

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

© 2004 г.

Д. И. ЛЕВИЦКИЙ

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Миозин. III. Актин. IV. Тропомиозин. V. Тропонин.
VI. Кальдесмон и кальпонин. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является самым прямым и наиболее эффективным методом регистрации процесса тепловой денатурации белка [80, 81, 86, 89]. В последнее время этот метод интенсивно применяется многими исследователями для изучения самых разных белков. Структурные перестройки, происходящие в белках при моделировании процессов их функционирования, существенным образом отражаются на тепловой денатурации белка. Вследствие этого применение метода ДСК позволяет в ряде случаев получать очень ценную (и зачастую уникальную) информацию о конформационных изменениях, происходящих в молекуле белка при ее функционировании. Мышечные белки на протяжении

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; S1 – субфрагмент 1 миозина; S2 – субфрагмент 2 миозина; LMM – легкий меромиозин; НММ – тяжелый меромиозин; Тm – тропомиозин; Тn – тропонин; ТnТ – тропонин Т; ТnI – тропонин I; ТnС – тропонин С; V_i – анион ортованадата; BeF_x, AlF₄⁻ – анионы фторидов бериллия и алюминия, соответственно.

Адрес для корреспонденции: levitsky@inbi.ras.ru

Работа поддержана грантами РФФИ № 03-04-48237, Программы поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-813.2003.4, Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН, Welcome Trust Grant № 066115/Z/01/Z и ИНТАС № 03-51-4813.

многих лет были одним из излюбленных объектов для калориметрических исследований. Достаточно сказать, что один из основоположников современной сканирующей калориметрии П.Л.Привалов начал свою научную деятельность именно с изучения методом ДСК тепловой денатурации мышечных белков – стержневой части миозина, тропомиозина, актина и тропонина С [11, 12, 79, 80, 93].

На протяжении последних 15 лет метод ДСК успешно применяется в нашем научном коллективе для структурно-функциональных исследований миозина, актина и тропомиозина – главных белков множества различных систем биологической подвижности, включая все типы мышц. Циклическое взаимодействие головок молекул миозина с актиновыми филаментами, сопровождаемое гидролизом АТФ в головках и регулируемое тропомиозином, лежит в основе молекулярного механизма самых разных проявлений биологической подвижности – от процессов внутриклеточного транспорта до мышечного сокращения.

Цель настоящего обзора – продемонстрировать на примере мышечных белков те возможности и преимущества, которые предоставляет применение метода ДСК для структурно-функциональных исследований белков, а именно: 1) регистрация и изучение структурных перестроек, происходящих в белках при взаимодействии с низкомолекулярными лигандами – на примере исследования конформационных изменений, происходящих в головках миозина и в актине при связывании и гидролизе АТФ; 2) изучение белок-белковых взаимодействий на примере взаимодействия F-актина с головками миозина, тропомиозином и другими актин-связывающими белками; 3) сочетание метода ДСК с другими методами и подходами (включая специфические модификации белков и использование сайт-направленного мутагенеза), успешно применяемое в нашем коллективе для изучения молекулярного механизма и регуляции мышечного сокращения.

В обзоре будут представлены результаты работ по изучению методом ДСК тепловой денатурации мышечных белков актина, миозина, тропомиозина, кальдесмона и кальпонины, проводившихся с конца 1970-х годов до наших дней, многие из которых были выполнены в руководимом автором научном коллективе.

II. МИОЗИН

Миозин – представитель интенсивно изучаемой в последнее время группы белков – «молекулярных моторов», осуществляющих в живых клетках механохимическое преобразование энергии гидролиза АТФ в механическую работу при взаимодействии с актиновыми филамен-

тами. Миозины чрезвычайно разнообразны как по своему строению, так и по выполняемым в клетке функциям. На основе филогенетического анализа все миозины подразделяют в настоящее время на 17 классов [41]. Для всех миозинов характерно наличие высококонсервативного глобулярного участка, так называемого моторного домена, ответственного за связывание и гидролиз АТФ, взаимодействие с актином и преобразование химической энергии в механическую работу. Все известные в настоящее время миозины являются олигомерами и состоят из нескольких полипептидных цепей. Моторный домен образован N-концевой частью так называемой «тяжелой» цепи. К нему примыкает область «регуляторного» домена – α -спираль, содержащая от одного до шести участков связывания «легких» цепей (кальмодулин-подобных белков, участвующих в регуляции функционирования миозина) [6]. С-Концевые области («хвосты») миозинов обладают значительно меньшей консервативностью и у представителей разных классов часто не имеют ничего общего друг с другом [26, 85]. Этот переменный участок молекулы определяет, какие специфические функции данный класс миозинов выполняет в клетке.

Самыми известными и наиболее хорошо изученными представителями семейства миозинов являются миозины второго класса (миозины II), к которым относятся все мышечные миозины и многие неммышечные миозины. Молекула миозина II представляет собой гексамер, состоящий из двух тяжелых цепей (молекулярная масса ~200 кДа) и четырех легких цепей (молекулярная масса ~20 кДа). N-Концевые области тяжелых цепей образуют две глобулярные головки. Каждая головка состоит из высококонсервативного моторного домена и регуляторного домена, образованного областью «шейки» головки и двумя ассоциированными легкими цепями. С-Концевые части тяжелых цепей миозина II, взаимодействуя друг с другом, образуют длинную и жесткую стержневую часть молекулы (хвост), представляющую собой двойную α -спираль. Эта двойная спираль (coiled-coil) образуется за счет периодических повторов гидрофобных и заряженных остатков. При ограниченном протеолизе молекулы миозина II трипсином, химотрипсином или папаином можно получить различные фрагменты миозина в изолированном состоянии: изолированная миозиновая головка или субфрагмент 1 миозина (S1); стержневая часть миозина; N- и С-концевые фрагменты стержневой части – субфрагмент 2 (S2) и легкий меромиозин (LMM) соответственно; тяжелый меромиозин (НММ), состоящий из двух головок, присоединенных к S2 [6, 10]. Эти фрагменты, сохраняющие свойства определенных частей молекулы миозина II, часто используются в экспериментах вместо целого миозина.

СТЕРЖНЕВАЯ ЧАСТЬ МИОЗИНА

Метод ДСК применяется для структурных исследований миозина с конца 1970-х годов. Однако вплоть до конца 1980-х годов этот метод использовался почти исключительно для изучения тепловой денатурации спиральной стержневой части молекулы мышечного миозина II и ее изолированных фрагментов. Это было обусловлено двумя причинами. Во-первых, в то время была очень популярна гипотеза, предложенная Харрингтоном [40], согласно которой ключевую роль в процессе генерации силы при мышечном сокращении играют быстрые структурные перестройки (переходы спираль–клубок) в области «шарнирного» участка между S2 и LMM в стержневой части миозина. Поэтому многие исследователи занимались в то время изучением тепловой денатурации стержневой части миозина при помощи самых разных методов, включая метод ДСК. Вторая причина заключалась в том, что обратимая тепловая денатурация стержневой части миозина значительно более доступна для калориметрического анализа, чем необратимая денатурация глобулярной миозиновой головки, которая сопровождалась агрегацией и преципитацией белка, что значительно затрудняло измерение калориметрических параметров.

Тепловая денатурация изолированной стержневой части миозина из скелетных мышц кролика и некоторых ее фрагментов, исследованная методом ДСК, была впервые описана Потехиным с соавторами в 1979 г. [11]. Стержневая часть миозина денатурировала в широком температурном диапазоне — от 35 до 65 °С; на калориметрической кривой четко выявлялись четыре максимума. При разложении калориметрической кривой на отдельные тепловые переходы в ней было выявлено шесть таких переходов с максимумами при 43, 46, 49, 51, 54 и 60 °С [11]. В дальнейшем сложный комплексный характер кривой теплопоглощения стержневой части миозина был подтвержден многими другими авторами [15, 18, 61, 67]; в зависимости от применявшихся способов разложения в ней было выявлено от трех до шести отдельных тепловых переходов.

Для идентификации таких переходов, т. е. для выявления их соответствия определенным участкам последовательности стержневой части миозина, исследовались различные изолированные фрагменты стержневой части, такие как легкий меромиозин (LMM) или субфрагмент 2 (S2), содержащие или не содержащие область «шарнирного» участка, соединяющего области S2 и LMM в стержневой части миозина. Плавление таких изолированных фрагментов хорошо коррелировало с определенными тепловыми переходами стержневой части миозина [11, 18, 61]. Наименее термостабильный тепловой переход присутствовал в препаратах «длинного» LMM и «длинного» S2,

содержащих участки шарнирной области, но он отсутствовал в препаратах «коротких» LMM и S2, не содержащих этих участков последовательности [11, 18, 61, 91]. Было высказано предположение, что этот тепловой переход отражает плавление шарнирного участка между LMM и S2, включая также короткую С-концевую область S2 и короткую N-концевую область LMM [18, 61]. Таким образом, применение метода ДСК позволило выявить наличие отдельных независимо плавящихся областей (калориметрических доменов) в стержневой части миозина скелетных мышц.

В стержневой части миозина скелетных мышц область LMM отвечает за образование упорядоченных биполярных миозиновых филаментов при физиологических значениях ионной силы, а область S2 вместе с шарнирным участком способствует перемещениям головок между миозиновыми и актиновыми филаментами. При калориметрических исследованиях было показано, что тепловая денатурация LMM очень чувствительна к изменениям ионной силы раствора. При снижении концентрации KCl от 0,6 до 0,12 М (т. е. в условиях образования миозиновых филаментов) максимум теплового перехода LMM смещался на 10 °С в сторону более высокой температуры и заметно увеличивалась кооперативность перехода (пик становился значительно более узким) [18]. С другой стороны, среди фрагментов стержневой части миозина, S2 демонстрировал наибольшую, необычайно высокую чувствительность к изменениям pH [17, 18]. Так, при низкой ионной силе снижение pH с 7,3 до 5,9 сдвигало максимум теплового перехода для S2 на 10 градусов – от 39,5 до 49,6 °С [17]. Эти данные хорошо коррелировали с результатами экспериментов на миозиновых филаментах и мышечных волокнах, демонстрирующими pH-зависимые структурные перестройки в области S2, приводящие к перемещениям этой области относительно поверхности миозинового филамента [83, 95]. Таким образом, метод ДСК позволяет исследовать функционально важные структурные изменения в различных областях стержневой части миозина.

Надо отметить, что все описанные выше данные относятся к стержневой части миозина из скелетных мышц позвоночных, характер же тепловой денатурации стержневой части миозина из других источников может быть совершенно иным. Так, например, изолированные стержневые части миозина II из гладких мышц мускульного желудка курицы [29] и из почвенной амебы *Acanthamoeba castellanii* [99, 100] денатурируют в узком температурном диапазоне, давая лишь один хорошо выраженный тепловой переход. При анализе кривой теплопоглощения стержневой части миозина II из *Acanthamoeba castellanii* не было получено никаких доказательств существования неза-

висимо разворачивающихся доменов и был сделан вывод, что механизм ее тепловой денатурации коренным образом отличается от механизма, описанного для стержневой части миозина скелетных мышц [99, 100]. Эти данные свидетельствуют о том, что структура миозинового хвоста может существенно варьировать у разных миозинов в зависимости от его функций в молекуле миозина II.

МИОЗИНОВАЯ ГОЛОВКА

К концу 1980-х годов интерес большинства исследователей, изучающих структуру и функции миозина, переключился на изучение миозиновой головки. К этому времени было показано, что изолированные миозиновые головки (субфрагмент 1 миозина, S1) способны перемещать актиновые филаменты в искусственных системах биологической подвижности (*in vitro* motility assay) [92]. Кроме того, к этому времени было обнаружено множество «необычных» («unconventional») миозинов, лишенных характерной для мышечных миозинов стержневой части, но всегда имеющих одну или две головки с высококонсервативной структурой [26, 28, 85]. Стало ясно, что именно головка миозина, несущая активный центр АТФазы и участки связывания актина, представляет собой истинный «молекулярный мотор», т. е. процесс генерации силы при взаимодействии миозина с актином происходит в самой головке, а не в каких-то других частях молекулы миозина. Этим объясняется возросший в последнее время интерес к структуре миозиновой головки и к тем ее изменениям, которые происходят в процессе АТФазной реакции и при взаимодействии с актиновыми филаментами.

