

ТРОПОМИОЗИН: ДВОЙНАЯ СПИРАЛЬ ИЗ МИРА БЕЛКОВ

©2011 г. И. А. НЕВЗОРОВ¹, Д. И. ЛЕВИЦКИЙ^{1,2*}

¹*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва;*

²*НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Структура тропомиозина. III. Функциональные свойства тропомиозина. IV. Миопатические мутации в тропомиозинах. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Тропомиозин (ТМ) является одним из ключевых компонентов регуляторного аппарата тонких филаментов во всех типах мышц. Вытянутые молекулы ТМ связываются с семью мономерами актина и тропониновым комплексом в составе тонкого филамента. Современные представления о механизме регуляции сокращения скелетной и сердечной мышцы сформулированы в виде теории «стерического блокирования», согласно которой ТМ способен перемещаться на поверхности актинового филамента, открывая или закрывая участки взаимодействия актина с головками молекул миозина.

Для ТМ характерно наличие 4 генов, которые в результате альтернативного сплайсинга дают суммарно более 30 изоформ. В скелетных мышцах человека ТМ присутствует главным образом в виде гомодимеров α - и β -изоформ, тогда как для гладкой мышцы характерно наличие $\alpha\beta$ -гетеродимеров. Молекула ТМ представляет собой димер α -спиралей, образующих левозакрученную суперспираль (coiled-coil). Это объясняется наличием в первичной структуре ТМ непрерывающихся семичленных повторов (гептад). Ввиду простоты

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; КД – круговой дихроизм; ТМ – тропомиозин; S1 – субфрагмент 1 миозина.

*Адрес для корреспонденции: levitsky@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 09-04-00266 и № 09-04-00339) и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

своего устройства, молекула ТМ представляет собой идеальный объект для изучения взаимосвязи структуры и функции в молекулах белков. В этом отношении особый интерес представляют аминокислотные замены (мутации) в ТМ, ассоциированные с различными заболеваниями – например, миопатиями. Как правило, такие мутации имеют ярко выраженный функциональный фенотип, поэтому изучение вызываемых ими структурных изменений ТМ интересно с точки зрения как фундаментальной науки, так и биомедицины.

До недавнего времени ТМ считался одним из самых типичных представителей класса белков со структурой двойной α -спирали; более того, его часто рассматривали как классический пример белков этого класса. Однако в последнее время накапливается все больше данных о том, что структура молекулы ТМ далеко не так проста, как это считалось ранее. Отмечаются необычные, характерные только для ТМ черты структуры (такие, например, как наличие участков с повышенной конформационной подвижностью), которые обуславливают выполняемые им важнейшие функции в регуляции мышечного сокращения. Одна из главных целей настоящего обзора – проанализировать эволюцию представлений о структуре и функциях ТМ от его открытия в 1946 году до наших дней, уделяя особое внимание тем структурным особенностям молекулы ТМ, которые отличают его от других белков со структурой coiled-coil. При этом сразу оговорим, что вследствие ограниченного объема данного обзора мы не сможем подробно останавливаться на некоторых важных вопросах, связанных со структурой и функциями ТМ. Так, например, мы не сможем уделить должное внимание такому направлению, как анализ особенностей синтеза различных изоформ ТМ (в том числе, альтернативный сплайсинг продуктов генов ТМ). Другой важный вопрос касается роли ТМ в регуляции структуры и функций актинового цитоскелета. И, наконец, в современной литературе появляются многочисленные данные о том, что изменения в синтезе различных изоформ ТМ ассоциированы со злокачественной трансформацией клеток. Рассмотрение этого интересного вопроса также выходит далеко за рамки настоящего обзора.

Таким образом, в обзоре будут представлены и проанализированы результаты многочисленных работ по изучению особенностей структуры ТМ и выполняемых им функций, включая и исследования, проводившиеся в нашем научном коллективе с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). При этом немалое внимание будет уделено анализу тех изменений в структуре и функциях ТМ, которые вызываются одиночными аминокислотными

заменами (мутациями) в его молекуле, ассоциированными с различными заболеваниями – например, миопатиями.

II. СТРУКТУРА ТРОПОМИОЗИНА

ОТКРЫТИЕ ТРОПОМИОЗИНА И ПЕРВОНАЧАЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ О ЕГО СТРУКТУРЕ

Тропомиозин (ТМ) был открыт Bailey в 1946 г. [1] при обработке миофибрилл органическими растворителями, вызывающими избирательную денатурацию миозина. Тогда же была отмечена асимметричная природа данного белка, несмотря на которую ТМ легко кристаллизовался с образованием хрупких пластинок, содержащих ~90% воды. Тогда же было отмечено такое важное свойство растворов ТМ, как высокая вязкость при низкой ионной силе. С помощью электронной микроскопии было показано, что в данных условиях ТМ образует длинные фибриллы приблизительно одинакового диаметра, которые деполимеризуются при повышении ионной силы раствора [2]. На основе этих и ряда других данных Bailey выдвинул предположение о димерной структуре молекулы выделенного им белка, которое впоследствии подтвердилось. Несмотря на это, о функциях ТМ не было известно ничего, кроме предположений о его структурной роли, основанных на фибриллярности белка. Из-за сходства аминокислотного состава и физических свойств, Bailey заключил, что выделенный им белок, скорее всего, является предшественником миозина, поэтому он был назван «тропомиозином». Хотя в дальнейших исследованиях эта гипотеза была опровергнута, в понимании структуры и функции ТМ явно был достигнут определенный прогресс.

Данные по дифракции рентгеновских лучей на тонких пленках ТМ определили его принадлежность к особой группе α -спиральных белков, включающих также α -кератин, миозин, эпидермин и фибриноген (так называемый *k-m-e-f* класс белков). Для того чтобы объяснить природу особой картины дифракции, свойственной данным белкам, в 1953 году Френсис Крик предложил простую и изящную модель упаковки двух (или трех) α -спиралей с образованием суперспирали, или структуры coiled-coil, как назвал ее Крик. Согласно этой модели, спирали удерживаются друг против друга благодаря гидрофобным взаимодействиям, возникающим между остатками, расположенными в районе контакта спиралей. Данные взаимодействия были названы автором «knob into holes», потому что каждый остаток в области

контакта спиралей окружен тремя аминокислотными остатками, принадлежащими другой спирали. Предложенная Криком структура пучка α -спиралей предполагала наличие периодичности в первичной структуре самих спиралей, что было одним из самых важных следствий данной гипотезы [3].

В 1975 году Smillie и соавторы завершили определение первичной структуры ТМ из скелетных мышц кролика. Анализ аминокислотной последовательности (284 аминокислотных остатка) выявил периодическое расположение гидрофобных аминокислот в составе полипептидной цепи. Было показано, что вся первичная структура может быть разбита на семичленные повторы, в которых первый и четвертый остатки имеют неполярный радикал. Таким образом, первичная структура тропомиозина обнаружила полное совпадение с предсказанной Криком структурой coiled-coil [4, 5]. На данном этапе уже не вызывал сомнения тот факт, что молекула ТМ представлена двумя α -спиралями, образующими coiled-coil. Тем не менее, оставалось неясным, расположены ли цепи ТМ «в регистре», поскольку модель Крика не исключала вероятности смещения цепей относительно друг друга на число остатков, кратное семи. В 1975 г. Lehrer показал, что цепи ТМ могут быть химически «сшиты» дисульфидной связью, образованной между остатками Cys190 [6]. Этот результат однозначно показал, что цепи ТМ расположены строго друг напротив друга, т.е. «в регистре». Периодичность структуры ТМ явилась предметом исследования во многих последующих работах. Parry, а также McLachlan и Stewart выявили периодичность расположения заряженных остатков в аминокислотной последовательности ТМ [7, 8]: каждый пятый и седьмой остатки в семичленном повторе обладали заряженным радикалом. Это наблюдение привело к идее о существовании ионных взаимодействий, дополнительно стабилизирующих двойную спираль. Данная гипотеза была подтверждена спустя почти 20 лет, когда O'Shea с соавторами была определена атомная структура транскрипционного фактора GCN4, также обладающего структурой coiled-coil [9]. Таким образом, подводя итоги анализу исторического аспекта изучения ТМ, можно отметить, что до 1990-х годов ТМ считался прототипным белком со структурой типа coiled-coil.

СТРУКТУРА COILED-COIL: ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ И НОМЕНКЛАТУРА

Как показали многочисленные протеомные исследования, coiled-coil является широко распространенным структурным мотивом. Например, структура типа coiled-coil является основой проме-

жуточных филаментов [10]. Кроме того, такие разнообразные белковые молекулы, как молекулярные моторы (миозины, кинезины и динеины), транскрипционные факторы (например, GCN-4 дрожжей) и рецепторы клеточной поверхности (например, macrophage scavenger receptor) – все содержат в своем составе домены со структурой coiled-coil. В функциональном плане такие участки представляют собой, как правило, модули, опосредующие олигомеризацию. Ярким примером является образование гетеродимеров транскрипционных факторов *c-jun* и *c-fos*, за счет образования структуры coiled-coil [11]. Отметим, что нарушение этого процесса ведет к целому ряду последствий, включая раковую трансформацию клетки.

Рассмотрим более детально основные особенности структуры типа coiled-coil. Обычно она состоит из двух-пяти правозакрученных α -спиралей, которые в итоге образуют единую левозакрученную суперспираль. При этом оси α -спиралей не параллельны, а скошены друг относительно друга на 20° . Как отмечалось ранее, для первичной структуры белков типа coiled-coil характерна периодичность: аминокислотная последовательность подобных белков организована в виде повторяющихся мотивов (гептад) из семи аминокислот (рис. 1А) (отсюда выявленное Bailey сходство в аминокислотном составе тропомиозина и стержневой части миозина). В отличие от одиночных α -спиралей, в которых на один виток приходится 3,6 аминокислотных остатков, суперспираль характеризуется 3,5 остатками на виток из-за конформационных ограничений, которые накладывает на α -спирали димеризация. Следовательно, в структуре coiled-coil два витка спирали соответствуют одному гептадному повтору. В гептадах каждой аминокислоте присвоена латинская буква (*abcdefg*). Arndt с соавторами предложили так называемую PV-гипотезу («Peptide Velcro»), суммирующую структурные элементы, необходимые для образования специфической структуры coiled-coil [12]. В первую очередь, гипотеза требует наличия в положениях *a* и *d* гидрофобных остатков (валин, лейцин, изолейцин), которые могут стабилизировать структуру coiled-coil посредством гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Кроме того, положения *e* и *g* должны быть заняты аминокислотами с заряженными радикалами, которые могут образовывать стабилизирующие солевые мостики между соседними спиралями. Оставшиеся позиции *b*, *c* и *f* закреплены за остатками с полярными радикалами, поскольку они формируют поверхность спирали и находятся в непосредственном контакте с растворителем.

