулин может изгибаться в участке, связывающем N- и С-половины, что позволяет ему взаимодействовать с небулином. В результате этого связывания тропомодулин оказывается ориентированным на медленно растущем конце актиновых филаментов таким образом, что занимает положение для следующей молекулы актина. Кэпирование, в основном, происходит в результате ограничения доступа мономерного актина.

Таким образом, за счет связывания тропомодулина с тропомиозином и небулином объясняется двойной механизм регулирования длины актиновых филаментов. В целом, длина актинового филамента регулируется случайным образом за счет объема резерва свободного актина, тропомиозина и тропомодулина [23]; в таком случае длина филамента в основном определяется положением молекулы тропомиозина на медленно растущем конце. На поздних стадиях развития скелетных мышц позвоночных включается второй механизм определения длины, зависящий от небулина [21, 37]. Этот механизм не замещает первый, а сосуществует с ним, так что длина филамента может определяться значительно точнее по положению N-конца небулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Almenar-Queralt A., Lee A., Conley C. A., de Pouplana L. R., Fowler V. M. // J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 28466—28475.
2. *Buchanan S. G., Gay N. J. // Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1996. Vol. 65. P. 1—44.
3. *Conley C. A., Fritz-Six K. L., Almenar-Queralt A., Fowler V. M. // Genomics.* 2001. Vol. 73. P. 127—139.
4. *Cooper J. A., Schafer D. A. // Curr. Opin. Cell. Biol.* 2000. Vol. 12. P. 97—103.
5. *Cuff J. A., Barton G. J. // Proteins.* 1999. Vol. 34. P. 508—519.
6. *Cuff J. A., Clamp M. E., Siddiqui A. S., Finlay M., Barton G. J. // Bioinformatics.* 1998. Vol. 14. P. 892—893.
7. *Dye C. A., Lee J. K., Atkinson R. C., Brewster R., Han P. L., Bellen H. J. // Development.* 1998. Vol. 125. P. 1845—1856.
8. *Fowler V. M. // Soc. Gen. Physiol.* 1997. Vol. 52. P. 79—89.
9. *Fowler V. M. // J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 12792—12800.
10. *Fowler V. M. // Curr. Opin. Cell. Biol.* 1996. Vol. 8. P. 86—96.
11. *Fowler V. M. // J. Cell Biol.* 1990. Vol. 111. P. 471—481.
12. *Fujisawa T., Kostyukova A., Maeda Y. // FEBS Lett.* 2001. Vol. 498. P. 67—71.
13. *Gregorio C. C., Fowler V. M. // J. Cell. Biol.* 1995. Vol. 129. P. 683—695.
14. *Gregorio C. C., Weber A., Bondad M., Pennise C. R., Fowler V. M. // Nature.* 1995. Vol. 377. P. 83—86.
15. *Kajava A. V. // J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 277. P. 519—527.
16. *Kobe B., Deisenhofer J. // Mol. Cell. Neurosci.* 1995. Vol. 6. P. 97—105.

17. Kostyukova A., Yamauchi E., Maeda K., Krieger I., Maeda Y. // Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267. P. 6470—6475.
18. Kostyukova A. S., Tiktopulo E. I., Maeda Y. // Biophys. J. 2001. Vol. 81. P. 345—351.
19. Kostyukova A., Krieger I., Fujisawa T., Tiktopulo E. I., Yamashita A., Maeda Y. // International Symposium «Biological motility: new trends in research. August 20—26, 2001.
20. Krieger I., Kostyukova A. S., Maeda Y. // Acta Crystallogr. 2001. Vol. D57. P. 743—744.
21. Labeit S., Gibson T., Lakey A., Leonard K., Zeviani M., Knight P., Wardale J., Trinick J. // FEBS Lett. 1991. Vol. 282. P. 313—316.
22. Labeit S., Kolmerer B. // J. Mol. Biol. 1995. Vol. 248. P. 308—315.
23. Littlefield R., Almenar-Queralt A., Fowler V. M. // Nat. Cell Biol. 2001. Vol. 3. P. 544—551.
24. Manavalan P., Johnson W. C., Jr. // Anal. Biochem. 1987. Vol. 167. P. 76—85.
25. McElhinny A. S., Kolmerer B., Fowler V. M., Labeit S., Gregorio C. C. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 583—592.
26. Papageorgiou A. C., Shapiro R., Acharya K. R. // Embo J. 1997. Vol. 16. P. 5162—5177.
27. Pfuhl M., Winder S. J., Castiglione Morelli M. A., Labeit S., Pastore A. // J. Mol. Biol. 1996. Vol. 257. P. 367—384.
28. Pfuhl M., Winder S. J., Pastore A. // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 1782—1789.
29. Potekhin S. A., Privalov P. L. // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 159. P. 519—535.
30. Price S. R., Evans P. R., Nagai K. // Nature. 1998. Vol. 394. P. 645—650.
31. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. // J. Mol. Biol. 1974. Vol. 86. P. 665—684.
32. Shen B. W., Josephs R., Steck T. L. // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102. P. 997—1006.
33. Sosa H., Popp D., Ouyang G., Huxley H. E. // Biophys. J. 1994. Vol. 67. P. 283—292.
34. Sung L. A., Fowler V. M., Lambert K., Sussman M. A., Karr D., Chien S. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 2616—2621.
35. Sung L. A., Lin J. J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. Vol. 201. P. 627—634.
36. Tobacman L. S. // Annu. Rev. Physiol. 1996. Vol. 58. P. 447—481.
37. Trinick J. // Trends Biochem. Sci. 1994. Vol. 19. P. 405—409.
38. Vera C., Sood A., Gao K. M., Yee L. J., Lin J. J., Sung L. A. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. Vol. 378. P. 16—24.
39. Watakabe A., Kobayashi R., Helfman D. M. // J. Cell Sci. 1996. Vol. 109. P. 2299—2310.
40. Weber A. // Mol. Cell Biochem. 1999. Vol. 190. P. 67—74.
41. Weber A., Pennise C. R., Babcock G. G., Fowler V. M. // 1994. J. Cell Biol. Vol. 127. P. 1627—1635.

42. *Weber A., Pennise C. R., Fowler V. M.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 34637—34645.

43. *Wolf E., Kim P. S., Berger B.* // *Protein Sci.* 1997. Vol. 6. P. 1179—1189.