Структурные изменения, происходящие в миозиновых головках в процессе АТФазной реакции

В настоящее время уже не подлежит сомнению, что в основе молекулярного механизма мышечного сокращения и множества иных процессов биологической подвижности лежат значительные конформационные перестройки, происходящие в головках миозина при связывании и гидролизе АТФ. Именно эти перестройки в присоединенных к F-актину головках миозина изменяют характер взаимодействия миозина с актином и вызывают направленное перемещение актиновых филаментов. Выяснение механизма таких перестроек в миозиновой головке является необходимым условием для понимания процессов трансформации энергии гидролиза АТФ в механическую работу, происходящих в мышцах и иных двигательных системах, основанных на взаимодействии миозина с актином.

В процессе Mg^{2+} -АТФазной реакции S1 образуется ряд дискретных промежуточных комплексов, различающихся по интенсивности

триптофановой флуоресценции белка. Наибольшие изменения флуоресценции происходят при образовании интермедиатов $S1^* - ATP$ и $S1^{**} - ADP - P_i$ (каждая звездочка отражает прирост триптофановой флуоресценции $S1$) [44]. Однако такие интермедиаты существуют очень короткое время в процессе АТФазной реакции, что не позволяет проводить детальные исследования структуры $S1$ в этих комплексах. Для этих целей успешно используются стабильные аналоги этих интермедиатов АТФазной реакции $S1$ – тройные комплексы $S1$ с ADP и аналогами P_i , такими как анионы ортованадата (V_i), фторида бериллия (BeF_x), фторида алюминия (AlF_4^-) или фторида скандия (ScF_x) [36, 38, 75, 96]. К настоящему времени установлено, что комплекс $S1 - ADP - BeF_x$ отличается от всех остальных тройных комплексов $S1$ с ADP и аналогами P_i ; он имитирует интермедиат $S1^* - ATP$, тогда как комплексы $S1 - ADP - V_i$, $S1 - ADP - AlF_4^-$ и $S1 - ADP - ScF_x$ имитируют интермедиат $S1^{**} - ADP - P_i$ [32, 78].

С 1990 г. метод ДСК успешно применяется для изучения структурных изменений, происходящих в головке миозина при образовании стабильных тройных комплексов с ADP и аналогами P_i . Результаты первых экспериментов показали, что образование комплекса $S1 - ADP - V_i$ приводит к значительному, на 10 градусов, сдвигу кривой теплопоглощения $S1$ в сторону более высокой температуры [14, 87]. Изменения термостабильности миозиновой головки в присутствии ADP и V_i наблюдались также в экспериментах, проводимых методом ДСК на миофибриллах и мышечных волокнах [62, 63]. При более детальных исследованиях комплекса $S1 - ADP - V_i$ методом ДСК было показано, что его образование вызывает глобальные изменения в структуре $S1$, которые выражаются не только в значительном увеличении температуры денатурации (от 49 до 58 °C), но также в приросте энтальпии теплового перехода, в сильном увеличении кооперативности перехода и в значительном изменении доменной структуры $S1$ [60]. Подобные, хотя и несколько менее выраженные изменения структуры $S1$, были обнаружены и при калориметрических исследованиях комплекса $S1 - ADP - BeF_x$ [19].

На рис. 1 представлены кривые избыточного теплопоглощения $S1$ в отсутствие нуклеотидов, в присутствии ADP и в тройных комплексах $S1 - ADP - V_i$, $S1 - ADP - AlF_4^-$ и $S1 - ADP - BeF_x$ [4, 5]. Видно, что связывание ADP с $S1$ не вызывает существенных изменений в положении максимума теплового перехода $S1$, но увеличивает его кооперативность (пик становится значительно более выраженным). Напротив, образование тройного комплекса $S1 - ADP - V_i$ приводит к значительным структурным изменениям всей молекулы $S1$ [60]: максимум теплового перехода смещается почти на 10 градусов в сторону более высокой температуры, а пик становится очень узким, что

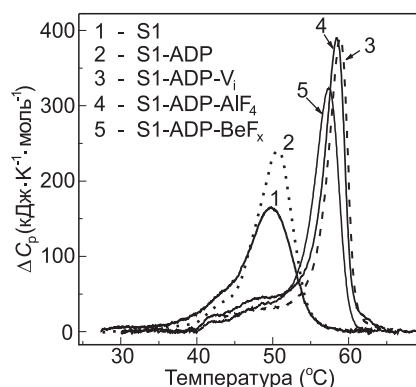


Рис. 1. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения (ΔC_p) препаратов S1 из скелетных мышц кролика в отсутствие нуклеотидов (1), в присутствии ADP (2) и в тройных комплексах S1-ADP- V_i (3), S1-ADP- AlF_4^- (4) и S1-ADP- BeF_x (5) (по [4, 5]).

Условия: 30 мМ Hepes (pH 7,3), 1 мМ $MgCl_2$, 1,5 мг/мл S1. Скорость нагрева 1 К/мин.

свидетельствует о существенном увеличении кооперативности теплового перехода. Такой же эффект наблюдается при образовании комплексов S1-ADP- AlF_4^- и S1-ADP- ScF_x . Сходный эффект, хотя и несколько слабее выраженный, наблюдается и при образовании комплекса S1-ADP- BeF_x (рис. 1).

Таким образом, применение метода ДСК позволяет отчетливо регистрировать структурные перестройки, происходящие в миозиновой головке при образовании стабильных тройных комплексов с ADP и аналогами P_i . Результаты экспериментов с природными нуклеозид-дифосфатами [20] и их искусственными аналогами [37, 39] позволили нам прийти к заключению, что эти структурные перестройки адекватно отражают те конформационные изменения, которые происходят в молекуле S1 в процессе АТФазной реакции. В экспериментах с использованием рекомбинантных фрагментов головок миозина II из *Dictyostelium discoideum* было показано, что структурные изменения, выявляемые методом ДСК в миозиновой головке при образовании стабильных тройных комплексов с ADP и аналогами P_i , происходят главным образом в глобулярной моторной части головки [57]. Подобные изменения наблюдали также в препаратах тяжелого меромиозина (НММ) из гладких мышц мускульного желудка индейки с дефосфорилированными или полностью фосфорилированными регуляторными легкими цепями [9]. Таким образом, наличие двух головок в молекуле НММ и степень фосфорилирования регуляторных легких цепей не оказывают существенного влияния на структурные перестройки в глобулярной моторной части головки, вызываемые образованием стабильных тройных комплексов с ADP и аналогами P_i .

В случае скелетномышечного S1 изменения в характере тепловой денатурации S1 при образовании комплекса S1-ADP- BeF_x мало отличались от изменений, вызываемых образованием комплексов

$S1-ADP-V_i$ и $S1-ADP-AIF_4^-$, хотя и были несколько менее выраженными (рис. 1). Однако значительно более заметная разница между этими комплексами наблюдалась при исследованиях методом ДСК гладкомышечных S1 и НММ [9], а также рекомбинантных фрагментов миозина II из *Dictyostelium discoideum*, соответствующих изолированной моторной части миозиновой головки [57]. Во всех этих случаях эффекты V_i и AIF_4^- были почти идентичными, тогда как эффект BeF_x был значительно менее выражен: сдвиг теплового перехода в сторону более высокой температуры, вызываемый образованием комплекса с $ADP-BeF_x$, был значительно (на 2,5–4 °C) меньше, чем в случае комплексов с $ADP-V_i$ или $ADP-AIF_4^-$. Но самые яркие различия между разными комплексами были выявлены при исследованиях методом ДСК препаратов скелетномышечного S1, специфически модифицированного по остаткам Lys-83, Cys-707 или Cys-697 [5, 8, 34]. Было показано, что эти модификации в значительной мере препятствуют конформационным изменениям при образовании тройных комплексов $S1-ADP-V_i$ и $S1-ADP-AIF_4^-$ (т. е. они предотвращают сдвиг теплового перехода S1 в сторону более высокой температуры), но почти не оказывают влияния на структурные перестройки, индуцируемые образованием комплекса $S1-ADP-BeF_x$. На основании этих данных было сделано заключение, что область остатков Lys-83, Cys-707 и Cys-697, расположенных в молекуле S1 близко друг от друга, играет важную роль в передаче конформационных изменений от активного центра АТРаза S1 на всю моторную часть миозиновой головки при образовании комплексов $S1-ADP-V_i$ и $S1-ADP-AIF_4^-$, но не принимает участия в этом процессе при образовании комплекса $S1-ADP-BeF_x$.

Таким образом, применение метода ДСК позволило выявить существенные отличия комплекса $S1-ADP-BeF_x$ от всех остальных тройных комплексов S1 с ADP и аналогами P_i . Эти данные являются хорошим подтверждением предположения о том, что комплекс $S1-ADP-BeF_x$ представляет собой аналог переходного состояния $S1^*-ATP$ АТРазного цикла S1, тогда как комплексы $S1-ADP-V_i$ и $S1-ADP-AIF_4^-$ являются аналогами другого интермедиата АТРазной реакции — $S1^{4*}-ADP-P_i$ [32, 78].

*Доменная структура миозиновой головки и
ее изменения в процессе АТРазной реакции*

Анализ доменной структуры миозиновой головки представляет особый интерес, поскольку именно междоменные взаимодействия могли бы индуцировать значительные внутримолекулярные перемещения в головке и играть ключевую роль в процессе трансформации энергии гидролиза АТР в механическую работу.

Метод ДСК является одним из лучших подходов для выявления в мультидоменных белках структурных доменов как отдельных тепловых переходов на кривой теплопоглощения. Главной чертой домена в глобулярном белке является то, что его структура сворачивается кооперативно по принципу «все или ничего», со значительными изменениями энтальпии и энтропии [80]. В соответствии с этим определением домены можно выявлять при исследовании методом ДСК тепловой денатурации белка как области в молекуле белка, которые разворачиваются кооперативно и независимо друг от друга. В ранних работах для выявления таких доменов в миозиновой головке мы исследовали методом ДСК тепловую денатурацию скелетномышечного S1, применяя метод «последовательного отжига» [19, 35, 55, 56, 60]. Этот метод, основанный на неоднократном повторении цикла «нагрев—охлаждение—нагрев до более высокой температуры», применим только к полностью или частично необратимым тепловым переходам. Он позволяет экспериментально разлагать кривую теплопоглощения белка на отдельные тепловые переходы, соответствующие плавлению отдельных структурных доменов в молекуле белка. Применение подобного подхода позволило выявить в молекуле S1 три таких перехода (калориметрических домена) [55, 56, 60]. Для идентификации этих доменов (т. е. для выявления их соответствия определенным участкам первичной структуры) был применен целый ряд специальных подходов — таких, как изучение методом ДСК различных препаратов S1, НММ и их фрагментов, избирательная денатурация некоторых областей в молекуле S1, метод термо-гель-анализа, измерения температурных зависимостей тепловой инактивации АТФазы S1 и изменений параметров флуоресценции остатков триптофана или флуоресцентных меток, специфически присоединенных в определенных участках молекулы S1, и др. [35, 54–57]. На основании полученных результатов и сопоставления их с литературными данными мною была предложена модель доменной организации миозиновой головки [54]. Согласно этой модели, впервые представленной в 1991 г. [3], наименее термостабильный и наиболее термостабильный калориметрические домены отражают плавление регуляторного домена миозиновой головки с ассоциированными легкими цепями, тогда как средний домен соответствует глобулярной моторной части головки [5, 54]. Спустя два года, в 1993 г., были впервые опубликованы данные о полной третичной структуре миозиновой головки, полученные на основании рентгеноструктурного анализа кристаллов S1 [82]. Важной особенностью этой структуры является, в полном согласии с данными ДСК, наличие в головке двух четко выраженных морфологических доменов — моторного и регуляторного.

Недавно нами был предложен новый калориметрический подход для анализа доменной структуры необратимо денатурирующих белков, применимый даже в том случае, когда пики отдельных калориметрических доменов перекрываются друг с другом [101]. Важной особенностью этого подхода является то, что в первую очередь определяются параметры тепловой денатурации самого термостабильного домена. Перед калориметрическими измерениями белок инкубируют определенное время при определенной температуре, причем температура для такой инкубации и ее продолжительность определяют при анализе кривых ДСК, полученных при различных скоростях сканирования. Затем параметры тепловой денатурации для каждого отдельного калориметрического домена определяются в экспериментах по тепловой денатурации обработанного таким образом белка, проводимых методом ДСК при разных скоростях сканирования.