Как указывалось выше, взаимодействия между остатками *a* и *d* были предсказаны Ф. Криком и названы «knob into holes». Их суть заключается в том, что каждый остаток в зоне контакта двух спиралей находится в углублении, образованном тремя остатками, принадлежащими соседней спирали (рис. 1Б,В). В результате таких взаимодействий образуется гидрофобный «кор» (гидрофобная основа) суперспирали, что аналогично образованию гидрофобного ядра при сворачивании глобулярных белков. Так же, как и в случае глобулярных белков, гидрофобные взаимодействия являются основными детерминантами стабильности молекулы. Hodges и соавторы отмечают, что наиболее стабильные суперспирали характеризуются наибольшим содержанием гидрофобных остатков в положениях *a* и *d* [13]. Систематическое изучение влияния различных остатков в положениях *a* и *d* на стабильность модельных димерных двойных α -спиралей выявило следующую закономерность. Наибольшим стабилизирующим влиянием обладают гидрофобные остатки с радикалами средних размеров (Leu, Ile, Val). Далее следуют гидрофобные остатки с громоздкими радикалами (Tyr, Trp), остатки аланина, незаряженные гидрофильные остатки (Gln, Asn, Ser), положительно заряженные остатки (Arg, Lys), отрицательно заряженные остатки (Glu, Asp), глицин и пролин [14, 15]. Кроме того, показано, что включение не природных аминокислот с повышенной гидрофобностью (например, 5,5,5-трифторлейцина) в гидрофобный кор модельных суперспиралей приводит к дальнейшей стабилизации молекулы [16].

Кроме гидрофобных взаимодействий, для структуры суперспирали также характерны электростатические связи между остатками в положениях *e* и *g* гептадных повторов. Правило формирования таких связей формулируется как $i \rightarrow i' + 5$, т.е., *g*-остаток одной спирали образует ионную пару с остатком *e* следующей гептады другой спирали (обычно, глутамат с лизином). Такие взаимодействия выполняют несколько важных функций. Во-первых, это дополнительная стабилизация структуры coiled-coil. По расчетам, выполненным Hodges с соавторами, образование одной ионной пары вносит вклад в стабильность суперспирали, примерно равный 1,5 кДж/моль [17]. Во-вторых, формирование таких связей обуславливает специфичность образования структуры coiled-coil. Природа заряженных остатков в положениях *e* и *g* влияет на образование гомо- или гетеродимеров α -спиралей, а также суперспиралей с параллельной или антипараллельной ориентацией субъединиц [18]. Отметим, что описанные выше взаимодействия характеризуют только общие принципы организации структуры coiled-coil. В случае каждого

отдельного белка могут иметь место иные взаимодействия между аминокислотными остатками α -спиралей, которые обуславливают стабильность, специфичность образования и олигомерный статус суперспирали.

Ошибочно полагать, что структура всех известных белков этого класса соответствует канонической двойной спирали (сформулированной в виде PV-гипотезы). В литературе имеются многочисленные примеры отклонений от канонической структуры, которые часто встречаются в суперспиральных белках и, так или иначе, важны для их функционирования. Например, сегмент 2В молекулы виментина (белок промежуточных филаментов) образует двойную спираль, для которой характерно прерывание гептадной структуры – наличие трех дополнительных остатков, которые локально нарушают периодичность аминокислотной последовательности (так называемый «stutter») [19]. Благодаря этому происходит локальное расплетание двойной спирали [10], что, как выяснилось, важно для правильной ассоциации мономеров виментина с образованием промежуточных филаментов [20]. Кроме того, для некоторых белков со структурой coiled-coil характерно наличие полярных или заряженных остатков в гидрофобном коре. Например, в двуспиральном домене гемагглютинина вируса гриппа имеется остаток His106, ионизация которого при понижении pH лежит в основе конформационных перестроек молекулы, являющихся частью механизма проникновения вируса в клетку [21]. Транскрипционный фактор GCN-4 дрожжей характеризуется структурой coiled-coil с высоким содержанием остатков лейцина в гидрофобном коре («leucine zipper»). Тем не менее, в одном из α -положений молекулы имеется консервативный остаток аспарагина, который удивительным образом обуславливает предпочтительное формирование димерного, а не тримерного белка [18]. Таким образом, приведенные примеры показывают, что наличие в структуре неканонических остатков (т.е. остатков, противоречащих логике устройства суперспирали coiled-coil) зачастую является необходимым условием для выполнения белками своих уникальных функций.

Факторы, определяющие стабильность структуры coiled-coil

Кратко суммируем те факторы, которые обуславливают стабильность белков со структурой coiled-coil.

1) Поскольку структура coiled-coil по сути является пучком α -спиралей, то ее стабильность будет напрямую определяться стабильностью этих спиралей. Данный параметр, как известно, напрямую зависит

от аминокислотной последовательности, поскольку аминокислоты различаются по так называемой *спиралеобразующей способности* (helical propensity). Согласно экспериментам по измерению энергии стабилизации α -спирали разными аминокислотами, наибольшей спиралеобразующей способностью обладают метионин, аланин, лейцин, глутамат (в незаряженной форме) и лизин. С другой стороны, наименьшей способностью образовывать α -спирали характеризуются пролин и глицин. Пролин, являясь аминокислотой, привносит $\sim 30^\circ$ -ый излом в структуру α -спирали, тогда как глицин обладает дестабилизирующим влиянием ввиду своей высокой конформационной подвижности и, как следствие, влияния энтропийного фактора [22].

2) *Гидрофобность аминокислотных остатков, расположенных в участках контакта α -спиралей, и благоприятные электростатические взаимодействия* (рассматривались выше).

3) *Плотность упаковки гидрофобного кора молекулы*. Hodges ввел понятие стабилизирующих и дестабилизирующих кластеров, под которыми понимаются группы аминокислотных остатков, стабилизирующих (Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr) или дестабилизирующих (Gly, Ala, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln, His, Arg, Lys, Trp) гидрофобный кор coiled-coil (рис. 1А). Было отмечено, что в структуре многих природных coiled-coil (включая ТМ и стержневую часть миозина) наблюдается чередование кластеров обоих типов, а также участков, в которых дестабилизирующие остатки чередуются со стабилизирующими [23]. Экспериментальные данные [24] показывают, что такие участки существенно дестабилизируют структуру coiled-coil, в основном из-за пониженной плотности упаковки гидрофобного кора и его доступности для молекул растворителя.

ИЗОФОРМЫ ТРОПОМИОЗИНА И ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЕ

Присутствие ТМ отмечено как в мышечной ткани, так и в клетках немышечного типа (тромбоциты, клетки мозга, фибробласты) [25]. Кроме того, ТМ двух типов были найдены в клетках дрожжей [26]. Исследования в рамках проекта «Геном человека», а также достижения функциональной геномики и молекулярного клонирования показали наличие у человека 4 генов ТМ: *TPM1* (ранее именовавшийся α -Tm), *TPM2* (β -Tm), *TPM3* (γ -Tm, hTm30nm или hTmnm) и *TPM4* (δ -Tm, hTm30pl или hTmpl). Хромосомная локализация этих генов следующая: *TPM1* – 15q22.1, *TPM2* – 9p13.2-p13.1, *TPM3* – 1q21.2, *TPM4* – 19p13.1. Альтернативный сплайсинг, использование альтернативных промоторов и участков полиаденилирования обуславливает наличие в транскрипте человека по меньшей мере 22 различных

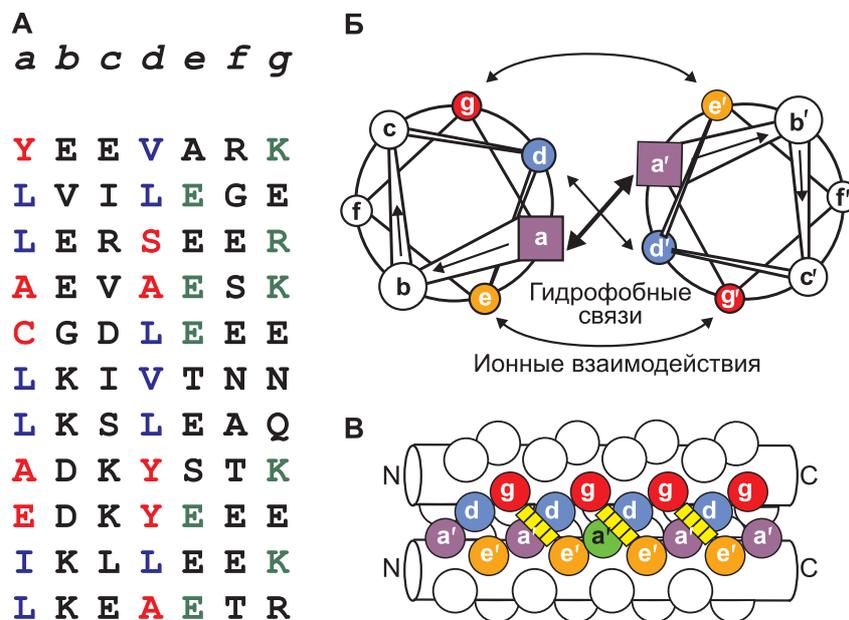


Рис. 1. Особенности структуры типа coiled-coil.

А – фрагмент аминокислотной последовательности белка со структурой coiled-coil (в качестве примера приведен участок последовательности β -изоформы гладкомышечного ТМ). Каждая строка из 7 букв соответствует одному гептадному повтору. Разными цветами обозначены стабилизирующие (синие), дестабилизирующие (красные) и заряженные (зеленые) остатки.

Б – взаимодействие двух α -спиралей в составе структуры coiled-coil (вид «с торца»);

В – то же (вид «в профиль»).

мРНК, содержащих полноразмерные рамки считывания ТМ, что было подтверждено их клонированием из клеток и тканей человека [27]. Исторически тропомиозины разделяют на две группы по количеству аминокислотных остатков: 1) ТМ с высокой молекулярной массой (НМВ), содержащие от 281 до 284 аминокислотных остатков; 2) ТМ с низкой молекулярной массой (ЛМВ), содержащие 247 аминокислот в первичной структуре. Все мышечные ТМ относятся к группе НМВ, в то время как большинство немускульных – к группе ЛМВ. Такое различие в размерах является следствием использования альтернативных промоторов при транскрипции генов ТРМ – внешнего (в случае НМВ) и внутреннего (в случае ЛМВ) [28].