Описанный выше подход был применен для исследования доменной структуры миозиновой головки. В S1 из скелетных мышц кролика было обнаружено 4 отдельных калориметрических домена (рис. 2А), что хорошо согласуется с результатами, полученными ранее методом ДСК с использованием «последовательного отжига» [35, 54–56, 60]. Однако только один калориметрический домен был выявлен в

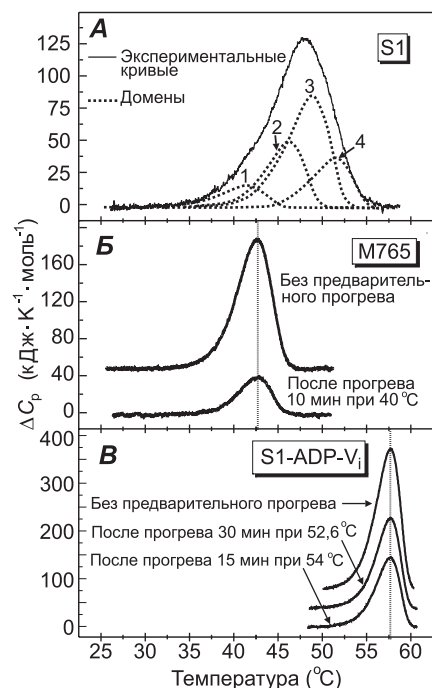


Рис. 2. Отдельные калориметрические домены в свободном от нуклеотидов S1 из скелетных мышц кролика (А), M765 (изолированная моторная часть головки миозина II из *D. discoideum*) (Б) и в тройном комплексе S1–ADP–V_i (В) (по [101]).

Калориметрические домены 1, 2, 3 и 4 в молекуле S1 (А) были выявлены при использовании экспериментальной процедуры, описанной в тексте. После предварительного прогрева максимумы тепловых переходов M765 и S1–ADP–V_i оставались неизменными (Б, В), указывая на то, что и M765, и S1 в комплексе S1–ADP–V_i представлены одним-единственным калориметрическим доменом. Скорость нагрева составляла 1 К/мин.

рекомбинантном фрагменте M765 головки миозина II из *Dictyostelium discoideum*, соответствующем глобулярной моторной части головки без области «шейки» и легких цепей (рис. 2Б). Сопоставляя эти результаты, мы пришли к заключению, что главный калориметрический домен 3 в S1 (рис. 2А), энтальпия которого составляет около половины всей энтальпии тепловой денатурации S1, соответствует, скорее всего, тепловой денатурации моторного домена в молекуле S1. Три других калориметрических домена S1 (домены 1, 2 и 4 на рис. 2А), которые отсутствуют в M765, отражают, скорее всего, тепловую денатурацию регуляторного домена миозиновой головки (т. е. области «шейки» головки с ассоциированными легкими цепями, часто также называемой «lever arm»).

Весьма неожиданный результат был получен при использовании описанного выше подхода для анализа доменной структуры S1 в комплексах S1-ADP-V_i (рис. 2В) и S1-ADP-BeF_x [101]. В обоих этих случаях лишь один калориметрический домен был выявлен в молекуле S1 (рис. 2В). На основании этого можно предположить, что в комплексах S1-ADP-V_i и S1-ADP-BeF_x происходит достаточно прочное взаимодействие между моторным и регуляторным доменами миозиновой головки, в результате чего обе эти части головки денатурируют вместе как единый калориметрический домен. Недавно для S1 из запирающих мышц моллюсков было показано, что образование комплекса S1-ADP-V_i приводит к значительному перемещению регуляторного домена относительно моторного домена, в результате которого в этом комплексе регуляторный домен располагается очень близко к поверхности моторного домена [42]. Результаты, полученные методом ДСК (рис. 2), указывают на то, что в комплексах S1-ADP-V_i и S1-ADP-BeF_x регуляторный и моторный домены миозиновой головки не только сближаются в результате поворота регуляторного домена, но и достаточно прочно взаимодействуют друг с другом. Результаты этих экспериментов позволяют предположить, что в процессе АТФазной реакции происходят глобальные изменения доменной структуры миозиновой головки, которые выражаются в прочном взаимодействии между двумя главными частями головки — моторным и регуляторным доменами.

Структурные изменения, происходящие в миозиновых головках при взаимодействии с F-актином

Метод ДСК применяется также для структурных исследований белок-белковых взаимодействий как прямой метод регистрации теплового разворачивания белков, взаимодействующих друг с другом [24]. Такой подход позволяет выявлять структурные изменения, происходящие в белках в результате их взаимодействия.

В наших экспериментах метод ДСК успешно используется для регистрации и дальнейшего исследования конформационных изменений, которые происходят в миозиновой головке при ее «сильном» связывании с F-актином в присутствии ADP. Было показано, что связывание скелетномышечного S1 с F-актином значительно увеличивает термостабильность S1, сдвигая максимум его теплового перехода на 5 градусов в сторону более высокой температуры [71]. Для лучшего разделения на термограмме тепловых переходов F-актина и связанной с актином миозиновой головки в последнее время мы используем в подобных экспериментах F-актин, стабилизированный фаллоидином. В этом случае F-актин плавится при очень высокой температуре (~80 °C), что позволяет более детально исследовать параметры тепловой денатурации миозиновой головки, связанной с F-актином (рис. 3). Тепловая денатурация стабилизированного фаллоидином F-актина не претерпевает особых изменений при взаимодействии F-актина с S1 (рис. 3А). Напротив, такое взаимодействие значительно увеличивает термостабильность S1. Такая стабилизация миозиновой головки, вызываемая актином, выражается в заметном смещении максимума ее теплового перехода в сторону более высокой температуры (рис. 3Б). Мы используем величину этого смещения (ΔT_m) как относительный параметр для определения степени структурных изменений, происходящих в миозиновой головке при ее взаимодействии с актином. Этот параметр зависит от источника миозина: величина ΔT_m варьирует от 5–6 °C для S1 из скелетных мышц кролика (рис. 3Б) и рекомбинантного фрагмента M765 миозина II из *D. discoideum* [77] до 10–11 °C для миозина I и гладкомышечного НММ. На основании экспериментов, проведенных методом ДСК с различными рекомбинантными фрагментами головки миозина II из *D. discoideum*, было сделано заключение, что индуцируемые актином изменения в тепловой денатурации миозиновой головки происходят главным образом в ее глобулярной моторной части [77].

Показано, что изменения заряда в актин-связывающей поверхностной петле (т. н. петле 2) миозиновой головки оказывает очень сильное влияние на тепловую денатурацию связанного с F-актином моторного домена головки [77]. Введение большого количества дополнительных отрицательных зарядов в петлю 2 изолированного моторного домена головки миозина II из *D. discoideum* (M765) резко снизило параметр ΔT_m (с 6 °C до 1,2 °C), тогда как введение в петлю 2 дополнительных положительно заряженных остатков увеличивало этот параметр (вплоть до 9,1 °C). При этом изменения в петле 2 не оказывали заметного влияния на способность M765 подвергаться глобальным структурным перестройкам при образовании тройных комплексов с ADP и аналогами P_i [77]. Таким образом, изменения зарядов

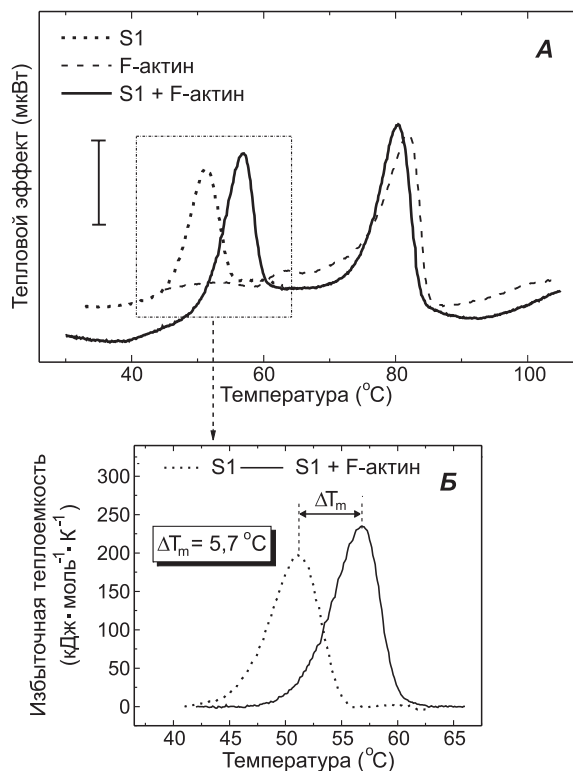


Рис. 3. Пример применения метода ДСК для регистрации конформационных изменений, происходящих в миозиновой головке при ее взаимодействии с актином (по [5, 46, 70, 71, 77]).

А. Экспериментальные кривые ДСК для S1 из скелетных мышц кролика, F-актина, стабилизированного фаллоидином, и их комплекса, полученного в присутствии ADP. Условия: 13 μM S1, 24 μM F-актин, 40 μM фаллоидин, 20 mM Hepes, pH 7,3, 2 mM MgCl_2 , 1 mM ADP. Вертикальная метка соответствует 15 $\mu\text{Вт}$. Скорость нагрева – 1 $\text{K}/\text{мин}$.

Б. Температурные зависимости избыточной теплоемкости S1 в присутствии и в отсутствие F-актина. Параметр ΔT_m (в данном случае 5,7 $^{\circ}\text{C}$) определяет разницу между температурами денатурации (T_m) свободного S1 и S1, связанного с F-актином.

в актин-связывающей петле 2 не оказывают влияния на индуцируемые нуклеотидами структурные перестройки миозиновой головки, но они оказывают существенное влияние на те конформационные изменения, которые происходят в моторном домене головки при ее сильном связывании с F-актином в присутствии ADP.

В настоящее время считается общепризнанным, что именно электростатическое взаимодействие между петлей 2 (поверхностном сегменте миозиновой головки, насыщенном остатками лизина) и отрицательно заряженными остатками в N-концевой части актина отвечает за «слабое» связывание с F-актином головок миозина в комплексах с АТР или $ADP-P_i$. Последующий переход к состоянию сильного связывания (когда головка миозина утрачивает P_i и содержит только АDP) сопровождается формированием множества дополнительных контактов между актином и миозином. Переход от состояния слабого связывания к состоянию сильного связывания играет чрезвычайно важную роль при генерации силы в мышцах, поскольку именно в процессе этого перехода миозиновые головки осуществляют перемещение актиновых филаментов вдоль миозиновых филаментов.

После того, как методом ДСК была детально изучена тепловая денатурация головок миозина в состоянии сильного связывания с F-актином, мы применили описанный выше калориметрический подход для исследования слабого связывания S1 с F-актином.

«Слабое» связывание *pPDM-S1* с F-актином. Состояния слабого связывания (связывания с F-актином головок миозина в комплексах с АТР или $ADP-P_i$) представляют собой короткоживущие интермедиаты АТРазной реакции актомиозина. Поэтому для структурных исследований требуется применение специальных стабильных аналогов этих состояний. Одним из таких аналогов является S1 из скелетных мышц кролика, в котором SH-группы остатков Cys-707 и Cys-697 сшиты между собой бифункциональным реагентом N,N'-*p*-фенилендималеимидом (*pPDM*). Ранее было показано, что S1, модифицированный *pPDM* (*pPDM-S1*), связывается с F-актином в состоянии слабого связывания даже в отсутствие нуклеотидов, причем сродство его к актину сходно со сродством немодифицированного S1 в присутствии АТР [25, 98]. Поэтому *pPDM-S1* часто применяется для изучения слабого связывания головок миозина с актином.

Для того, чтобы исследовать слабое связывание *pPDM-S1* с F-актином, стабилизированным фаллоидином, мы применили калориметрический подход, описанный выше для сильной формы связывания (рис. 3). Было показано, что F-актин оказывает влияние на тепловую денатурацию *pPDM-S1* только при очень низкой ионной силе, когда около 40% молекул *pPDM-S1* слабо связываются с F-актином, но не при более высокой ионной силе (200 мМ KCl), полностью предотвращающей взаимодействие *pPDM-S1* с F-актином. Слабое связывание *pPDM-S1* с F-актином смещало тепловой переход *pPDM-S1* на ~ 5 °C в сторону более высокой температуры [46]. Такое индуцируемое актином повышение термостабильности *pPDM-S1*

весьма напоминало эффект, наблюдавшийся для «сильного» связывания с F-актином немодифицированного S1 (рис. 3).

Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что структурные изменения, вызываемые актином в миозиновых головках и выявляемые методом ДСК, происходят не только при сильном, но и при слабом связывании головок миозина с F-актином. Это наводит на мысль, что такие изменения могут играть важную роль в функционировании головки в качестве молекулярного мотора. Такое предположение подтверждается данными ДСК о том, что индуцируемые актином структурные перестройки в головке миозина в значительной степени зависят от заряда в петле 2 [77], т. е. в участке, ответственном за слабое связывание головок миозина с F-актином. Можно предположить, что поскольку такие структурные перестройки происходят в миозиновой головке при образовании слабой формы связывания с актином, они должны происходить на самых ранних этапах взаимодействия миозина с актином и потому могут иметь очень важное значение для последующего перехода связанной с актином миозиновой головки из состояния слабого связывания в состояние сильного связывания.

В заключение этого раздела следует сказать, что индуцируемые актином структурные перестройки в миозиновых головках, выявляемые методом ДСК по увеличению термостабильности головок, определяются, по-видимому, главным образом электростатическими взаимодействиями между положительно заряженной петлей 2 в головке миозина и отрицательно заряженной N-концевой частью актина.

Эффекты специфических модификаций миозиновой головки

Итак, применение метода ДСК предоставляет новые возможности для регистрации глобальных конформационных перестроек, происходящих в миозиновой головке в процессе АТРазной реакции и при взаимодействии с актином. Нами были разработаны специальные подходы для регистрации таких нуклеотид-зависимых и актин-зависимых структурных изменений в головке по серьезным изменениям характера тепловой денатурации белка (рис. 1, 3). Главная цель последующих исследований состояла в том, чтобы понять механизм таких глобальных структурных перестроек в головке, т. е. механизм передачи конформационных изменений от активного центра АТРазы и актин-связывающих участков на всю моторную часть головки. Для этого методом ДСК исследовали специально модифицированные препараты миозиновой головки, выясняя их способность подвергаться глобальным структурным перестройкам при взаимодействии с нуклеотидами и с F-актином. Наибольший интерес представляли те моди-

фикации, которые не оказывали непосредственного влияния на участки связывания нуклеотидов и актина (т. е. не препятствовали как связыванию ADP и аналогов P_i в активном центре АТРаза, так и связыванию головок миозина с актином), но подавляли распространение конформационных изменений от этих функционально важных участков на весь моторный домен миозиновой головки. Среди таких модификаций мы отбирали лишь те, которые избирательно предотвращали либо только нуклеотид-зависимые, либо только актин-зависимые структурные перестройки в головке миозина, регистрируемые методом ДСК по значительным изменениям характера тепловой денатурации.

Модификации, избирательно предотвращающие глобальные структурные перестройки в головке миозина, индуцируемые ADP и аналогами P_i . Прежде всего, к числу таких модификаций можно отнести описанную выше сшивку pPDM между SH-группами остатков Cys-707 и Cys-697 в молекуле S1. Препарат pPDM-S1 демонстрировал индуцируемые актином структурные перестройки [46], но добавление ADP и аналогов P_i не оказывало никакого влияния на его тепловую денатурацию [21, 46]. Однако pPDM-S1, как было показано, не способен образовывать тройные комплексы с ADP и аналогами P_i [21].

В этом отношении значительно более интересна другая модификация тех же остатков – модификация различными реагентами обеих «существенных» SH-групп (SH1 и SH2 остатков Cys-707 и Cys-697, соответственно) в S1 из скелетных мышц кролика, без их сшивки между собой [59]. Такая модификация не оказывала влияния на изменения тепловой денатурации S1, индуцируемые актином, но почти полностью предотвращала изменения, вызываемые образованием тройных комплексов S1–ADP– V_i , S1–ADP– AlF_4^- и, в значительной степени, S1–ADP– BeF_3^- (рис. 4). При этом методом ЭПР было показано, что модификация SH2-группы в S1, спин-меченом по SH1-группе, не оказывает никакого влияния на локальные конформационные изменения, происходящие в области SH1-группы при образовании тройных комплексов S1 с ADP и аналогами P_i [59]. Таким образом, при совместном использовании методов ДСК и ЭПР удалось показать, что модификация обеих SH-групп, SH1 и SH2, не препятствует локальным конформационным изменениям, индуцируемым нуклеотидами в области SH1-группы, но предотвращает глобальные нуклеотид-зависимые структурные перестройки всей молекулы S1. Это наводит на мысль о том, что модификация SH1 (Cys-707) и SH2 (Cys-697) существенно затрудняет распространение индуцируемых нуклеотидами конформационных изменений от активного центра АТРаза на всю молекулу S1, нарушая таким образом взаимосвязь между функционально важными участками в миозиновой головке.

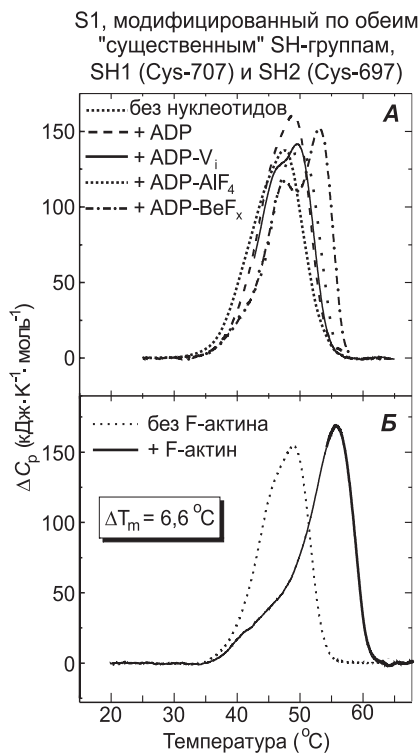


Рис. 4. Тепловая денатурация S1 из скелетных мышц кролика, модифицированного по обеим «существенным» SH-группам, SH1 (Cys-707) и SH2 (Cys-697) [59]. S1 был модифицирован по SH1-группе спиновой меткой 4-йодоацетида-2,2,6,6-тетраметилпиперидиноксилом (IASL), а по SH2-группе – флуоресцентной меткой N-[[йодоацетил]амино]этил]1-сульфо-5-нафтиламином (1,5-IAEDANS). Скорость нагрева – 1 К/мин.

А. Кривые, полученные в присутствии ADP и аналогов P_i (V_i , AlF_4^- , BeF_x).

Б. Кривые, полученные в присутствии двукратного молярного избытка F-актина, стабилизированного фаллоидином.

Здесь и на рис. 5Б не показана область температур выше 70 °С, в которой происходит тепловая денатурация F-актина, стабилизированного фаллоидином.

Подобный эффект оказывала мутация F506G в моторном домене головки миозина II из *D. discoideum*, т. е. замена Phe-506 на глицин [94]. Методом ДСК было показано, что эта мутация полностью предотвращает конформационные изменения, происходящие обычно при образовании тройных комплексов с ADP и аналогами P_i , но почти не оказывает влияния на изменения, вызываемые актином (величина индуцируемого актином смещения теплового перехода, ΔT_m , составляла в этом случае 4,5 °С). Такой мутант утрачивал способность к перемещению актиновых филаментов в искусственной системе подвижности [94]. На основании этих данных было высказано предположение, что мутация F506G нарушает взаимосвязь между участком связывания нуклеотидов и областью «конвертера» в моторном домене миозиновой головки, препятствуя таким образом передаче конформационных изменений от АТФазного центра к конвертеру, ответственному, в свою очередь, за перемещение регуляторного домена относительно моторного домена

Модификации, избирательно предотвращающие только индуцируемые актином структурные перестройки в головке миозина. Одна из таких модификаций была описана выше – это изменения заряда в актин-связывающей петле 2 изолированного моторного домена головки миозина II из *D. discoideum*. Такая модификация не оказывала влияния на нуклеотид-зависимые структурные перестройки в моторном домене головки, но изменяла степень индуцируемых актином перестроек – вплоть до полного их предотвращения. Введение в петлю 2 большого количества отрицательно заряженных остатков [77] или делеция петли 2 [76] почти полностью предотвращали изменения в характере тепловой денатурации моторного домена головки при его сильном связывании с F-актином. Например, мутанты M765(20/-10) (изолированный моторный домен головки миозина II из *D. discoideum*, M765, с 20 дополнительными остатками в петле 2, включая 10 отрицательно заряженных остатков) [77] и M765-NL (M765 с делецией петли 2) [76] полностью сохраняли способность M765 подвергаться глобальным структурным перестройкам при связывании ADP и при образовании стабильных тройных комплексов с ADP и аналогами P_i. Эти мутанты достаточно прочно связывались с F-актином, но такое связывание не приводило, однако, к заметным изменениям в характере их тепловой денатурации (так, например, величина ΔT_m для M765-NL составляла всего 0,6 °C) (рис. 5).

Эти эффекты достаточно просто объясняются, поскольку петля 2 представляет собой часть актин-связывающего центра миозиновой головки и, соответственно, изменения этой петли оказывают влияние на взаимодействие миозина с актином и на те структурные перестройки, которые происходят в головке при таком взаимодействии. Описанные выше результаты исследований методом ДСК препарата pPDM-S1 приводят нас к заклю-

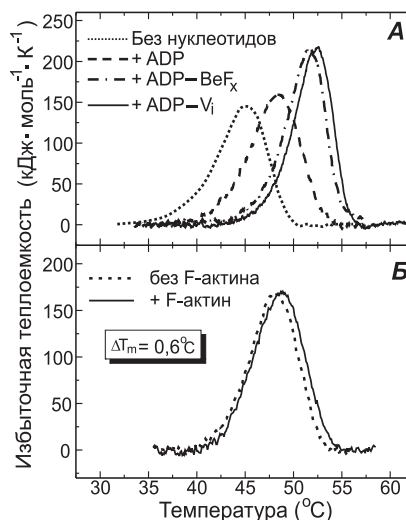


Рис. 5. Тепловая денатурация изолированной моторной части головки миозина II из *D. discoideum* с делецией петли 2 (M765-NL) в присутствии ADP и аналогов P_i (V_i, BeF_x) (A) и в присутствии двукратного молярного избытка F-актина, стабилизированного фаллоидином (B) [76]. Скорость нагрева – 1 К/мин.

чению, что индуцируемые актином структурные перестройки в миозиновой головке, выражающиеся в заметном увеличении ее термостабильности, определяются главным образом взаимодействием петли 2 с актином. В свете такой интерпретации совершенно неожиданными представляются результаты, полученные недавно при исследованиях методом ДСК препарата S1, у которого при ограниченном протеолизе трипсином в присутствии АТР был внесен разрыв в N-концевой области тяжелой цепи между остатками Arg-23 и Pe-24 [70]. Было показано, что такое расщепление тяжелой цепи S1 не оказывает влияния на индуцируемые нуклеотидами конформационные изменения в S1, но полностью предотвращает изменения тепловой денатурации для S1, связанного с F-актином.

Эффект такого N-концевого расщепления тяжелой цепи S1 (т. е. отсутствие сдвига кривой теплопоглощения связанного с F-актином S1 в сторону более высокой температуры [70]) нельзя объяснить непосредственным взаимодействием между N-концевой областью и петлей 2 в S1, поскольку эти участки находятся довольно далеко друг от друга в третичной структуре S1 [82]. Представляется значительно более вероятным, что между этими участками головки имеется дальнедействующая взаимосвязь. По-видимому, расщепление тяжелой цепи S1 между Arg-23 и Pe-24 нарушает такую взаимосвязь, предотвращая таким образом глобальные конформационные изменения в миозиновой головке, индуцируемые связыванием актина с петлей 2.

Завершая рассмотрение результатов структурно-функциональных исследований миозина методом ДСК, можно заключить, что применение этого метода дает возможность регистрировать глобальные конформационные изменения, происходящие в головке миозина при связывании нуклеотидов и актина. Такой подход в сочетании с другими методами позволяет исследовать дальнедействующие взаимосвязи между функционально важными участками миозиновой головки, находящимися в пространстве далеко друг от друга.

III. АКТИН

Актин обнаружен во всех без исключения эукариотических клетках. Актиновые филаменты играют ключевую роль в биологической подвижности как главные партнеры миозиновых «моторных» систем и как главная составная часть цитоскелета. Фибриллярный актин (F-актин) представляет собой двухнитчатый спиральный полимер, состоящий из мономеров актина. Мономерный актин (G-актин) — глобулярный белок с молекулярной массой 42 кДа, образованный одной полипептидной цепью. Каждая молекула G-актина содержит

связанную АТР и двухвалентный катион. Важной особенностью актина является его способность к полимеризации при добавлении нейтральных солей с образованием длинных полярных филаментов F-актина. Полимеризация G-актина в F-актин сопровождается гидролизом связанной АТР с последующим медленным освобождением P_i ; в результате каждая субъединица F-актина содержит прочно связанную ADP [6].

G-АКТИН

В 1984 г. Татунашвили и Привалов применили метод ДСК для изучения тепловой денатурации мономерного G-актина [12]. При анализе кривых теплопоглощения было высказано предположение о том, что в молекуле G-актина имеется по крайней мере два домена, взаимодействующих между собой.