Учитывая то, что первоначально ТМ был выделен и охарактеризован как мышечный белок, рассмотрим состав изоформ ТМ мышц. В скелетной мышце млекопитающих было показано наличие транскриптов четырех изоформ ТМ и трех соответствующих им белковых продуктов [29]. Экспрессия двух транскриптов, α -Тм_{fast} (кодируется геном *TPM1*) и α -Тм_{slow} (кодируется геном *TPM3*), приурочена к быстрым и медленным мышечным волокнам, соответственно. Два других транскрипта, β -Тм (продукт гена *TPM2*) и Тм4 (продукт гена *TPM4*), экспрессируются в обоих типах волокон. Белки α -Тм_{fast}, α -Тм_{slow} и β -Тм были идентифицированы в составе скелетных мышц, тогда как белковый продукт Тм4 обнаружен не был. Наблюдения показывают, что β -Тм приурочен в основном к окислительным волокнам; соответственно, данная изоформа может быть найдена в волокнах типа 1 (медленные, окислительные) и 2А (быстрые, окислительные), но не в волокнах типа 2В (быстрые, гликолитические). Изоформа α -Тм_{fast} является основным и, зачастую, единственным ТМ сердечной мышцы, хотя имеются сведения о том, что содержание β -Тм в сердце парадоксальным образом зависит от размера животного: в сердце мыши β -Тм практически отсутствует, тогда как в сердце человека соотношение β -Тм/ α -Тм_{fast} равно $\sim 1/5$ [25, 30]. Имеющиеся в литературе данные относительно количественных соотношений изоформ весьма противоречивы. Считается, что в скелетных мышцах соотношение всех α -изоформ и β -Тм составляет (3–4):1 [25]. Таким образом, возможно существование трех типов димерных молекул ТМ: $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ и $\beta\beta$. При этом *in vivo* ТМ скелетной мышцы на 90% представлен первыми двумя типами ($\alpha\alpha$ и $\alpha\beta$) [25]. Недавно было показано, что некоторые мутации в гене *TPM2*, приводящие к нарушениям в функционировании опорно-двигательного аппарата, влияют на количественный состав изоформ ТМ в скелетной мышце [31]. При этом наблюдается повышение уровня экспрессии β -Тм и преимущественное образование $\beta\beta$ -гомомеров вместо $\alpha\beta$ -гетеродимеров, что, по мнению авторов, влечет за собой патологические последствия. Два типа тропомиозиновых цепей, α и β , различаются всего по 39 аминокислотным остаткам ($\sim 14\%$), причем α -цепь содержит всего один остаток цистеина (Cys190), тогда как β -цепь – два остатка (Cys36 и Cys190).

В гладкой мышце основными изоформами ТМ являются Тм6 (гладкомышечная изоформа α -Тм, продукт гена *TPM1*) и Тм1 (гладкомышечная изоформа β -Тм, продукт гена *TPM2*) [27], причем каждая цепь ТМ содержит единственный остаток цистеина – Cys190 в α -цепи и Cys36 в β -цепи. В отличие от скелетных мышц, в гладких

мышцах (например, в мускульных желудках курицы) ТМ представлен практически исключительно в виде гетеродимеров α -Тм/ β -Тм [32].

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ТРОПОМИОЗИНА

Как уже отмечалось выше, молекула наиболее хорошо изученного ТМ (α -ТМ скелетных мышц) состоит из двух цепей, каждая из которых включает 284 аминокислотных остатка. Это соответствует 40 полным гептадам. Наиболее яркой отличительной чертой молекулы ТМ является то, что ее гептадная последовательность никогда не прерывается (не образует «stutter», описанный выше). Единственным, но примечательным исключением являются тропомиозины, выделенные из пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В этом случае в молекуле ТМ имеются «паузы» – участки нарушения гептадной периодичности [33], которых нет во всех прочих исследованных ТМ. В литературе имеется множество примеров анализа первичной структуры ТМ. К. Holmes в одной из статей пишет, что «the periodic features of tropomyosin are a numerologist's dream» [34]. О периодичности, имеющей отношение к актин-связывающим свойствам ТМ, будет сказано ниже. Здесь же отметим, что для ТМ, как и для других белков со структурой coiled-coil, характерно наличие стабилизирующих и дестабилизирующих кластеров в гидрофобном коре (см. выше). По данным Hodges, в молекуле α -ТМ скелетных мышц человека имеется 9 стабилизирующих и 6 дестабилизирующих кластеров [23]. Кроме того, имеются участки, в которых наблюдается чередование стабилизирующих и дестабилизирующих аминокислот (например, остатки 100–190 – т.е., центральная часть молекулы ТМ). Таким образом, этим участкам должна быть свойственна низкая компактность гидрофобного кора двойной спирали и, следовательно, низкая стабильность структуры [24]. Еще одно интересное наблюдение касается того, что самым распространенным дестабилизирующим остатком в молекуле ТМ является аланин. Учитывая то, что Ala обладает очень высокой спиралеобразующей способностью, можно заключить, что эволюция структуры ТМ шла в направлении локальной дестабилизации двойной спирали coiled-coil при сохранении стабильности α -спиральной структуры в целом.

СТАБИЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЫ ТРОПОМИОЗИНА

Структура coiled-coil уникальна тем, что в отличие от других структур, сделать предсказания относительно ее стабильности можно исходя из аминокислотной последовательности белка. Разумеется, интересно проследить такую взаимосвязь и в случае ТМ, изучению

стабильности которого (главным образом – термостабильности) было посвящено большое количество работ.

Арсенал экспериментальных подходов к изучению ТМ весьма широк, что объясняется особенностями структуры белка. Поскольку coiled-coil – это α -спиральная структура, то для изучения термостабильности ТМ, очевидно, применим метод, основанный на регистрации температурных зависимостей кругового дихроизма (КД). Как известно, спектры КД α -спиральных структур характеризуются ярко выраженным отрицательным максимумом при длине волны $\lambda = 222$ нм. Соответственно, температурные зависимости КД при данной длине волны дают представление об утрате спиральности с ростом температуры. Используя данный подход, Lehger показал, что тепловая денатурация ТМ носит обратимый характер и профиль температурной зависимости КД α -ТМ из скелетных мышц кролика характеризуется сильным падением спиральности, наблюдаемым в диапазоне 40–50°C [35]. Зависимость температуры полуперехода от концентрации белка означала, что денатурация ТМ сопровождается обратимой диссоциацией составляющих его цепей. Позже это было подтверждено Holtzer и соавторами, которые изучали температурные зависимости светорассеяния α -ТМ из скелетных мышц кролика [36]. Кроме того, было показано, что этому главному переходу на кривых температурных зависимостей предшествует небольшой «предпереход» (pre-transition), природа которого оставалась неясной [37]. Таким образом, было впервые высказано предположение о том, что плавление ТМ представляет собой не простой одноступенчатый обратимый процесс, а сопровождается образованием частично развернутого интермедиата. Помимо этого, выяснилось, что наличие так называемого «предперехода» зависит от состояния сульфгидрильных групп единственного в молекуле скелетномышечного α -ТМ остатка Cys190 и проявляется только при образовании дисульфидной связи между цепями ТМ [35]. На основании этих данных был сделан вывод о том, что дисульфидная связь привносит конформационное напряжение и, следовательно, дестабилизацию в молекулу ТМ. Другим важным достижением была идентификация участка молекулы, соответствующая «предпереходу». С помощью метода химического образования дисульфидных связей [6] было показано, что при температурах, предшествующих главному переходу, происходит локальное разворачивание ТМ в районе Cys190 [35]. Таким образом, впервые было введено понятие о локальной денатурации (local unfolding) и выдвинуто предположение о пониженной стабильности центральной части молекулы ТМ. При

рассмотрении работ по КД в применении к ТМ, необходимо также упомянуть исследования Greenfield и Hitchcock-DeGregori, которые внесли фундаментальный вклад в изучение структуры и стабильности ТМ. В частности, они показали, что тепловая денатурация α -ТМ из скелетных мышц не является полностью кооперативным процессом. Используя разнообразные подходы к деконволюции спектров КД, ими было показано, что при повышении температуры от 0°C до 25°C наблюдается уменьшение вклада структуры coiled-coil в спектр КД, тогда как α -спиральность увеличивается, а вклад неупорядоченной структуры не изменяется. В процессе главного перехода, как и следовало ожидать, происходит уменьшение доли как структуры coiled-coil, так и α -спирали при параллельном увеличении доли неупорядоченной структуры [38].

Другим важным подходом для изучения стабильности и конформационных свойств ТМ послужил метод, основанный на флуоресценции эксимеров пирена. В каждой из цепей ТМ обычно присутствует единственный остаток цистеина – Cys190 в случае α -ТМ скелетных и гладких мышц или Cys36 в случае β -ТМ гладких мышц (исключением является β -ТМ скелетных мышц, в каждой цепи которого содержатся сразу два остатка цистеина – Cys190 и Cys36). Это позволяет произвести специфическую модификацию белка флуоресцентным красителем, в частности пиреном (обычно используется либо пиренил-йодацетамид, либо пиренил-малеимид). Особенностью пирена является способность его молекул образовывать эксимеры при контакте двух молекул пирена друг с другом. Эксимеры представляют собой возбужденные димеры (excited dimers) и характеризуются более длинноволновым максимумом пика флуоресценции по сравнению с мономерной формой пирена [39]. Соответственно, конформационные изменения в районе остатка цистеина, модифицированного пиреном, будут сказываться на квантовом выходе эксимерной флуоресценции. Использование данного подхода позволило установить несколько важных фактов. Во-первых, была подтверждена пространственная близость остатков Cys190, принадлежащих разным цепям молекулы ТМ [39]. Во-вторых, в той же работе было показано, что плавление ТМ сопровождается полным тушением эксимерной флуоресценции, что подтверждает диссоциативный механизм денатурации ТМ. В-третьих, было показано, что пиреновая метка, присоединенная к ТМ, существует в двух равновесных конформациях: конформации «А», характеризующейся низким выходом эксимерной флуоресценции, и конформации «В», в которой образование эксимеров более благоприятно [40]. При этом конформация В характеризуется локальным

расхождением цепей ТМ в районе метки, что и объясняет большой выход эксимерной флуоресценции. Кривая температурной зависимости эксимерной флуоресценции пиренил-меченного ТМ характеризуется подъемом и резким падением. Такую форму кривой легко объяснить перераспределением пиреновых меток между популяциями «А» и «В» в температурно-зависимом режиме [40]. Таким образом, применение пиреновых меток позволило подтвердить ранее высказанное предположение о том, что тепловая денатурация ТМ происходит с образованием интермедиата, характеризующегося локальным расхождением цепей в районе Cys190. Это означает, что денатурация ТМ происходит по более сложному механизму, чем обратимый одностадийный переход, и может быть описана следующей схемой: $NN \leftrightarrow XX \leftrightarrow 2D$, в которой NN соответствует нативному состоянию димера ТМ с А-конформацией пирена, в промежуточном состоянии XX преобладает В-конформация пирена, а состояние $2D$ соответствует двум отдельным цепям ТМ после диссоциации димера [41]. Кроме того, использование пиренил-меченого ТМ сыграло впоследствии большую роль в изучении его регуляторных свойств.

Весьма полезным инструментом для изучения стабильности и конформационных свойств ТМ оказался метод ограниченного протеолиза. Самые ранние работы по расщеплению ТМ трипсином относятся к 1960–1970 г.г. Уже тогда Ooi [42], а также Gorecka и Drabikowski [43] показали, что инкубация ТМ в присутствии трипсина сопровождается образованием фрагментов с молекулярными массами 17, 19 и 12 кДа. Впоследствии Smillie с сотрудниками установили, что первичное расщепление молекулы ТМ трипсином происходит между остатками Arg133 и Ala134 [44]. Для ТМ, как белка со структурой coiled-coil, характерно наличие большого количества заряженных остатков (как правило, в положениях *e* и *g*). Этим объясняется наличие в ТМ большого количества равномерно распределенных по молекуле потенциальных участков расщепления трипсином, поскольку данная протеаза активна по отношению к пептидной связи между аргинином и любым другим остатком (кроме пролина). Таким образом, расщепление трипсином может быть использовано в качестве метода изучения локальной стабильности молекулы ТМ. Поскольку первичное расщепление ТМ трипсином происходит только в одном месте (между Arg133 и Ala134), был сделан вывод о том, что центральная часть молекулы ТМ обладает наименьшей стабильностью, т.е. наибольшей конформационной подвижностью [45]. В 1984 г. Ueno провел детальный кинетический анализ триптического расщепления ТМ. Им было установлено, что константа скорости расщепления зависит от таких

факторов, как температура и наличие дисульфидной связи между остатками Cys190, введение которой вызывало увеличение скорости трипсинолиза по Arg133 [45]. Сопоставление результатов трипсинолиза с данными, полученными с помощью КД и пиреновых эксимеров, позволило сделать вывод о том, что упомянутый выше интермедиат плавления ТМ, который соответствует т.н. предпереходу на кривых температурных зависимостей КД, характеризуется частично развернутой структурой участка, включающего остатки 130–190, т.е. средней части молекулы ТМ. Таким образом, была сформулировано представление о центральной части ТМ как о наименее стабильном участке молекулы. Тем не менее, оставалось непонятным, что обуславливает низкую стабильность данного участка.