Сходное предположение о наличии двух доменов в молекуле G-актина было также высказано на основании данных компьютерной деконволюции кривой теплопоглощения G-актина на два независимых тепловых перехода [16]. Необходимо отметить, что тепловая денатурация актина необратима, и применение подобных подходов для анализа необратимых тепловых переходов является весьма спорным [51]. Однако предположения о наличии доменной структуры в молекуле G-актина, высказанные на основании калориметрических исследований [12, 16], впоследствии полностью подтвердились после опубликования в 1990 г. трехмерной атомной структуры G-актина [45]. Было установлено, что молекула мономерного G-актина состоит из двух хорошо различимых доменов, разделенных глубокой щелью, причем каждый из этих доменов разделен на два субдомена.

F-АКТИН

Полимеризация G-актина с образованием F-актина

Применение метода ДСК позволяет отчетливо регистрировать изменения, происходящие при полимеризации актина, т. е. при трансформации мономерного G-актина в филаменты F-актина. Эти изменения, наблюдавшиеся многими авторами [5, 16, 17, 64], выражаются в значительном увеличении температуры теплового перехода, в заметном увеличении калориметрической энтальпии (площади под пиком) и в резком изменении формы пика (он становится гораздо более узким, что указывает на значительное увеличение кооперативности тепловой денатурации) (рис. 6).

G-актин поддерживается в мономерном состоянии в буфере с низкой ионной силой, содержащем 0,2 мМ $CaCl_2$ и 0,2 мМ АТР (G-буфер). Полимеризацию обычно проводят, добавляя к этому буферу либо

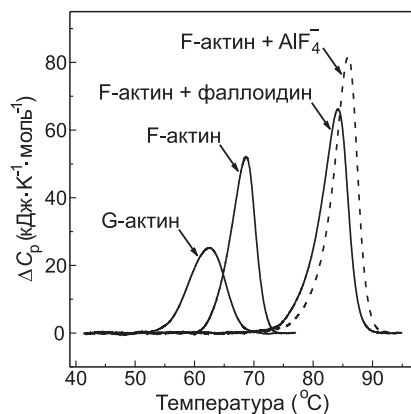


Рис. 6. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения (ΔC_p) G-актина, F-актина и F-актина, стабилизированного фаллоидином или фторидом алюминия (AlF_4^-) [65].

Скорость нагрева – 1,82 К/мин.

Этот эффект фаллоидина очень удобен для исследований методом ДСК комплексов F-актина с другими белками, и поэтому мы часто используем стабилизированный фаллоидином F-актин для лучшего разделения тепловых переходов F-актина и связанных с ним белков (таких, как головки миозина или тропомиозин) на термограммах ДСК.

Стабилизация F-актина фаллоидином и аналогами P_i

Хорошо известно, что F-актин специфически взаимодействует с циклическим гептапептидом фаллоидином – одним из главных токсинов бледной поганки *Amanita phalloides*. Фаллоидин, прочно связываясь с F-актином, сильно стабилизирует актиновые филаменты, предотвращая деполимеризацию F-актина и защищая его от протеолиза. Поэтому стабилизированные фаллоидином актиновые филаменты очень часто используются во многих экспериментах, – таких, например, как исследование подвижности *in vitro*. При исследованиях методом ДСК было показано, что связывание фаллоидина с F-актином резко увеличивает температуру тепловой денатурации F-актина, смещая максимум его теплового перехода на 14 °C в сторону более высокой температуры [50]. Мы также наблюдали сходный эффект фаллоидина [5] (рис. 6). Этот эффект фаллоидина очень удобен для исследований методом ДСК комплексов F-актина с другими белками, и поэтому мы часто используем стабилизированный фаллоидином F-актин для лучшего разделения тепловых переходов F-актина и связанных с ним белков (таких, как головки миозина или тропомиозин) на термограммах ДСК.

KCl до концентрации 50–150 мМ, либо MgCl_2 до концентрации 2 мМ или выше, либо KCl и MgCl_2 одновременно. Калориметрические кривые F-актина, полимеризованного такими разными способами, мало отличаются друг от друга [68]. Такая кривая получена и для F-актина, полимеризованного в присутствии 2 мМ CaCl_2 (т.н. Ca-F-актина) [5]. Однако совершенно иная калориметрическая кривая была получена для F-актина, полимеризованного добавлением 2 мМ MgCl_2 в присутствии ЭГТА, т. е. при замещении прочно связанного Ca^{2+} на Mg^{2+} (т.н. Mg-F-актин). В этом случае и температура теплового перехода, и его кооперативность были значительно ниже, чем в случае Ca-F-актина [5]. Это значит, что прочно связанный Ca^{2+} очень важен для стабилизации актиновых филаментов.

Полимеризация мономерного G-актина с образованием филаментов F-актина сопровождается гидролизом связанной АТФ. Подобно миозину при гидролизе АТФ актином в субъединицах актина образуется промежуточное состояние – комплекс актина с АДФ и P_i [6]. Как и в случае с миозином, структуру F-актина в этом промежуточном состоянии можно исследовать, используя стабильные комплексы F-актина с АДФ и аналогами P_i – BeF_x и AlF_4^- (но не V_i) [27, 66, 74]. Мы исследовали тепловую денатурацию F-актина в этих комплексах методом ДСК и показали, что структура F-актина сильно меняется при взаимодействии с BeF_x или AlF_4^- в присутствии АДФ [68]. Структурные изменения, происходящие при таком взаимодействии, отражаются в резком сдвиге (более чем на 16 градусов) максимума теплового перехода F-актина в сторону более высокой температуры (рис. 6). Сходный, хотя и значительно менее ярко выраженный эффект стабилизации F-актина наблюдался ранее при исследованиях тепловой денатурации F-актина в присутствии АТФ [23]. Эффекты BeF_x и AlF_4^- были очень похожи, тогда как эффекты V_i and P_i были незначительными [68].

Интересно отметить, что фаллоидин и AlF_4^- (или BeF_x) оказывают сходное влияние на тепловую денатурацию F-актина, которое выражается в значительном увеличении температуры теплового перехода (рис. 6). Однако, когда мы одновременно добавляли к F-актину оба эти стабилизирующих агента, мы наблюдали дополнительную стабилизацию F-актина, которая выражалась в сдвиге теплового перехода более чем на 25 °C в сторону высокой температуры [5]. Это значит, что фаллоидин и BeF_x (или AlF_4^-) стабилизируют F-актин независимо друг от друга и действуют скорее всего на разные участки активной молекулы. Этот вывод согласуется с литературными данными о том, что фаллоидин и BeF_x связываются в разных местах на субъединицах F-актина [66, 74].

Предполагаемый механизм тепловой денатурации F-актина

Недавно мы провели методом ДСК более подробные исследования тепловой денатурации F-актина [65]. Было показано, что термостабильность F-актина сильно зависит от концентрации нуклеотида (АДФ или АТФ). Температура максимума теплового перехода F-актина (T_m) возрастает с увеличением концентрации АДФ вплоть до 1 мМ и выходит на плато при более высоких концентрациях АДФ (рис. 7А). Это наводит на мысль о том, что необратимой тепловой денатурации F-актина предшествует обратимая стадия диссоциации нуклеотида (АДФ) из субъединиц актина. Величина T_m зависит также от концентрации F-актина: она увеличивается на ~3 °C при повыше-

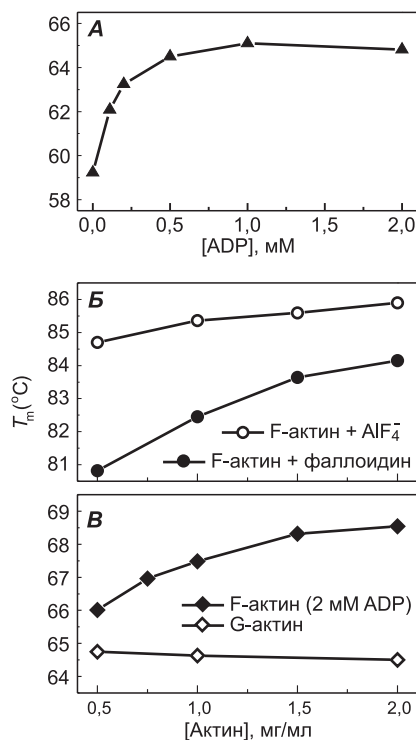


Рис. 7. Зависимости температуры максимума теплового перехода актина (T_m) от концентрации белка и нуклеотида [65]. Скорость нагрева — 1 К/мин.

А. Зависимость T_m для F-актина (1,5 мг/мл) от концентрации ADP.

Б. Зависимость T_m от концентрации белка для F-актина, стабилизированного фаллоидином или фторидом алюминия (AlF_4^-).

В. Зависимость T_m от концентрации белка для G-актина (в G-буфере) и для F-актина (в 30 мМ буфере Hepes-KOH, pH 7,3, содержащем 2 мМ $MgCl_2$ и 2 мМ ADP).

нии концентрации белка с 0,5 до 2,0 мг/мл (рис. 7В). Сходная зависимость величины T_m от концентрации белка обнаружена также для F-актина, стабилизированного фаллоидином, в то время как в присутствии AlF_4^- такая зависимость выражена значительно слабее (рис. 7Б). Что касается мономерного G-актина, то в этом случае величина T_m вообще не зависела от концентрации белка (рис. 7В). Согласно современным представлениям, зависимость величины T_m от концентрации белка характерна для тепловой денатурации олигомерных белков, и наличие такой зависимости свидетельствует о том, что необратимой тепловой денатурации белковых субъединиц предшествует обратимая стадия их диссоциации из состава олигомера [49, 84].

Таким образом, полученные нами результаты наводят на мысль о том, что необратимой тепловой денатурации F-актина предшествуют по крайней мере две обратимые стадии. Одна из них — диссоциация нуклеотида (ADP) из субъединиц актина, а другая — диссоциация субъединиц от актиновых филаментов. На основании этого механизм тепловой денатурации филаментов F-актина можно представить следующим образом. Сначала актиновые мономеры (или короткие олигомеры) диссоциируют с одного из концов актинового филамента (с «—»-конца). Затем эти мономеры либо утрачивают связанную ADP, после чего сразу денатурируют, либо содержащие ADP мономеры вновь могут связываться с актиновым филаментом — но

уже скорее всего с другим (соседним) и с другого конца (с «+»-конца). Эта модель позволяет объяснить, почему тепловая денатурация актина зависит как от концентрации ADP, так и от концентрации белка.

Важно отметить, что фаллоидин и AlF_4^- существенно отличаются друг от друга по их влиянию на зависимость T_m от концентрации белка (рис. 7Б). Оба эти стабилизирующих агента резко увеличивают термостабильность F-актина (рис. 6), хотя делают это независимо друг от друга [5]. Фаллоидин повышает термостабильность F-актина, усиливая связи между соседними субъединицами в актиновом филаменте, тогда как AlF_4^- оказывает сходный эффект путем прочного удерживания ADP в нуклеотид-связывающем центре актина. Таким образом, AlF_4^- , имитирующий промежуточное состояние ADP-P_i -актин в цикле полимеризации актина, должен препятствовать диссоциации ADP из субъединиц актина и, с другой стороны, стимулировать присоединение актиновых мономеров к «растущему» «+»-концу филамента. В свете предложенной выше модели это означает, что AlF_4^- может оказывать влияние на обе обратимые стадии, предшествующие необратимой тепловой денатурации F-актина, делая таким образом зависимость T_m от концентрации F-актина менее выраженной и приближая ее к зависимости, характерной для мономерных белков.

Взаимодействие F-актина с другими белками

Актиновые филаменты могут взаимодействовать с множеством других белков. Прежде всего это взаимодействие F-актина с головками миозина и регуляторными мышечными белками (тропомиозин и тропонин в скелетных и сердечных мышцах или кальдесмон и кальпонин в гладких мышцах), которое играет ключевую роль в молекулярном механизме и регуляции мышечного сокращения. В неммышечных клетках актиновые филаменты высокодинамичны и участвуют во множестве протекающих в клетке процессов, таких как деление и движение клеток, эндоцитоз, внутриклеточный транспорт и т. д. Структура и динамика актиновых филаментов регулируются множеством актин-связывающих белков [31]. Актиновые филаменты могут также взаимодействовать с плазматической мембраной — напрямую или косвенно, при помощи актин-связывающих белков, и такое взаимодействие имеет большую важность для многих процессов, протекающих в живых клетках — таких, как экзоцитоз, фагоцитоз и цитокинез.

Тепловая денатурация F-актина в комплексах с миозином, тропомиозином и регуляторными белками мышц. Хотя связывание миозиновых головок с F-актином существенно повышает их термостабильность, оно не оказывает заметного влияния на тепловую денатурацию F-актина как в присутствии фаллоидина [5, 70, 77] (рис. 3А), так и в его отсутствие [71]. Мы также не наблюдали никаких изменений в

тепловой денатурации F-актина при исследованиях методом ДСК его комплексов с тропомиозином из скелетных [2] или гладких [58] мышц, а также с кальдесмоном и кальпонином. Мы наблюдали заметные изменения тепловой денатурации F-актина лишь в присутствии тропонина I — одного из компонентов тропонинового комплекса. Такие изменения выражались в значительном снижении энтальпии и кооперативности денатурации F-актина [2]. Эти данные свидетельствуют о взаимодействии между тропонином I и F-актином. Эффект тропонина I был гораздо слабее в том случае, когда его добавляли к F-актину, стабилизированному AlF_4^- [2]. По-видимому, такая стабилизация F-актина предотвращает влияние тропонина I на структуру актиновых филаментов.

Влияние кофилина на тепловую денатурацию F-актина. До настоящего времени почти ничего не было известно о том, как актин-связывающие белки влияют на тепловую денатурацию F-актина. Одной из первых работ в этом направлении является наша попытка применить метод ДСК для исследования тепловой денатурации F-актина в его комплексах с небольшим актин-связывающим белком кофилином. Известно, что кофилин может связываться как с мономерным G-актином, так и с филаментами F-актина, ускоряя деполимеризацию актиновых филаментов [31]. Нам удалось показать, что связывание кофилина заметно повышает термостабильность G-актина; что касается F-актина, то для него наблюдались два совершенно противоположных эффекта кофилина — в зависимости от степени насыщения F-актина кофилином [30, 69]. При насыщающих концентрациях кофилина он стабилизирует F-актин, т. е. значительно увеличивает его термостабильность, тогда как при низких концентрациях, недостаточных для насыщения, кофилин вызывает резкое снижение термостабильности F-актина (рис. 8). Такой дестабилизирующий эффект кофилина обладает очень высокой кооперативностью, поскольку он проявляется даже при очень низких молярных отношениях кофилин/актин — таких, как одна молекула кофилина на 100–200 мономеров актина. На основании этих интригующих результатов, полученных методом ДСК, было высказано предположение, что кофилин, связываясь с F-актином в субнасыщающих концентрациях, стабилизирует лишь те актиновые субъединицы, с которыми он непосредственно связывается, но при этом дестабилизирует с очень высокой кооперативностью соседние области актинового филамента, состоящие из свободных от кофилина субъединиц [30, 69]. Не исключено, что эти два совершенно противоположных эффекта кофилина, стабилизация и дестабилизация актиновых филаментов, впервые обнаруженные при помощи метода ДСК, могут играть важную роль в динамике актиновых филаментов в живых клетках.

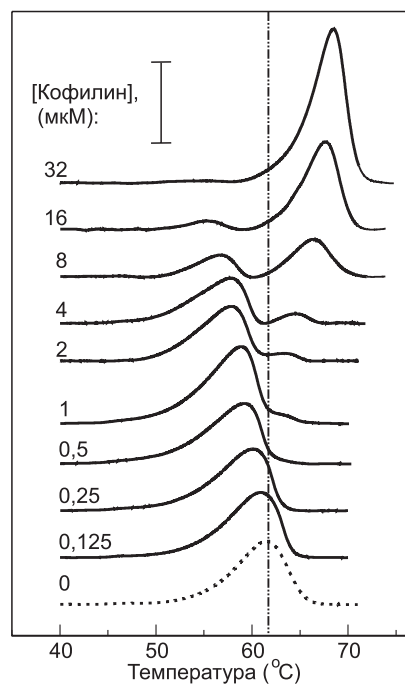


Рис. 8. Кривые ДСК для комплексов F-актина с кофилином, полученных при различных молярных отношениях кофилин/актин.

Концентрация F-актина была неизменной и составляла 25 мкМ. Концентрации кофилина указаны на каждой кривой. Вертикальная пунктирная линия проведена через максимум теплового перехода F-актина, свободного от кофилина ($T_m = 61,5\text{ }^\circ\text{C}$). Вертикальная метка соответствует 25 мкВт. Скорость нагрева – 1 К/мин.

Взаимодействие актина с мембранными липидами

В литературе имеется лишь одна работа по изучению взаимодействия F-актина с липидами мембран методом ДСК [33]. Очень интересный эффект наблюдался при таком взаимодействии: было показано, что при взаимодействии с липосомами актин подвергается глобальным конформационным изменениям, которые приводят к полному исчезновению его теплового перехода на термограмме.

IV. ТРОПОМИОЗИН

Тропомиозин (Tm) ассоциирован с актиновыми филаментами во всех типах мышц и играет важную роль в регуляции мышечного сокращения. Молекула Tm представляет собой димер, состоящий подобно стержневой части миозина из двух полипептидных цепей, с содержанием α -спиралей, близким к 100%. При взаимодействии с F-актином молекулы Tm связываются друг с другом своими концами, образуя непрерывную нить вдоль всего актинового филамента. Вместе с другими регуляторными белками мышц, тропонином в ске-

летных и сердечных мышцах или кальдесмоном в гладких мышцах, Tm участвует в Ca^{2+} -регуляции мышечного сокращения. В скелетных и гладких мышцах экспрессируются две изоформы Tm (α и β); каждая изоформа состоит из 284 аминокислотных остатков. В гладких мышцах содержится одинаковое количество α и β цепей Tm и молекулы Tm представлены главным образом $\alpha\beta$ -гетеродимерами. В скелетных мышцах α и β цепи Tm присутствуют в соотношении (3-4) : 1 и поэтому он может образовывать все три возможные типа димеров: $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, и $\alpha\beta$. При физиологических условиях скелетный Tm представляет собой смесь $\alpha\alpha$ -гомодимеров и $\alpha\beta$ -гетеродимеров.

ТЕПЛОВАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ТРОПОМИОЗИНА И ЭФФЕКТЫ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ

К настоящему времени тепловая денатурация гомодимеров Tm из скелетных и гладких мышц достаточно подробно исследована методом ДСК. Как установили еще в 1982 г. Потехин и Привалов [79], а впоследствии подтвердили и многие другие авторы [72, 73, 90], молекула Tm состоит из кооперативных блоков с разной термостабильностью. К примеру, $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеры мышечного Tm демонстрируют широкие тепловые переходы, состоящие по меньшей мере из трех отдельных переходов (калориметрических доменов) [72, 73]. Напротив, $\alpha\beta$ -гетеродимеры Tm из гладких мышц давали узкие тепловые переходы, состоящие только из двух калориметрических доменов [73]. Более того, при исследованиях методом ДСК удалось отчетливо продемонстрировать образование $\alpha\beta$ -гетеродимеров гладкомышечного Tm из эквимоллярной смеси $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомодимеров [73].

Каждая цепь димера скелетного Tm (как α , так и β) содержит остаток цистеина в положении 190, и поэтому SH-группы этих остатков могут образовывать дисульфидную связь между двумя цепями димерной молекулы Tm. Еще в 1978 г. было впервые показано, что образование такой связи между двумя цепями Tm значительно увеличивает термостабильность скелетномышечного Tm [48].

Кривая ДСК скелетномышечного Tm представлена двумя хорошо разрешимыми пиками с максимумами при $\sim 43^\circ C$ и $\sim 54^\circ C$ (рис. 9А). Низкотемпературный пик проявляется лишь у препаратов Tm с восстановленными SH-группами, но полностью исчезает в условиях, способствующих образованию дисульфидной сшивки между остатками Cys-190 двух цепей Tm. Это вполне согласуется с литературными данными о том, что низкотемпературный пик соответствует плавлению С-концевой части молекулы Tm с восстановленными SH-группами остатков Cys-190, тогда как высокотемпературный пик состоит из двух перекрывающихся тепловых переходов, один из которых соот-

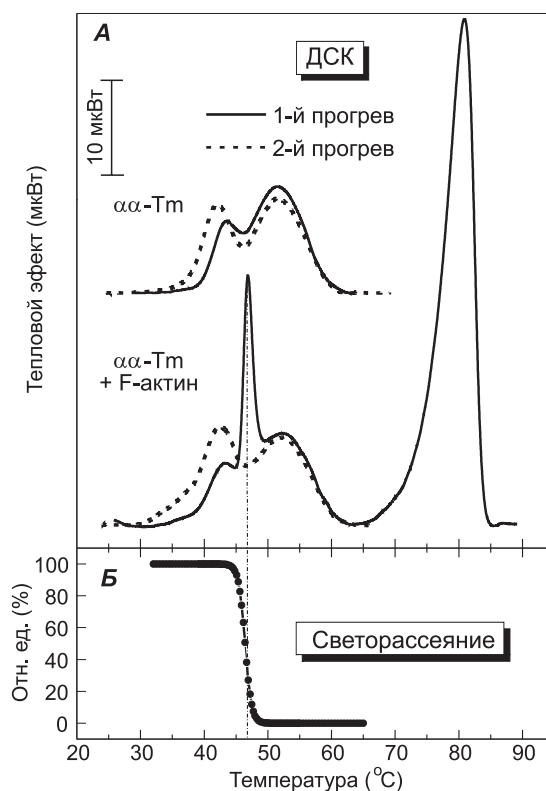


Рис. 9. Температурные зависимости тепловой денатурации связанного с актином тропомиозина и его диссоциации с поверхности актинового филамента [47].

А. Кривые ДСК для комплекса $\alpha\alpha$ -гомомера тропомиозина ($\alpha\alpha$ -Tm) из скелетных мышц кролика с F-актином, стабилизированным фаллоидином. Для сравнения приведены также кривые денатурации $\alpha\alpha$ -Tm, полученные в отсутствие F-актина. Пунктиром показаны кривые, полученные при повторном прогреве соответствующих образцов. Условия: 30 мкМ $\alpha\alpha$ -Tm, 46 мкМ F-актин, 70 мкМ фаллоидин в 20 мМ буфере Нерес-КОН, pH 7,3, содержащем 2 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ β -меркаптоэтанол. Скорость нагрева — 1 К/мин.

Б. Температурная зависимость диссоциации комплекса $\alpha\alpha$ -Tm—F-актин, полученная при измерениях светорассеяния в тех же условиях и при той же скорости нагрева, что и кривая, полученная методом ДСК (А). 100% соответствуют разнице в светорассеянии между комплексом $\alpha\alpha$ -Tm—F-актин при 25 °С и свободным F-актином, стабилизированным фаллоидином, светорассеяние которого не изменялось в исследуемом температурном диапазоне (до 65 °С). Снижение интенсивности светорассеяния отражает диссоциацию комплекса $\alpha\alpha$ -Tm—F-актин.

ветствует N-концевой части Tm, а другой – С-концевой части Tm с остатками Cys-190, сшитыми дисульфидной связью между двумя цепями димера Tm [97].

Таким образом, состояние SH-групп остатков Cys-190 (восстановленное или окисленное с образование дисульфидной связи между двумя цепями димера Tm) играет важную роль в тепловой денатурации Tm, поскольку оно определяет термостабильность С-концевой части молекулы Tm.

КОМПЛЕКСЫ ТРОПОМИОЗИНА С F-АКТИНОМ

Согласно современным представлениям о регуляции взаимодействия миозина с актином в скелетных мышцах, Tm может занимать три разных положения (т. е. находиться в трех разных состояниях) на поверхности актинового филамента в зависимости от присутствия или отсутствия тропонина, миозина и ионов Ca^{2+} : это состояния «В» («blocked» – в присутствии тропонина, но в отсутствие Ca^{2+}), «С» («closed», индуцируемое в присутствии тропонина и Ca^{2+}) и «М» (состояние «open», индуцируемое лишь в присутствии миозина) [52]. В гладких мышцах кальдесмон также может вызывать перемещения Tm между двумя разными состояниями на поверхности актинового филамента [53]. В настоящее время считается общепризнанным, что перемещения Tm на поверхности актина играют ключевую роль в регуляции мышечного сокращения. Согласно последним моделям функционирования Tm, связанный с актином Tm можно рассматривать как длинную гибкую нить, динамические свойства которой в значительной степени определяются внешними воздействиями (такими как присутствие тропонина или связанного с актином миозина) [88]. Изменения гибкости такой нити могут коррелировать с изменениями термостабильности Tm; поэтому исследования методом ДСК тепловой денатурации связанного с актином Tm могут дать ценную информацию о динамических свойствах Tm в различных его состояниях на поверхности актинового филамента. По этим причинам в последнее время в нашем научном коллективе метод ДСК интенсивно используется для исследования тепловой денатурации Tm непосредственно на поверхности актинового филамента.