В 2008 году Lehger с соавторами опубликовали очень интересную работу, имеющую непосредственное отношение к данному вопросу. Они предположили, что нестабильность центральной части ТМ связана с присутствием неканонического остатка Asp137 в положении *d* гептадного повтора [46]. Отрицательный заряд, вносимый этим остатком в гидрофобный кор молекулы, теоретически может обуславливать электростатическое расталкивание α -спиралей и, следовательно, приводить к дестабилизации структуры coiled-coil. Авторы подтвердили данную гипотезу, используя мутантный ТМ, несущий замену Asp137Leu. Было показано, что мутантный белок не подвергался трипсинолизу [46], что подтверждало участие остатка Asp137 в дестабилизации центральной части молекулы ТМ. Тем не менее, заряженные остатки в гидрофобном коре молекулы ТМ присутствуют также и в других участках молекулы ТМ (например, остаток Glu218), однако там расщепление не наблюдается, несмотря на наличие потенциальных сайтов трипсинолиза. Это говорит о том, что наряду с присутствием неканонического остатка Asp137, существенную роль в дестабилизации центральной части молекулы ТМ играют какие-то другие факторы, которые до самого последнего времени не были идентифицированы.

Совсем недавно нам удалось внести некоторую ясность в эту проблему. При внимательном анализе аминокислотной последовательности ТМ в центральной части молекулы был обнаружен консервативный дестабилизирующий остаток глицина – Gly126 в положении *g* гептадного повтора, присутствующий практически во всех изоформах ТМ у многих видов животных. Замена этого неканонического остатка глицина на канонические остатки аланина или аргинина вызывала такой же эффект, что и мутация Asp137Leu, т.е. полностью предотвращала расщепление ТМ трипсином по

Arg133 [47]. Такое сходство результатов свидетельствует о том, что неканонические остатки Asp137 и Gly126 действуют согласованно и вызывают дестабилизацию центральной части молекулы ТМ. По-видимому, такая дестабилизация, необходимая для осуществления расщепления по остатку Arg133, достигается только за счет совместного действия остатков Asp137 и Gly126, поскольку при замене каждого из них на стабилизирующие остатки наблюдается ингибирование протеолиза. Представляется весьма вероятным, что остаток Gly126 дестабилизирует только индивидуальные α -спирали, т.е. те, которые не стабилизируются взаимодействием друг с другом. Таким образом, неканонический остаток Gly126 вызывает, скорее всего, локальное разворачивание α -спиралей, которые расходятся в этой области за счет действия неканонического остатка Asp137, что делает эти спирали доступными для расщепления трипсином между остатками Arg133 и Ala134 (локальное расхождение α -спиралей ТМ в районе остатка Asp137 было выявлено ранее при изучении атомных структур фрагментов молекулы ТМ [48, 49]). В свете этого становится понятно, почему расщепление трипсином не происходит в районе других неканонических остатков глицина – Gly52 и Gly188, хотя в молекуле ТМ имеется более 30 потенциальных участков для такого расщепления, равномерно распределенных вдоль всей молекулы: в области этих остатков глицина нет заряженных/полярных остатков в составе гидрофобного кора, которые могли бы вызвать локальное расхождение α -спиралей. С другой стороны, судя по кристаллографическим данным, остатки Glu218 и Gln263 вызывают локальное расхождение α -спиралей ТМ, но трипсинолиз в данных участках все равно не наблюдается ввиду отсутствия там остатков, дестабилизирующих α -спираль.

Итак, изучение тепловой денатурации ТМ методами КД и флуоресцентных меток, а также использование ограниченного протеолиза позволило сделать вывод о том, что молекула ТМ неоднородна по своей стабильности, т.е. в ней имеются более стабильные и менее стабильные участки. Дальнейший прогресс в этом направлении был достигнут благодаря использованию комбинации методов КД, флуоресцентной спектроскопии и мутагенеза, а также применению метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Изучая термостабильность различных фрагментов скелетного α -ТМ кролика с помощью КД, Smillie и Pato пришли к выводу, что С-концевые фрагменты (триптический фрагмент 134–284 и бромциановый фрагмент 142–281) характеризуются меньшей стабильностью ($T_m \sim 34\text{--}37^\circ\text{C}$), тогда как N-концевые фрагменты (трипти-

ческий фрагмент 1–133 и бромциановый фрагмент 11–127) обладают большей термостабильностью ($T_m \sim 47–50^\circ\text{C}$) [44]. Исследуя скелетно-мышечный α -ТМ с помощью метода ДСК, Williams и Swenson показали, что форма кривой избыточного теплопоглощения этого белка зависела от состояния сульфгидрильных групп остатка Cys190. При полном восстановлении или модификации SH-групп кривая ДСК характеризовалась наличием двух пиков с температурами максимумов $T_m = 41,5^\circ\text{C}$ и $T_m = 52,5^\circ\text{C}$. При образовании дисульфидной связи между остатками Cys190 на кривой ДСК появлялся главный пик с $T_m = 52^\circ\text{C}$ и минорный низкотемпературный пик с $T_m = 32^\circ\text{C}$ [50]. Кроме того, изучая профили ДСК бромциановых фрагментов ТМ (11–127 и 142–281), авторы смогли провести идентификацию этих тепловых переходов, т.е. выявить их соответствие плавлению отдельных участков молекулы (калориметрических доменов). Менее термостабильный пик на кривой ДСК восстановленного ТМ был отнесен к денатурации С-концевого фрагмента молекулы, тогда как более термостабильный пик отражал денатурацию N-концевого фрагмента [50]. Это хорошо согласовывалось с опубликованной приблизительно в то же время работой Pato и Smillie, которая цитировалась выше [44]. Таким образом, введение дисульфидной связи в молекулу ТМ увеличивает термостабильность С-концевого фрагмента (домена). Анализируя эти данные, Lehrer с соавторами предположили, что причиной стабилизации в данном случае является уменьшение энтропии (ΔS) денатурации С-концевого домена ТМ, поскольку введение сшивки снижает количество различных конформаций денатурированного состояния. Вследствие этого увеличивается свободная энергия (ΔG) денатурационного перехода и повышается термостабильность С-концевого домена [51]. Таким образом, введение дисульфидной связи между остатками Cys190 двух цепей ТМ имеет парадоксальный эффект: с одной стороны, происходит увеличение термостабильности С-концевого домена молекулы ТМ, а с другой – одновременно увеличивается выраженность локального плавления («предперехода»). В более поздней литературе встречаются и другие работы по изучению термостабильности различных изоформ ТМ с помощью метода ДСК. Основным результатом этих работ заключается, по большей части, в подтверждении наличия кооперативных, обратимо денатурирующих блоков (калориметрических доменов) в молекуле ТМ [52–55]. Более подробно с результатами исследований тепловой денатурации ТМ методом ДСК можно ознакомиться в обзорах, опубликованных одним из нас в 2004 году [56, 57].

Следует отметить, что метод ДСК уже более 10 лет успешно применяется в нашем научном коллективе для изучения особенностей тепловой денатурации ТМ. Так, интересные результаты были получены в 2006 году при изучении этим методом тепловой денатурации немышечных изоформ ТМ. Было впервые показано, что энтальпия тепловой денатурации этих изоформ значительно ниже энтальпии денатурации стандартных мышечных изоформ ТМ. На основании этих данных был сделан вывод, что некоторые части молекул немышечных ТМ плавятся некооперативно по сравнению с тепловыми переходами, характерными для N- и C-концевых участков молекулы [58]. Но самое удивительное заключается в том, что некооперативная денатурация (т.е. плавление без выраженного кооперативного теплового перехода, которое отражается лишь в небольшом наклоне кривой теплопоглощения) было зарегистрировано даже в таком наиболее хорошо изученном препарате ТМ, как α -ТМ из скелетных мышц [47]. При этом замены неканонического остатка Gly126 в центральной части молекулы α -ТМ на канонические остатки Ala и Arg стабилизировали эту область молекулы, что выразилось в изменении характера тепловой денатурации центральной части α -ТМ с некооперативного на кооперативный. Более того, с использованием специальных калориметрических подходов нам удалось рассчитать энтальпию некооперативной тепловой денатурации центральной части молекулы α -ТМ: она составила около 300 кДж/моль, что соответствует примерно 60–70 аминокислотным остаткам, т.е. четверти длины молекулы [47]. Помимо этого заметим, что метод ДСК успешно применяется в нашем научном коллективе для изучения тепловой денатурации ТМ непосредственно на поверхности актиновых филаментов [47, 55–60], а также при исследованиях препаратов ТМ, несущих различные миопатические мутации [55, 61–63]; эти направления исследований будут несколько подробнее рассмотрены в последующих главах обзора.

В заключение данного раздела повторим ключевые положения, касающиеся структуры и стабильности молекулы ТМ.

1) Аминокислотная последовательность молекулы ТМ говорит о её структурной неоднородности, т.е. о существовании в молекуле участков с разной стабильностью.

2) Экспериментальные данные подтверждают, что различные участки молекулы ТМ характеризуются различной стабильностью (термостабильностью).

3) В общем виде, молекула ТМ представляется в виде двух достаточно стабильных доменов (C-концевого и N-концевого), соеди-

ненных своеобразным линкером – центральной частью молекулы, обладающей наименьшей стабильностью.

Как мы видим, устройство молекулы ТМ далеко от того, что следовало бы ожидать от такой простой структуры, как двойная α -спираль. Таким образом, возникает необходимость обратиться к имеющимся атомным структурам молекулы ТМ, чтобы понять ее устройство и взаимосвязь структуры с функцией.

АТОМНЫЕ СТРУКТУРЫ ТРОПОМИОЗИНА

В настоящее время имеются данные по атомным структурам нескольких фрагментов молекулы α -ТМ скелетных мышц, тогда как структура целой молекулы до сих пор не решена. Главной трудностью в решении этой задачи является получение качественных кристаллов. Несмотря на то, что ТМ с легкостью образует так называемые паракристаллы («кристаллы Бэйли», в честь первооткрывателя), они характеризуются размытой картиной дифракции рентгеновских лучей, ввиду высокого содержания растворителя (>90%). Такие кристаллы были использованы для получения информации об общей форме молекулы и упаковке индивидуальных молекул в кристалле с разрешением 7 Å [64]. Важным выводом из данной работы явилось то, что молекула ТМ обладает высокой конформационной подвижностью, что обуславливает разнообразие образуемых ТМ кристаллических и паракристаллических форм. Кроме того, была отмечена вариабельность шага суперспирали на протяжении всей молекулы, а также наличие в ней изгибов (рис. 2А) [65].

Структуры более высокого разрешения были получены для отдельных фрагментов молекулы α -ТМ: N-концевого фрагмента α -ТМ скелетных мышц курицы (81 аминокислотный остаток, разрешение 2,0 Å) [48], центральной части α -ТМ скелетных мышц крысы (остатки 89–208, разрешение 2,3 Å) [49], C-концевого фрагмента α -ТМ скелетных мышц крысы (остатки 253–284, разрешение 2,7 Å) [66] и C-концевого фрагмента α -ТМ скелетных мышц кролика (остатки 176–284, разрешение 2,6 Å; остатки 176–273, разрешение 1,8–2,0 Å) [65, 67]. Рассмотрим основные структурные особенности молекулы ТМ, выявленные на имеющихся атомных моделях.

Хронологически первой была решена структура для N-концевого фрагмента α -ТМ скелетных мышц курицы (PDB 1IC2). Данный фрагмент содержит два аланиновых кластера в гидрофобном коре (рис. 2Б). Характерной особенностью атомной структуры этого N-концевого фрагмента является уменьшение расстояния между двумя цепями ТМ в районе остатков 15–36 (первый аланиновый кластер) до 8 Å,

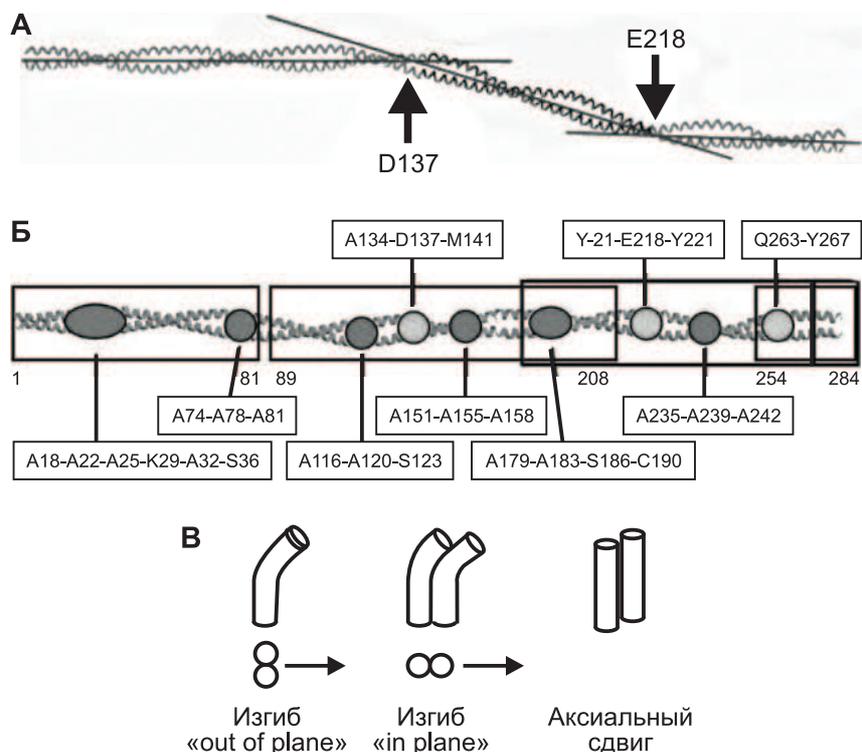


Рис. 2. Особенности строения молекулы ТМ по данным рентгеноструктурного анализа.

А – модель структуры молекулы ТМ с разрешением 7Å. Показано положение остатков D137 и E218 и ассоциированные с ними изгибы молекулы [65].

Б – сегменты молекулы ТМ, чьи атомные структуры доступны на сегодняшний день (заключены в черные рамки). Темные круги отмечают наличие аланиновых кластеров в гидрофобном коре (состав кластеров указан в рамках под схемой), серые круги – присутствие в нем заряженных остатков (указаны в рамках над схемой) [67]. В – структурные особенности молекулы ТМ [65] (подробнее см. в тексте).

тогда как в целом расстояние между цепями равно 9,5–10 Å. Другой интересной чертой атомной структуры N-концевого фрагмента является наличие аксиального сдвига цепей ТМ относительно друг друга на ~1 Å (рис. 2В), который приходится как раз на участок, совпадающий с аланиновым кластером. Последствия такого сдвига весьма интересны – они выражаются в появлении четкого изгиба молекулы

ТМ в месте перехода неканонического участка coiled-coil (район аланинового кластера) в канонический, т.е. содержащий плотно упакованные остатки в гидрофобном коре [48]. Величина изгиба в среднем составляет 6° . Было отмечено, что наличие таких изгибов является уникальной чертой ТМ, поскольку ничего подобного не наблюдалось для всех остальных белков со структурой coiled-coil, исследованных к тому времени методом рентгеноструктурного анализа. Авторами было высказано предположение, что подобные изгибы придают молекуле ТМ определенную форму, соответствующую геометрии поверхности актинового филамента и, таким образом, обеспечивающую продуктивное связывание с актином. Данная гипотеза позволяла объяснить аномально высокое содержание аланина в ТМ: можно предположить, что, во-первых, его остатки стабилизируют α -спиральную структуру ТМ, и, во-вторых, собираясь в группы, они обуславливают специфическую форму молекулы. Как нам предстоит убедиться, эта гипотеза получила большое развитие в более поздних работах.

В 2005 г. была решена атомная структура центральной части молекулы α -ТМ скелетных мышц крысы (остатки 89–208; PDB 2V9C) [49]. Отметим, что именно эта часть молекулы представляла особый интерес для исследователей, поскольку в более ранних работах уже была отмечена высокая нестабильность этого участка. Рентгеноструктурный анализ подтвердил ранее отмеченные специфические черты устройства молекулы ТМ и, кроме того, выявил некоторые новые особенности. Авторами было отмечено наличие аланиновых кластеров (например, в районе остатков 150–160; рис. 2Б) и связанные с ними структурные особенности (локальное уменьшение радиуса двойной спирали, аксиальный сдвиг цепей, специфический изгиб молекулы) (см. рис. 2В). Однако, помимо остатков аланина, собранных в группы, было отмечено наличие аланинов (Ala102, Ala109, Ala116 в *d*-положениях и Ala134 в положении *a*), расположенных через один с каноническими остатками, обладающими большим гидрофобным радикалом (например, Met127 и Met141). Такое чередование остатков с радикалами разного размера приводит к тому, что в гидрофобном коре центральной части молекулы ТМ образуются полости, т.е. возникает неплотная упаковка. Детальный анализ данной структуры показал, что наличие полостей в коре коррелирует с изгибом молекулы, причем его величина напрямую связана с объемом полостей. Кроме того, авторы установили, что данный изгиб несколько отличается по форме от изгибов в районе аланиновых кластеров. Если в последнем случае обе полипептидные

цепи располагаются в плоскости изгиба (изгиб «in plane» на рис. 2B), то в случае изгибов, вызванных наличием полостей в коре, цепи ТМ изгибаются в разных, хотя и параллельных, плоскостях (изгиб «out of plane» на рис. 2B).

Структура С-концевого фрагмента молекулы α -ТМ скелетных мышц кролика (остатки 176–284, разрешение 2,6 Å; остатки 176–273, разрешение 1,8–2,0 Å) была получена в группе Maeda [65, 67]. Полученные структуры подтвердили наличие ранее описанных структурных особенностей (сужение двойной спирали и аксиальный сдвиг в районе аланиновых кластеров), а также позволили выявить новые особенности строения молекулы ТМ, неизвестные до этого времени. Наиболее яркая из таких особенностей – это прерывание целостности гидрофобного кора, которое выражается в наличии полостей в трех участках С-концевого фрагмента. Первая (остатки 207–214) и вторая (остатки 214–221) полости расположены настолько близко друг к другу, что могут рассматриваться как два сегмента одной полости. Отмечается довольно сильное расхождение (~11 Å) двух полипептидных цепей ТМ, ассоциированное с данной полостью, а также локальное расплетание структуры coiled-coil, что выражается в увеличении шага левозакрученной суперспирали до 242–258 Å (нормальное значение составляет 156 Å). Последовательность остатков гидрофобного кора в районе первой и второй полостей выглядит как Leu207(*d*)–Ala211(*a*)–Tyr214(*d*)–Glu218(*a*)–Tyr221(*d*). Среди указанных аминокислот легко заметить наличие заряженного остатка Glu218, которому отводится ведущая роль в формировании обеих полостей в гидрофобном коре молекулы ТМ. Детальное изучение атомных структур выявили наличие в описываемых полостях нескольких молекул воды (их количество зависит от кристалла), образующих водородные связи с остатками Glu210 и Glu218. Третья полость формируется между остатками Gln263(*d*) и Tyr267(*a*) гидрофобного кора ТМ и совпадает с началом расхождения цепей ТМ, которые участвуют в образовании так называемых «концевых взаимодействий» с N-концом следующей молекулы ТМ (подробнее см. ниже). Кроме того, в данной (третьей) полости также обнаруживается присутствие молекулы воды, образующей водородные связи с гидрофильным остатком Gln263(*d*). Очевидно, что прерывание плотно упакованного гидрофобного кора молекулы, а также присутствие в нем молекул воды должно существенно дестабилизировать структуру coiled-coil. С физико-химической точки зрения это объясняется понижением энтропии за счет структурирования молекул воды как в гидрофобном коре, так и в его ближайшем окружении. О локальном увеличении

конформационной подвижности, ассоциированном с описанными участками прерывания гидрофобного кора, говорят повышенные значения температурного В-фактора: в районе Glu218 его значение равно $110,2 \text{ \AA}^2$, тогда как в остальных областях молекулы среднее значение В-фактора равно $40\text{--}50 \text{ \AA}^2$.

Напомним, что прерывание гидрофобного кора молекулы ТМ также имеет место в районе заряженного остатка Asp137(*d*). Однако, более низкое разрешение структуры центрального фрагмента молекулы ТМ и высокое значение В-фактора, ассоциированное с Asp137(*d*), не позволило выявить молекул воды в данном участке. Тем не менее, не вызывает сомнений тот факт, что все участки гидрофобного кора ТМ, содержащие заряженные или нейтральные гидрофильные остатки, обладают низкой стабильностью и высокой конформационной подвижностью. Эволюционная консервативность таких участков – остаток Glu218, к примеру, встречается как у *Caenorhabditis elegans*, так и у *Homo sapiens*, – говорит об их функциональной значимости. Между тем, на сегодняшний день известно функциональное значение дестабилизации, связанной только с третьей полостью в С-концевом фрагменте молекулы ТМ. Hitchcock-DeGregori и соавторы установили, что локальная дестабилизация, вызванная остатком Gln263(*d*), необходима для успешного взаимодействия С-концевой области молекулы ТМ с N-концом другой молекулы ТМ, а также с С-концевым сегментом («хвостом») тропомина Т [68]. Дестабилизация центральной части молекулы ТМ, обусловленная присутствием остатка Asp137(*d*), была подтверждена в работе [46], однако авторам не удалось раскрыть ее функциональную значимость. Сведения о функциональном значении остатка Glu218 и вызываемой им дестабилизации на сегодняшний день в литературе отсутствуют.