Недавно методом ДСК было исследовано взаимодействие гладкомышечного Tm с филаментами F-актина [58]. Было показано, что взаимодействие Tm с F-актином вызывает значительное увеличение термостабильности Tm (тепловой переход Tm смещался в сторону более высокой температуры на 2–6 °С в зависимости от молярного отношения Tm/актин), но не оказывает влияния на тепловую денатурацию стабилизированного фаллоидином F-актина, который пла-

вится при значительно более высокой температуре, чем T_m . Существенный сдвиг теплового перехода в присутствии F-актина наблюдали лишь для $\alpha\beta$ -гетеродимеров T_m , но не для гомодимеров. При измерениях температурных зависимостей светорассеяния было также установлено, что тепловая денатурация T_m сопровождается его диссоциацией с поверхности F-актина [58]. Таким образом, использование метода ДСК в комбинации с другими методами представляет собой новый перспективный подход для структурно-функциональных исследований связанного с актином T_m .

В последнее время мы начали применять этот подход для изучения T_m скелетных мышц. Показано, что характер тепловой денатурации T_m существенным образом изменяется при его связывании с F-актином. Это выражается в появлении на кривой теплопоглощения T_m нового высококооперативного теплового перехода с максимумом около 47°C (рис. 9А). После прогрева комплекса T_m -F-актин до 90°C и последующего охлаждения (т. е. после полной необратимой денатурации актина) этот новый пик полностью исчезал и при повторном прогреве на кривой теплопоглощения наблюдались только пики при $42,5$ и $53,5^\circ\text{C}$, соответствующие тепловой денатурации свободного T_m (пунктирные кривые на рис. 9А). Это привело нас к заключению, что появление нового пика при $\sim 47^\circ\text{C}$ в присутствии F-актина отражает тепловую денатурацию связанного с актином T_m . Была также обнаружена очень хорошая корреляция между температурой максимума этого индуцируемого актином нового пика на термограмме ДСК (рис. 9А) и температурой диссоциации комплекса T_m -F-актин (т. е. с той температурой, при которой интенсивность светорассеяния комплекса снижается на 50%) (рис. 9Б). На основании этого можно заключить, что индуцируемые актином изменения в тепловой денатурации T_m связаны с диссоциацией T_m с поверхности актинового филамента. Важно также отметить, что появление в присутствии актина нового пика при $\sim 47^\circ\text{C}$ сопровождается снижением или полным исчезновением (в зависимости от молярного отношения T_m /актин) низкотемпературного пика T_m , хотя высокотемпературный пик T_m при этом практически не меняется (рис. 9А).

Эти результаты привели нас к следующему предположению о механизме тепловой денатурации T_m , связанного с F-актином. По-видимому, F-актин защищает связанный с ним T_m от тепловой денатурации, которая происходит только при диссоциации T_m с поверхности актинового филамента. Поэтому новый кооперативный пик при $\sim 47^\circ\text{C}$, который появляется только в присутствии актина, отражает тепловую денатурацию тех частей молекулы T_m , которые в отсутствие актина должны были денатурировать при более низких

температурах, чем температура диссоциации, но не могли этого сделать в присутствии актина (это касается главным образом низкотемпературного пика свободного Tm, т. е. С-концевой части Tm с восстановленными SH-группами остатков Cys-190). Эти участки Tm денатурируют в присутствии F-актина в очень узком температурном диапазоне, сразу после диссоциации. Все другие более термостабильные части молекулы Tm (N-концевая часть и С-концевая часть с остатками Cys-190, шитыми дисульфидными связями), которые плавятся при более высокой температуре, чем температура диссоциации, денатурируют независимо от актина после диссоциации Tm с поверхности F-актина.

Мы также применили метод ДСК для изучения тепловой денатурации связанного с актином Tm в различных его состояниях на поверхности актинового филамента. Результаты предварительных экспериментов показывают, что переход гладкомышечного Tm в состояние «М», индуцируемое взаимодействием головок миозина с актином, сопровождается значительным увеличением термостабильности связанного с F-актином Tm: максимум его теплового перехода смещается на 5–6 °С в сторону более высокой температуры без особых изменений кооперативности перехода. С другой стороны, переход скелетного Tm в состояние «В», индуцируемый добавлением тропонина в отсутствие Ca^{2+} , приводит к значительному повышению кооперативности тепловой денатурации связанного с актином Tm [2].

Совсем недавно нам удалось весьма успешно применить описанные выше подходы для изучения роли кардиомиопатических мутаций в молекуле Tm. Было показано, что из двух таких мутаций, D175N и E180G, первая не оказывает существенного влияния на тепловую денатурацию связанного с F-актином Tm, тогда как вторая заметно снижает термостабильность Tm, присоединенного к F-актину, и температуру его диссоциации с поверхности актинового филамента [47]. Эти данные впервые позволили объяснить серьезную разницу в физиологических эффектах этих мутаций в молекуле Tm. Известно, что мутация D175N вызывает лишь легкую сердечную недостаточность, тогда как мутация E180G приводит к тяжелой кардиомиопатии зачастую с летальным исходом. Основываясь на результатах наших исследований, можно предположить, что при повышении температуры в сердце всего на несколько градусов (например, при простуде или при интенсивной мышечной деятельности) Tm с мутацией E180G начинает диссоциировать с поверхности актиновых филаментов и денатурировать, что и приводит в конечном счете к столь тяжелым последствиям.

V. ТРОПОНИН

Тропонин (Tn) представляет собой белковый комплекс, состоящий из трех компонентов: Ca^{2+} -связывающего тропонина С (TnC), тропонина I (TnI), который ингибирует АТФазу актомиозина, и тропонина Т (TnT), ответственного за связывание Tn с Tm. В отсутствие Ca^{2+} TnC слабо взаимодействует с другими двумя компонентами тропонинового комплекса, а TnI и TnT прочно связываются с Tm и фиксируют его в «блокирующем» состоянии «В» на поверхности актинового филамента. Связывание Ca^{2+} с TnC усиливает взаимодействия между компонентами тропонинового комплекса и ослабляет их взаимодействие с Tm [13]; в результате связанный с актином Tm переходит из блокирующего положения «В» в положение «С». Таким образом, Tn играет ключевую роль в Ca^{2+} -регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц.

При изучении методом ДСК тепловой денатурации изолированных компонентов тропонинового комплекса было показано, что при прогреве вплоть до 100 °С TnI и TnT не демонстрируют кооперативных тепловых переходов [2, 7]. Калориметрические эффекты этих двух белков удавалось наблюдать лишь косвенно, по влиянию TnI на тепловую денатурацию F-актина и по влиянию TnT на тепловую денатурацию связанного с актином Tm [2]. TnC – единственный из компонентов тропонинового комплекса, обладающий кооперативным переходом при денатурации [43, 93]. Тепловая денатурация TnC была впервые изучена методом ДСК еще в 1980 г. Цалковой и Приваловым [93]. Было показано, что в присутствии двухвалентных катионов кривая теплопоглощения TnC представлена двумя хорошо различимыми отдельными тепловыми переходами, соответствующими двум доменам в молекуле TnC, один из которых содержит участки специфического связывания Ca^{2+} , а другой – неспецифические Ca^{2+} - Mg^{2+} -связывающие участки. При этом оказалось, что связывание Ca^{2+} с Ca^{2+} -специфическими участками очень сильно увеличивает термостабильность домена, содержащего эти участки [93]. Таким образом, применение метода ДСК позволило выявить глобальные структурные перестройки, которые происходят в TnC при специфическом связывании Ca^{2+} и играют важную роль при функционировании TnC в качестве регуляторного белка.

VI. КАЛЬДЕСМОН И КАЛЬПОНИН

В гладких мышцах регуляция сокращения осуществляется главным образом путем фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина специальным ферментом – Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой киназой легких цепей миозина (КЛЦМ). Считается, что в процессе регуляции сокращения гладких мышц участвуют также два белка, кальдесмон и кальпонин, осуществляющие дополнительный контроль сокращения [1]. Оба эти белка ингибируют актин-активируемую АТФазную активность миозина и подавляют в определенных условиях движение актиновых филаментов в *in vitro motility assay*. Кальдесмон способен изменять положение T_m на поверхности актинового филамента [53], но совсем не так, как это делает T_m в скелетных мышцах.

При исследованиях методом ДСК нам не удалось выявить ни для кальдесмона, ни для кальпониона кооперативных тепловых переходов при нагреве вплоть до 100 °С. Более того, нам не удалось обнаружить никакого влияния этих белков на тепловую денатурацию F-актина и связанного с актином T_m . К настоящему времени единственным эффектом кальпониона, наблюдавшимся методом ДСК, было его влияние на фазовые переходы фосфолипидных везикул [22]. Этот факт указывал на то, что кальпонин может взаимодействовать с фосфолипидами и, по-видимому, участвовать в прикреплении актиновых филаментов к клеточной мембране.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая обзор, можно заключить, что применение метода ДСК предоставляет новые (и зачастую уникальные) возможности для структурно-функциональных исследований мышечных белков. Применение этого метода позволяет относительно просто и очень отчетливо выявлять и впоследствии детально исследовать глобальные структурные перестройки, которые происходят в головке миозина в процессе АТФазной реакции и при взаимодействии с актином. Такой подход, в сочетании с использованием других методов, позволяет исследовать взаимосвязи между функционально важными участками, расположенными в миозиновой головке на большом расстоянии друг от друга. Применение метода ДСК представляет собой также новый многообещающий подход для изучения высококооперативных конформационных изменений в актиновых филаментах, индуцируемых различными актин-связывающими белками. Помимо этого, применение метода ДСК в сочетании с другими методами позволяет получать совершенно новую информацию о структурном состоянии тропо-

миозина на поверхности актинового филамента. Таким образом, исследования тепловой денатурации мышечных белков методом ДСК предоставляют новые возможности для регистрации и исследования тех структурных перестроек, которые играют важную роль в функционировании этих белков. Описанные в обзоре подходы могут оказаться весьма полезными для изучения методом ДСК других белков, функционирование которых сопряжено со значительными конформационными изменениями.

Автор выражает глубокую благодарность всем своим сотрудникам, аспирантам и студентам-дипломникам (в том числе и бывшим), в разное время на протяжении многих лет участвовавших в структурно-функциональных исследованиях мышечных белков методом ДСК: Н.Л. Голицыной, О.П. Николаевой, Н.В. Хворову, А.А. Бобкову, И.В. Дедовой, Е.В. Ростковой, Д.А. Павлову, В.Н. Орлову, М.А. Пономареву, О.В. Каспиевой, Е.В. Кремневой, В.В. Михайловой, Л.И. Шакировой, Е.О. Силецкой и Е.О. Зубову.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богачева Н.В., Гусев Н.Б. (1997) Успехи биол. химии, **37**, 3–48.
2. Кремнева Е.В., Николаева О.П., Гусев Н.Б., Левицкий Д.И. (2003) Биохимия, **68**, 976–984.
3. Левицкий Д.И. (1991) Биохимия, **56**, 1539–1566.
4. Левицкий Д.И., Бобков А.А., Голицына Н.Л., Николаева О.П., Павлов Д.А., Поглазов Б.Ф. (1996) Биофизика, **41**, 64–72.
5. Левицкий Д.И., Николаева О.П., Орлов В.Н., Павлов Д.А., Пономарев М.А., Росткова Е.В. (1998) Биохимия, **63**, 381–394.
6. Левицкий Д.И., Хайтлина С.Ю., Гусев Н.Б. В кн.: Белки и пептиды, Т. 1, (под ред. Иванова В.Т., Липкина В.М.), Наука, Москва, 1995. с. 249–293.
7. Морозова Л.А., Гусев Н.Б., Шныров В.Л., Пермяков Е.А. (1988) Биохимия, **53**, 531–540.
8. Павлов Д.А., Бобков А.А., Николаева О.П., Магретова Н.Н., Дедова И.В., Левицкий Д.И. (1995) Биохимия, **60**, 1100–1109.
9. Павлов Д.А., Собешек А, Левицкий Д.И. (1998) Биохимия, **63**, 1116–1128.
10. Поглазов Б.Ф., Левицкий Д.И. Миозин и биологическая подвижность, М.: Наука, 1982. 162 с.
11. Потехин С.А., Трапков В.А., Привалов П.Л. (1979) Биофизика, **24**, 46–50.
12. Татунашвили Л.В., Привалов П.Л. (1984) Биофизика, **29**, 583–585.
13. Филатов В.Л., Катруха А.Г., Буларгина Т.В., Гусев Н.Б. (1999) Биохимия, **64**, 1155–1174.
14. Хворов Н.В., Левицкий Д.И., Букачина Н.С., Шныров В.Л., Поглазов Б.Ф. (1990) Доклады АН СССР, **315**, 745–748.
15. Шныров В.Л., Веденкина Н.С., Островский А.В., Пермяков Е.А., Голицына Н.Л., Левицкий Д.И. (1990) Биофизика, **35**, 415–420.
16. Bertazzon, A., Tian, G.H., Lamblin, A., Tsong, T.Y. (1990) Biochemistry, **29**, 291–298.
17. Bertazzon, A., Tsong, T.Y. (1990) Biochemistry, **29**, 6447–6452.
18. Bertazzon, A., Tsong, T.Y. (1990) Biochemistry, **29**, 6453–6459.
19. Bobkov, A.A., Khvorov, N.V., Golitsina, N.L., Levitsky, D.I. (1993) FEBS Lett., **332**, 64–66.