Помимо описанных выше разрывов гидрофобного кора, авторами атомной структуры С-концевого фрагмента молекулы ТМ было сделано еще одно интересное наблюдение. Поскольку исследователям удалось получить кристаллы разного типа, появилась возможность сравнить структуры ТМ, полученные с разных кристаллов. Было отмечено, что такие параметры coiled-coil, как диаметр двойной суперспирали и ее шаг, не зависят от типа кристалла [65, 67]. Наличие и величина изгибов молекулы, напротив, сильно зависели от условий кристаллизации и упаковки отдельных молекул в узлах кристаллической решетки. Авторами было высказано предположение, что такое поведение является отражением высокой конформационной подвижности молекулы ТМ, поскольку именно этим можно объяснить

подверженность молекулы деформациям при кристаллизации. Brown [69] провел детальный анализ изгибов молекулы ТМ на основе информации обо всех известных кристаллических структурах различных фрагментов ТМ. Результаты статистической обработки показали, что направление изгибов молекулы ТМ консервативно во всех исследованных кристаллических структурах и зависит, главным образом, от первичной структуры белка. Величина изгиба, напротив, полностью определяется окружением молекулы в ячейках кристаллической структуры. Таким образом, угол изгиба определяется внешними факторами, независимыми от первичной структуры ТМ. Но если изгиб все-таки образуется, то его направление определяется исключительно «внутренними» факторами, т. е. аминокислотной последовательностью молекулы.

Завершая рассмотрение известных атомных структур молекулы ТМ, можно сделать несколько выводов. Во-первых, структура двойной суперспирали ТМ варьирует в разных участках молекулы: участки, соответствующие дестабилизирующим кластерам, отличаются по параметрам структуры от всех остальных участков. Во-вторых, молекула ТМ представляет собой стержень с высокой конформационной подвижностью, которая выражается в появлении изгибов в некоторых участках молекулы в ответ на влияние извне. В-третьих, рентгеновская кристаллография не дает информации, позволяющей объяснить низкую стабильность центральной части ТМ по сравнению с другими участками молекулы, а также различие в стабильности N- и C-концевых фрагментов ТМ.

III. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТРОПОМИОЗИНА

В самом начале нашего рассмотрения функциональных свойств ТМ очертим круг обсуждаемых вопросов. В первую очередь, ТМ – это актин-связывающий белок, поэтому мы постараемся сфокусировать наше внимание на рассмотрении именно этого аспекта. Поскольку все остальные функциональные свойства ТМ являются вторичными по отношению к взаимодействию с актиновыми филаментами, мы ограничимся рассмотрением только одной из таких функций ТМ, а именно регуляции АТР-зависимого взаимодействия миозина с актином, так как именно этот процесс лежит в основе регуляции мышечного сокращения.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРОПОМИОЗИНА
С ФИБРИЛЛЯРНЫМ АКТИНОМ

Вопрос о связывании ТМ с F-актином являлся центральным на протяжении всей истории изучения ТМ. Еще в 1960-х годах было замечено, что получаемые в то время препараты актина содержали до 30% ТМ (цит. по [25]). Ультрацентрифугирование таких загрязненных препаратов актина выявило, что ТМ мигрировал вместе с полимерным актином (F-актином) только в условиях определенной ионной силы. Было также показано, что ТМ не взаимодействует с мономерным G-актином. Применение метода соосаждения позволило определить, что стехиометрия комплексов ТМ и F-актина соответствует молярному соотношению 1:7 [70]. Кроме того, было показано, что при низкой ионной силе (20 мМ KCl и 1 мМ MgCl₂) связывание ТМ с актином не наблюдается (цит. по [25]). Оптимальные условия для связывания были определены как 100 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂, тогда как при дальнейшем повышении ионной силы связывание ТМ с F-актином заметно ослаблялось. Тогда же впервые было показано, что параметры связывания (оптимальная ионная сила) различны для белков из разных источников [71].

Кооперативность взаимодействия и факторы, ее определяющие

Eisenberg и соавторы, применяя метод Скетчарда, одними из первых установили, что связывание ТМ с фибриллярным актином представляет собой высококооперативный процесс [72]. С исторической точки зрения интересно, что еще раньше Drabikowski с соавторами, применяя аналогичный метод, пришли к выводу о наличии на актине участков с высоким и низким сродством к ТМ. Тем не менее, впоследствии эти результаты были признаны артефактом (цит. по [72]). Установив наличие положительной кооперативности взаимодействия актина с ТМ, Eisenberg и соавторы не смогли в то время дать объяснения природе этого явления. Поскольку сродство первых нескольких молекул ТМ к актину было существенно ниже, чем сродство последующих молекул, авторы предположили, что взаимодействия между концами молекул ТМ могут быть основными факторами, обуславливающими кооперативность [72]. Другим интересным наблюдением авторов было то, что актиновые филаменты, обработанные глутаровым альдегидом, образующим внутри- и межмолекулярные сшивки, теряли способность связываться с ТМ. Это послужило косвенным свидетельством того, что конформационные изменения внутри актинового филамента могут быть частью положительного кооперативного эффекта связывания ТМ с актином.

Важность взаимодействия молекул ТМ своими концами с образованием полимеров для функционирования ТМ была подтверждена в многочисленных исследованиях. В частности, было показано, что отщепление с помощью карбоксипептидазы А 11 аминокислотных остатков [73] или 4 остатков [74] с С-конца молекулы приводит к потере ТМ способности полимеризоваться и связываться с актиновыми филаментами. К аналогичным результатам приводит ферментативное удаление N-концевого гексапептида с помощью бактериальной протеазы OmpT [75]. Hitchcock-DeGregori и Heald продемонстрировали важность ацетилирования N-концевого остатка метионина ТМ для связывания с актином [76]. В их работе был использован рекомбинантный ТМ, экспрессированный в *E.coli*, что объясняет отсутствие в нем N-концевого ацетилирования. В последующих исследованиях было предпринято несколько попыток обойти это препятствие. В частности, было показано, что добавление дипептида Ala-Ser к N-концу рекомбинантного ТМ восстанавливает связывание с актином [77]. Заметим, что такой подход в настоящее время пользуется наибольшей популярностью. Кроме имитации ацетилирования с помощью дипептида Ala-Ser, возможна экспрессия ТМ в бакуловирусной системе (клетки насекомых линии SF9) [78, 79], в дрожжах *Pichia pastoris* [80], а также коэкспрессия ТМ с ацетилирующим комплексом NatB в клетках *E.coli* [81]. Тем не менее, имитация ацетилирования остается самым доступным и хорошо зарекомендовавшим себя методом повышения сродства рекомбинантного ТМ к F-актину.

В последнее время был достигнут большой прогресс в установлении молекулярной архитектуры концевых контактов молекул ТМ. Опуская многочисленные детали, отметим работу [82], в которой методом ЯМР была установлена структура комплекса N- и С-концевых пептидов ТМ в растворе, а также работу [83] в которой описывается кристаллическая структура аналогичного комплекса. Обе работы описывают расхождение полипептидных цепей на С-конце ТМ и проникновение 11 N-концевых остатков в образовавшуюся щель (рис. 3А).

Возвращаясь к кооперативности связывания ТМ с F-актином, отметим, что, по всей вероятности, не только концевые взаимодействия между молекулами ТМ являются определяющими факторами его кооперативного связывания с актиновым филаментом. L. Tobiasman, основываясь на биоинформатическом анализе последовательностей различных изоформ ТМ и на экспериментальных данных, отмечает, что кооперативность связывания ТМ с актином не зависит от размера

перекрывания участков ТМ, формирующих концевое взаимодействие [84]. Например, в случае дрожжевых ТМ величина перекрытия С- и N-концов составляет не более 5 аминокислотных остатков, но, тем не менее, кооперативность их связывания с актином не уступает таковой у мышечных ТМ животных. Таким образом, возникает вопрос о существовании других факторов, которые наряду с концевыми контактами между молекулами ТМ обеспечивают кооперативность связывания ТМ с актином. По всей вероятности таким фактором может служить сама актиновая нить, изменения конформации которой могут быть посредником в кооперативном процессе связывания ТМ с актином [84]. Данная гипотеза, несмотря на ее несколько спекулятивный характер, все же не лишена смысла. В литературе имеется достаточно много работ, указывающих на то, что актиновый филамент не является пассивной структурой. В качестве примера можно привести хорошо известный эффект миозина (точнее – изолированной головки или субфрагмента 1 миозина, S1) на связывание ТМ с актином: в условиях низкого сродства актина к ТМ «сильное связывание» S1 с актиновым филаментом вызывает резкое повышение аффинности последнего к ТМ [85, 86]. Поскольку прямое взаимодействие между S1 и ТМ не показано, логично предположить влияние S1 в состоянии «сильного связывания» на конформационное состояние актиновых филаментов, которое в итоге приводит к значительному повышению сродства F-актина к ТМ.

Факторы, определяющие сродство тропомиозина к F-актину

Тот факт, что одна молекула ТМ связывается одновременно с семью мономерами актина в филаменте, говорит о существовании как минимум семи актин-связывающих участков в молекуле ТМ. Анализ аминокислотной последовательности ТМ выявил 7 равноудаленных скоплений кислых аминокислотных остатков (Asp, Glu), находящихся в положениях *b*, *c* и *f* гептадных повторов, т.е. на поверхности суперспирали ТМ (цит. по [25]) (рис. 3Б). McLachlan и Stewart [87], а позднее Phillips и соавторы [88], проведя сходный анализ, определили протяженность такого актин-связывающего мотива в первичной структуре ТМ (~39,3 остатка), а также выявили кислые остатки, которые, по их мнению, должны играть роль в связывании с актином (рис. 3Б). Они также разделили каждый такой мотив на два сегмента, названных α - и β -зонами, и предположили, что эти зоны осуществляют контакт молекулы ТМ с актином в различных состояниях тонкого филамента (см. ниже), таким образом обуславливая перемещение ТМ на поверхности актина. Общим свойством всех таких актин-

связывающих мотивов явилась их квазипериодичность – кластеры кислых остатков хотя и повторялись, но по своему составу отличались в разных участках молекулы.

Hitchcock-DeGregori и ее коллеги посвятили немало работ изучению свойств отдельных актин-связывающих мотивов ТМ (часто называемых в литературе актин-связывающими повторами) с помощью мутагенеза. Ранние работы показали, что для актин-связывающей функции необходимо наличие целого (не дробного) числа актин-связывающих повторов в молекуле ТМ. Изменение длины одного из повторов сильно снижало способность ТМ связываться с актином [89]. Аналогичным образом авторы показали, что специфическая структура каждого повтора играет определяющую роль во взаимодействии ТМ с актином, поскольку замена любого повтора на участок с неупорядоченной структурой или на «лейциновый zipper» сильно снижает сродство ТМ к актину. Кроме того, было показано, что мутанты ТМ с делециями повторов 2, 3, 4 и 6 в целом характеризовались сравнимым сродством к актину, приблизительно в 10–30 раз более слабым, чем у ТМ дикого типа. Напротив, делеция повтора 5 (и, особенно, его N-концевой части, остатки 166–186), приводила к потере сродства ТМ к актину как в присутствии, так и в отсутствие головки миозина (S1) [89, 90–92]. Схожим образом, замещение аминокислотной последовательности повторов на последовательность транскрипционного фактора GCN4, также обладающего структурой coiled-coil, имело драматические последствия только в случае повтора 5 [92]. Повтор 5 обладает наиболее консервативной последовательностью по сравнению с другими повторами: 31% его последовательности идентичен у представителей животных, тогда как для остальных повторов этот показатель составляет 17%. N-концевая часть повтора 5 (остатки 166–186) характеризуется еще большей консервативностью – 38%. Последовательность повтора 5 кодируется экзоном 5, который никогда не подвергается альтернативному сплайсингу [25, 28]. Что же делает повтор 5 таким уникальным с точки зрения актин-связывающей функции ТМ? Hitchcock-DeGregori и Singh обратили внимание на то, что в структуре повтора 5 имеется аланиновый кластер Ala179–Ala183–Ser186, т.е. один из тех дестабилизирующих кластеров, о которых говорилось выше. Такое наблюдение сразу породило мысль о том, что именно дестабилизация структуры повтора 5 может иметь немалое значение для связывания ТМ с актином. Для проверки этого предположения авторы сконструировали мутантный ТМ, в котором последовательность аланинового кластера была заменена на более

гидрофобные и потому стабилизирующие остатки (Ala179Leu–Ala183Val–Ser186Leu). Эксперименты показали, что такие замены действительно вызывали повышение термостабильности молекулы ТМ, а изучение температурных зависимостей флуоресценции эксимеров пиренил-иодацитамида, связанного с Cys190, подтвердило локальную стабилизацию данного участка молекулы ТМ. Кроме того, замена дестабилизирующего кластера на стабилизирующий вызывала драматическое снижение сродства ТМ к F-актину [93]. Таким образом, было показано, что дестабилизация структуры coiled-coil в районе повтора 5 за счет присутствия в гидрофобном коре неканонических остатков является необходимым условием для связывания ТМ с актином. Кроме того, в данной работе [93] авторы также демонстрируют необходимость наличия консервативных (в основном, кислых) остатков в положениях *b*, *c* и *f* гептадного повтора coiled-coil. Напомним, что аминокислотные остатки в этих положениях находятся на поверхности двойной спирали ТМ и могут образовывать контакты с поверхностными остатками актиновой нити.

Таким образом, авторы постулировали, что для связывания с актином структура ТМ должна удовлетворять двум требованиям: 1) конформационная подвижность («флексильность»), позволяющая молекуле лиганда (ТМ) подстраивать свою структуру под геометрию поверхности молекулы-мишени (фибрилярного актина); 2) специфичность взаимодействия, т.е. наличие в структуре лиганда и мишени участков, образующих специфические контакты [94]. Отметим, что такая концепция полностью применима, видимо, только по отношению к актин-связывающему повтору 5. В случае повтора 2 дестабилизация структуры coiled-coil аланиновым кластером, как было показано теми же авторами, также определяет связывание ТМ с актином [95], однако делеция повтора 2 или его замена на лейциновый zipper слабо влияет на сродство ТМ к актину [89].

Итак, работы Hitchcock-DeGregori и Singh [93–95] показали то, о чем давно догадывались: конформационная подвижность («флексильность») молекулы ТМ важна для его связывания с актином. Надо отметить, что эти работы вполне соответствуют духу времени – параллельно с ними в литературе формулируются концепции о важности конформационной подвижности внутренне разупорядоченных белков (intrinsically disordered proteins) для их взаимодействия с белками-партнерами. Тем не менее, в 2008 г. Lehrer с соавторами опубликовали работу, в которой было показано, что стабилизация структуры повтора 4 не влияла на сродство ТМ к актину [46]. Как уже обсуждалось выше, имеется весомый набор

доказательств того, что центральная часть молекулы ТМ является самым нестабильным участком молекулы. Ввиду этого, логично было предположить, что стабилизация этого участка скажется на сродстве ТМ к актину, однако ничего подобного обнаружено не было. Отметим, что авторы не предложили объяснений этому феномену. Более того, сходный феномен был обнаружен и в наших исследованиях: было показано, что стабилизация центральной части молекулы ТМ при замене неканонического остатка Gly126 на канонические остатки Ala и Arg не оказывает влияния на сродство ТМ к F-актину [47]. Таким образом, возникает вопрос о смене подхода к проблеме. Действительно ли молекула ТМ такая подвижная, как мы ее себе представляем, и насколько важна эта конформационная подвижность («флексильность») для взаимодействия ТМ с актиновым филаментом? Эти вопросы стали ключевыми в ряде работ, которые использовали совершенно иной подход к проблеме.

Гипотеза Gestalt-связывания

Нетрудно понять, что описанная выше модель Hitchcock-DeGregori в первом приближении напоминает гипотезу индуцированного соответствия (induced fit), известную из энзимологии. В ней связывание субстрата вызывает конформационные изменения в активном центре фермента, что делает возможным дальнейшее протекание реакции. Конформационная подвижность актин-связывающих сайтов, как постулируется в модели Hitchcock-DeGregori, является необходимым условием образования корректных связей между ТМ и актином. Holmes и Lehman (главным образом, благодаря сотрудникам одного из ресторанов в Хайдельберге, не мешавших их обсуждениям после закрытия заведения [96]) предложили совершенно иной механизм связывания актина с ТМ. Отправными точками в их рассуждениях были следующие факты. Во-первых, как показывают измерения, связывание единичной молекулы ТМ с актином является очень слабым и характеризуется $K_a \sim 2-5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ [97]. Если сродство всех актин-связывающих повторов молекулы ТМ одинаково, то константа связывания одного повтора должна быть равна ~ 3 , что соответствует не более чем одному электростатическому взаимодействию [96]. Таким образом, тепловые колебания с легкостью вызвали бы диссоциацию одной молекулы ТМ с поверхности актинового филамента. Учитывая, что столь низкое сродство в целом нехарактерно для актин-связывающих белков, возникает мысль о том, что стереоспецифичность не является основным фактором, обуславливающим взаимодействие ТМ с актиновым филаментом

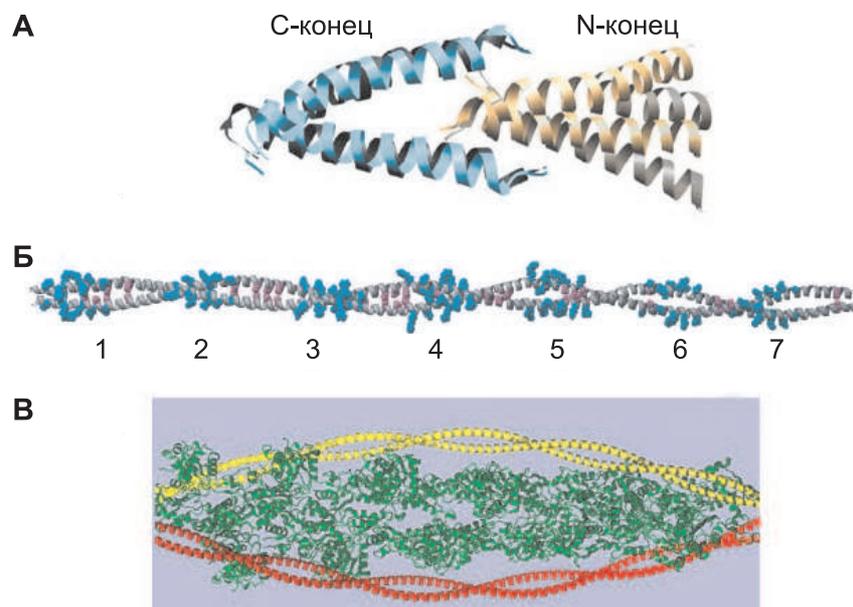


Рис. 3. Взаимодействие ТМ с F-актином.

А – модель взаимодействия N- и С-концов разных молекул ТМ (по материалам статьи [94]).

Б – модель молекулы ТМ (синим цветом выделены кислые остатки, участвующие во взаимодействии с актином, фиолетовым – аланиновые кластеры). Цифры соответствуют актин-связывающим повторам в молекуле ТМ (по материалам статьи [94]).

В – пространственная модель структуры комплекса F-актин–ТМ. Обратите внимание на удаленность тяжелой ТМ от поверхности актинового филамента (по материалам статьи [96]).

[96]. Результаты реконструкций, полученные при изучении картины дифракции упорядоченных актин-тропомиозиновых гелей, показали, что молекула ТМ располагается на расстоянии $\sim 39\text{\AA}$ от оси актинового филамента [98]. Встраивание атомных координат ТМ в электронно-микроскопические реконструкции регулируемых тонких филаментов дали примерно похожие результаты – 40\AA в присутствии кальция и 42\AA в системе без кальция [99]. Очевидно, что такое большое расстояние между поверхностями двух белков (см. рис. 3В) исключает образование стереоспецифичных контактов, т.е. взаимодействие между актиновыми мономерами и актин-связывающими повторами

ТМ сводится к простому электростатическому притяжению, а не к образованию специфических ионных пар [96]. Holmes и Lehman постулируют, что наблюдаемая специфичность связывания ТМ с актином объясняется не образованием специфических контактов, а комплементарностью (конгруэнтностью) поверхностей обоих белков. Подобное взаимодействие авторы называют Gestaltbindung, т.е. Gestalt-связывание. Происхождение термина двойное: поскольку Gestalt в переводе с немецкого означает «форма», такое название указывает на форму молекулы ТМ как ключевой фактор взаимодействия с актином. Кроме того, Gestalt имеет отношение к гештальт-теории, пришедшей из психологии. Данная теория постулирует, что свойства системы не могут быть сведены к сумме свойств слагающих ее элементов. Таким образом, авторы хотят показать, что феномен связывания ТМ с актином нельзя объяснить, фокусируя внимание на одной молекуле ТМ и соответствующем ей участке F-актина, и предлагают рассматривать актиновый филамент и связанный с ним тропомиозиновый тяж в целом.