20. Bobkov, A.A., Levitsky, D.I. (1995) *Biochemistry*, **34**, 9708–9713.
21. Bobkov, A.A., Reisler, E. (2000) *Biophys. J.*, **79**, 460–467.
22. Bogatcheva, N.V., Gusev, N.B. (1995) *FEBS Lett.*, **371**, 123–126.
23. Bombardier, H., Wong, P., Gicquaud, C. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 798–803.
24. Brandts, J.F., Lin, L.-N. (1990) *Biochemistry*, **29**, 6927–6940.
25. Chalovich, J.M., Greene, L.E., Eisenberg, E. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4909–4913.
26. Cheney, R.E., Mooseker, M.S. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 27–35.
27. Combeau, C., Carlier, M.-F. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 17429–17436.
28. Cope, M.J.T.V., Whisstock, J., Rayment, I., Kendrick-Jones, J.K. (1996) *Structure*, **4**, 969–987.
29. Cross, R.A., Bardsley, R.G., Ledward, D.A., Small, J.V., Sobieszek, A. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **145**, 305–310.
30. Dedova, I.V., Nikolaeva, O.P., Mikhailova, V.V., dos Remedios, C.G., Levitsky, D.I. (2004) *Biophys. Chem.*, **110**, 119–128.
31. dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J. (2003) *Physiol. Rev.*, **83**, 433–473.
32. Fisher, A.J., Smith, C.A., Thoden, J., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H.M., Rayment, I. (1995) *Biophys. J.* **68**, 19s–28s.
33. Gicquaud, C. (1993) *Biochemistry*, **32**, 11873–11877.
34. Golitsina, N.L., Bobkov, A.A., Dedova, I.V., Pavlov, D.A., Nikolaeva, O.P., Orlov, V.N., Levitsky, D.I. (1996) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17**, 475–485.
35. Golitsina, N.L., Shnyrov, V.L., Levitsky, D.I. (1992) *FEBS Lett.*, **303**, 255–257.
36. Goodno, C.C. (1982) *Methods Enzymol.* **85**, 116–123.
37. Gopal, D., Bobkov, A.A., Schwonek, J.P., Sanders, C.R., Ikebe, M., Levitsky, D.I., Burke, M. (1995) *Biochemistry*, **34**, 12178–12184.
38. Gopal, D., Burke, M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 19282–19286.
39. Gopal, D., Pavlov, D.A., Levitsky, D.I., Ikebe, M., Burke, M. (1996) *Biochemistry*, **35**, 10149–10157.
40. Harrington, W.F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5066–5070.
41. Hodge, T., Cope, M.J.T.V. (2000) *J. Cell Sci.*, **113**, 3353–3354.
42. Houdusse, A., Szent-Gyurgyi, A.G., Cohen, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11238–11243.
43. Ingraham, R.H., Swenson, C.A. (1983) *Eur. J. Biochem.*, **132**, 85–88.
44. Johnson, K.A., Taylor, E.W. (1979) *Biochemistry*, **17**, 3432–3442.
45. Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C. (1990) *Nature*, **347**, 37–44.
46. Kaspieva, O.V., Nikolaeva, O.P., Orlov, V.N., Ponomarev, M.A., Levitsky, D.I. (2001) *FEBS Lett.*, **489**, 144–148.
47. Kremneva, E., Boussouf, S., Maytum, R., Levitsky, D., Geeves, M. (2003) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**, 345.
48. Krishnan, K.S., Brandts, J.F., Lehrer, S.S. (1978) *FEBS Lett.*, **91**, 206–208.
49. Kurganov, B.I., Kornilaev, B.A., Chebotareva, N.A., Malikov, V.Ph., Orlov, V.N., Lyubarev, A.E., Livanova, N.B. (2000) *Biochemistry*, **39**, 13144–13152.
50. Le Bihan, T., Gicquaud, C. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 542–547.
51. Le Bihan, T., Gicquaud, C. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 1065–1073.
52. Lehman, W., Hatch, V., Korman, V., Rosol, M., Thomas, L., Maytum, R., Geeves, M.A., Van Eyk, J.E., Tobacman, L.S., Craig, R. (2000) *J. Mol. Biol.*, **302**, 593–606.
53. Lehman, W., Vibert, P., Craig, R. (1997) *J. Mol. Biol.*, **274**, 310–317.
54. Levitsky, D.I. Domain structure of the myosin head. In: *Soviet Sci. Rev. – Physico-Chem. Biol.* (Skulachev, V.P.,

- ed), v. 12, Pt. 1, Harwood Acad. Publ. GmbH, 1994. pp. 1–53.
55. *Levitsky, D.I., Khvorov, N.V., Shnyrov, V.L., Vedenkina, N.S., Permyakov, E.A., Poglazov, B.F.* (1990) FEBS Lett., **264**, 176–178.
56. *Levitsky, D.I., Nikolaeva, O.P., Vedenkina, N.S., Shnyrov, V.L., Golitsina, N.L., Khvorov, N.V., Permyakov, E.A., Poglazov, B.F.* (1991) Biomedical Science, **2**, 140–146.
57. *Levitsky, D.I., Ponomarev, M.A., Geeves, M.A., Shnyrov, V.L., Manstein, D.J.* (1998) Eur. J. Biochem., **251**, 275–280.
58. *Levitsky, D.I., Rostkova, E.V., Orlov, V.N., Nikolaeva, O.P., Moiseeva, L.N., Teplova, M.V., Gusev, N.B.* (2000) Eur. J. Biochem., **267**, 1869–1877.
59. *Levitsky, D.I., Shakirova, L.I., Mikhailova, V.V., Siletskaya, E.I., Timofeev, V.P.* (2001) Abstracts of XXX European Muscle Conference (Pavia, Italy, 2001), p. 85.
60. *Levitsky, D.I., Shnyrov, V.L., Khvorov, N.V., Bukatina, A.E., Vedenkina, N.S., Permyakov, E.A., Nikolaeva, O.P., Poglazov, B.F.* (1992) Eur. J. Biochem., **209**, 829–835.
61. *Lopez-Lacomba, J.L., Guzman, M., Cortijo, M., Mateo, P.L., Aguirre, R., Harvey, S.C., Cheung, H.C.* (1989) Biopolymers, **28**, 2143–2159.
62. *Lurinczy, D., Belagyi, J.* (2001) Eur. J. Biochem., **268**, 5970–5976.
63. *Lörinczy, D., Belagyi, J.* (1995) Biophys. Biochem. Res. Commun., **217**, 592–598.
64. *Lörinczy, D., Könczöl, F., Gaszner, B., Belagyi, J.* (1998) Thermochim. Acta, **322**, 95–100.
65. *Mikhailova, V.V., Kurganov, B.I., Levitsky, D.I.* (2003) J. Muscle Res. and Cell Motil., **24**, 329.
66. *Muhlrad, A., Cheung, P., Phan, B.C., Miller, C., Reisler, E.* (1994) J. Biol. Chem., **269**, 11852–11858.
67. *Nakaya, M., Watabe, S., Ooi, T.* (1995) Biochemistry, **34**, 3114–3120.
68. *Nikolaeva, O.P., Dedova, I.V., Khvorova, I.S., Levitsky, D.I.* (1994) FEBS Lett., **351**, 15–18.
69. *Nikolaeva, O.P., Dedova, I.V., Mikhailova, V.V., Levitsky, D.I.* (2002) J. Muscle Res. Cell Motil., **23**, 24–25.
70. *Nikolaeva, O.P., Orlov, V.N., Bobkov, A.A., Levitsky, D.I.* (2002) Eur. J. Biochem., **269**, 5678–5688.
71. *Nikolaeva, O.P., Orlov, V.N., Dedova, I.V., Drachev, V.A., Levitsky, D.I.* (1996) Biochem. Mol. Biol. Internat., **40**, 653–661.
72. *O'Brien, R., Sturtevant, J.M., Wrabl, J., Holtzer, M.E., Holtzer, A.* (1996) Biophys. J., **70**, 2403–2407.
73. *Orlov, V.N., Rostkova, E.V., Nikolaeva, O.P., Drachev, V.A., Gusev, N.B., Levitsky, D.I.* (1998) FEBS Lett., **433**, 241–244.
74. *Orlova, A., Egelman, E. H.* (1993) J. Mol. Biol., **232**, 334–341.
75. *Phan, B.C., Reisler, E.* (1992) Biochemistry, **31**, 4787–4793.
76. *Ponomarev, M., Furch, M., Knetsch, M., Manstein, D., Levitsky, D.* (1999) J. Muscle Res. Cell Motil., **20**, 72.
77. *Ponomarev, M.A., Furch, M., Levitsky, D.I., Manstein, D.J.* (2000) Biochemistry, **39**, 4527–4532.
78. *Ponomarev, M.A., Timofeev, V.P., Levitsky, D.I.* (1995) FEBS Lett., **371**, 261–263.
79. *Potekhin, S. A., Privalov, P.L.* (1982) J. Mol. Biol., **159**, 519–535.
80. *Privalov, P.L.* (1982) Adv. Protein. Chem., **35**, 1–104.
81. *Privalov, P.L., Potekhin, S.A.* (1986) Methods Enzymol., **131**, 4–51.
82. *Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M.* (1993) Science, **261**, 50–58.
83. *Reisler, E., Liu, J.* (1982) J. Mol. Biol., **157**, 659–669.
84. *Sanchez-Ruiz, J.M.* (1992) Biophys. J., **61**, 921–935.

85. *Sellers, J.S., Goodson, H.V., Wang, F.* (1996) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17**, 7–22.
86. *Shnyrov, V.L., Sanchez-Ruiz, J.M., Boiko, B.N., Zhadan, G.G., Permyakov, E.A.* (1997) *Thermochim. Acta*, **302**, 165–180.
87. *Shriver, J.M., Kamath, U.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 2556–2564.
88. *Smith, D.A., Maytum, R., Geeves, M.A.* (2003) *Biophys. J.*, **84**, 3155–3167.
89. *Sturtevant, J.M.* (1987) *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **38**, 463–488.
90. *Sturtevant, J.M., Holtzer, M.E., Holtzer, A.* (1991) *Biopolymers* **31**, 489–495.
91. *Swenson, C.A., Ritchie, P.A.* (1980) *Biochemistry*, **19**, 5371–5375.
92. *Toyoshima, Y.Y., Kron, S.J., McNully, E.M., Niebling, K.R., Toyoshima, C., Spudich, J.A.* (1987) *Nature*, **328**, 536–539.
93. *Tsalkova, T.N., Provalov, P.L.* (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 196–204.
94. *Tsiavaliaris, G., Fujita-Becker, S., Batra, R., Levitsky, D.I., Kull, F.J., Geeves, M.A., Manstein, D.J.* (2002) *EMBO Reports*, **3**, 1099–1105.
95. *Ueno, H., Harrington, W.F.* (1981) *J. Mol. Biol.*, **149**, 619–640.
96. *Werber, M.M., Peyser, Y.M., Muhlrad, A.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 7190–7197.
97. *Williams, D.L., Jr., Swenson, C.A.* (1981) *Biochemistry*, **20**, 3856–3864.
98. *Xie, L., Schoenberg, M.* (1998) *Biochemistry*, **37**, 8048–8053.
99. *Zolkiewski, M., Redowicz, M.J., Korn, E.D., Ginsburg, A.* (1996) *Biophys. Chem.*, **59**, 365–371.
100. *Zolkiewski, M., Redowicz, M.J., Korn, E.D., Hammer J.A., III, Ginsburg, A.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 7876–7883.
101. *Zubov, E.O., Levitsky, D.I.* (2002) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **23**, 15.