Holmes и Lehman не ограничиваются составлением умозрительных гипотез и приводят в качестве аргументов экспериментальные данные. В частности, они утверждают, что доступные атомные структуры фрагментов ТМ [48, 49] могут быть легко встроены в контуры тропомиозиновой нити из модели Лоренца-Холмса [98], а также в электронно-микроскопические 3D-реконструкции тонкого филамента [99]. Авторы особенно подчеркивают тот факт, что нет необходимости в деформации или других манипуляциях атомными структурами фрагментов ТМ для того, чтобы их встроить в имеющиеся реконструкции комплексов актин-ТМ. Кроме того, Holmes и Lehman обращают внимание на имеющиеся в атомных структурах ТМ изгибы coiled-coil как на факторы, обуславливающие специфическую форму молекулы. Весьма интересно, что авторы приводят в качестве аргументов данные Singh и Hitchcock-DeGregori по мутагенезу аланиновых кластеров в ТМ [95], приводящему к потере способности ТМ связываться с актином (заметим, что сами авторы этой работы интерпретируют свой результат совсем в другом ключе – см. выше). На основе этих фактов Holmes и Lehman постулируют существование трех факторов, обуславливающих связывание ТМ с актином: 1) слабые, неспецифические взаимодействия между белками, 2) специфическая форма ТМ, комплементарная поверхности актинового филамента, и 3) концевые взаимодействия между молекулами ТМ. Связывание ТМ с актином представляется в рамках данной концепции следующим образом (рис. 4). Сначала одиночные

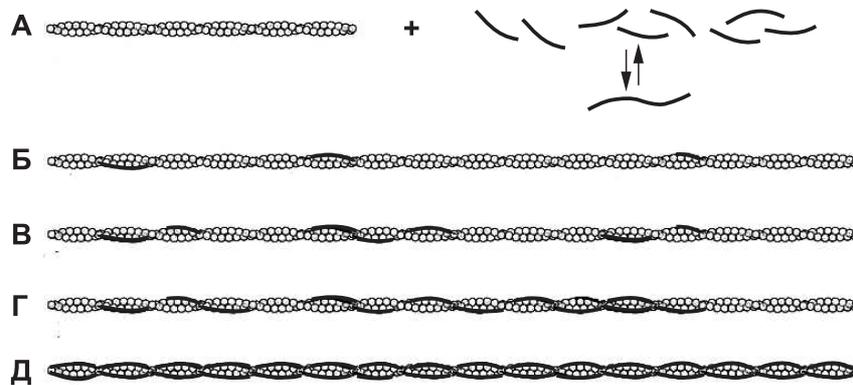


Рис. 4. Процесс связывания ТМ с F-актином (по материалам статьи [96]). См. пояснения в тексте.

молекулы ТМ случайным образом связываются с актином с очень низкой K_a (рис. 4А–В). Такое взаимодействие невыгодно с точки зрения энтропийного фактора, однако комплементарность формы молекулы ТМ и поверхности актинового филамента помогает нивелировать энтропийные эффекты. Особо подчеркивается, что нет принципиальной необходимости в повышенной конформационной подвижности ТМ. Поскольку одна молекула ТМ (40 нм) соответствует половине оборота спирали F-актина, тропомиозину не обязательно быть пластичным, чтобы «обвивать» актиновый филамент. После достижения некой критической концентрации отдельные молекулы ТМ начинают встречаться на поверхности актинового филамента и контактировать друг с другом, что существенно увеличивает их шансы остаться на поверхности актиновой нити (рис. 4Г). Этот процесс продолжается до полного насыщения актинового филамента (рис. 4Д) и, как можно заметить, имеет кооперативный характер. Таким образом, связывание тропомиозинового тяжа с актиновым филаментом будет достаточно прочным, хотя на локальном уровне такое взаимодействие имеет слабый и неспецифичный характер [96]. В качестве комментария заметим, что модель Hitchcock-DeGregori и соавторов говорит о том, что связывание ТМ с актином подчиняется универсальным законам белок-белковых взаимодействий, в то время, как модель Gestalt-связывания говорит об уникальности механизма взаимодействия ТМ с актиновым филаментом.

Итак, механизм, предложенный Holmes и Lehman, представляет собой интересную модель, однако все ли в ней согласуется с имеющи-

мися в литературе данными? Во-первых, модель опирается на данные рентгеноструктурного анализа фрагментов молекулы ТМ, указывающие на наличие у молекулы определенной архитектуры, определяемой специфическими изгибами [48, 49]. В то же время, кристаллографические данные Maeda и соавторов [65, 67], а также анализ Брауна [69] говорят о том, что наличие изгибов непостоянно и может быть артефактом кристаллизации. Более того, выражается мнение о том, что непостоянство изгибов отражает конформационную подвижность ТМ. Это согласуется с классическими работами Lehger и Hitchcock-DeGregori, также подтверждающими наличие у молекулы ТМ высокой конформационной подвижности («флексibility»). Таким образом, в модели Gestalt-связывания постулируется, что молекуле ТМ не требуется быть чрезмерно пластичной для связывания с актином; тем не менее, наличие у ТМ такого свойства является, очевидно, доказанным фактом. Ввиду этого, остается непонятным, почему эволюция структуры молекулы ТМ шла по пути приобретения конформационной подвижности.

Нельзя обойти вниманием работы группы W. Lehman, направленные на изучение механических свойств одиночных молекул ТМ. Хронологически такие работы последовали за публикацией гипотезы Gestalt-связывания и были направлены на рассмотрение вопроса о конформационной подвижности молекулы ТМ. Наиболее важной среди этих работ является статья [100], в которой авторы впервые пытаются количественно оценить конформационную подвижность молекулы ТМ. Их методология основывается на расчете персистентной длины ТМ на базе анализа многочисленных электронных микрофотографий и молекулярно-динамических симуляций. Рассмотрим более подробно эту работу. Авторы исходили из имеющихся атомных структур фрагментов ТМ, которые, как уже упоминалось, достаточно хорошо встраиваются в электронно-микроскопические реконструкции тонкого филамента (модель Лоренца-Холмса). Затем ТМ из данной модели отделяли от актина и совершали молекулярно-динамические расчеты, главным результатом которых явилось то, что конформация молекулы ТМ существенным образом не изменялась – не образовывалось локальных очагов плавления, расхождения цепей, изломов и т.п. Кажущаяся персистентная длина молекулы ТМ, рассчитанная таким образом, составляла 104 нм, тогда как динамическая персистентная длина была в 5 раз больше (500 ± 40 нм). Такая разница говорила о том, что средняя конформация молекулы отлична от линейной и более приближена к дуге [100, 101]. Авторы отмечают, что значение динамической персистентной длины

ТМ (500 нм) в 10 раз превышает аналогичный параметр для молекулы ДНК, на основании чего молекуле ТМ присваивается определение «полу-флексибильный» вместо «флексибильный». Используя молекулярно-динамические расчеты, авторы также показали, что мутантный ТМ с заменами A74L–A78V–A81L, который в работе Singh и Hitchcock-DeGregori терял способность связываться с F-актином, характеризуется отличной от белка дикого типа средней формой молекулы: мутация вызывает выпрямление тропомиозинового стержня. По мнению авторов, это служит прямым доказательством справедливости гипотезы Gestalt-связывания.

Подводя итог рассмотрения работ по механизмам взаимодействия актина и ТМ, суммируем основные идеи, изложенные в литературе по данному вопросу. Существует две главные гипотезы, объясняющие связывание ТМ с актином. Одна из них основывается на растворных данных о конформационной подвижности одиночных молекул ТМ и сводит процесс взаимодействия F-актина с ТМ к образованию специфических контактов, которому способствует локальная нестабильность актин-связывающих сайтов ТМ. Другая гипотеза (Gestalt-связывание) постулирует, что весь процесс связывания основывается на комплементарности формы молекулы ТМ и поверхности актинового филамента, а также на неспецифичности контактов между двумя этими белками. Кроме того, вторая гипотеза отвергает важность конформационной подвижности ТМ для взаимодействия с актином. Отметим, что на сегодняшний момент имеются веские экспериментальные свидетельства в пользу каждой из гипотез, однако способ объединить или «примирить» их пока не найден. Точка зрения авторов данного обзора состоит в том, что обе концепции в некоторой степени верны, поскольку каждая из них имеет дело с разными «сторонами жизни» ТМ: с одной стороны – ТМ в растворе, а с другой – ТМ, связанный с актином.

В заключение данного раздела рассмотрим относительно недавнюю работу, посвященную взаимодействию ТМ с F-актином. Lehman и соавторы, используя молекулярное моделирование, рассчитали равновесное положение ТМ на поверхности актинового филамента и определили те аминокислотные остатки, которые с максимальной вероятностью участвуют во взаимодействии актина с ТМ [102]. Отмечая большое расстояние между α -углеродными атомами полипептидных цепей обоих белков и относительно низкую специфичность образуемых между ними электростатических взаимодействий, авторы утверждают, что энергетический ландшафт различных положений тропомиозиновой нити на поверхности актинового филамента отно-

сительно плоский. Таким образом, различные положения ТМ на поверхности F-актина более или менее равновероятны. Это является основным фактором, обуславливающим участие ТМ в регуляции взаимодействия миозина и актина, лежащего в основе процесса мышечного сокращения.

Тепловая денатурация тропомиозина в комплексах с F-актином

Завершая рассмотрение работ по взаимодействию ТМ с актином, хотелось бы кратко остановиться на том, как происходит тепловая денатурация ТМ, связанного с F-актином. Изменения гибкости ТМ могут коррелировать с изменениями в его термостабильности, поэтому исследования методом ДСК тепловой денатурации связанного с актином ТМ могут дать ценную информацию о динамических свойствах ТМ на поверхности актинового филамента. По этим причинам метод ДСК в комбинации с другими методами интенсивно используется в нашем научном коллективе для исследования тепловой денатурации ТМ в его комплексах с F-актином. Один из таких методов – измерение температурных зависимостей диссоциации комплексов ТМ–F-актин, которые регистрируются по изменениям светорассеяния в тех же условиях и при той же скорости прогрева, что и в калориметрических экспериментах. В первых экспериментах, проведенных с использованием гладкомышечного ТМ, сочетание этих методов позволило установить, что тепловая денатурация ТМ сопровождается его диссоциацией с поверхности F-актина [59]. Впоследствии такой подход был успешно применен для изучения комплексов F-актина с самыми разными изоформами ТМ (α - и β -изоформы ТМ скелетных и гладких мышц, «короткие» немышечные α -изоформы ТМ, а также дрожжевые ТМ) [47, 55–58, 60, 61] и было показано, что характер тепловой денатурации ТМ существенным образом изменяется при его связывании с F-актином. Это выражалось в появлении на кривой теплопоглощения ТМ нового высококооперативного теплового перехода. После прогрева комплекса ТМ–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, соответствующие тепловой денатурации свободного ТМ, плавление которого полностью обратимо. Это привело нас к заключению, что появление нового пика в присутствии F-актина отражает тепловую денатурацию связанного с актином ТМ. Была также обнаружена очень хорошая корреляция между температурой максимума этого индуцируемого актином нового

пика на термограмме ДСК и температурой диссоциации комплекса ТМ–F-актин (т. е. с той температурой, при которой интенсивность светорассеяния комплекса снижалась на 50%). На основании этого было сделано заключение, что индуцируемые актином изменения в тепловой денатурации ТМ связаны с диссоциацией ТМ с поверхности актинового филамента.

Эти результаты привели нас к следующему предположению о механизме тепловой денатурации ТМ, связанного с F-актином [55–58]. По-видимому, F-актин защищает связанный с ним ТМ от тепловой денатурации, которая происходит только при диссоциации ТМ с поверхности актинового филамента. Поэтому новый высококооперативный пик, который появляется на термограмме ДСК только в присутствии актина, отражает тепловую денатурацию тех частей молекулы ТМ, которые в отсутствие актина должны были денатурировать при более низких температурах, чем температура диссоциации, но не могли этого сделать в присутствии актина. Эти участки ТМ денатурируют в присутствии F-актина в очень узком температурном диапазоне, сразу после диссоциации. Все другие более термостабильные части молекулы ТМ, которые плавятся при более высокой температуре, чем температура диссоциации, денатурируют независимо от актина после диссоциации ТМ с поверхности актинового филамента.

Следует отметить, что именно применение этого эффективного подхода, разработанного в нашем научном коллективе, недавно позволило нам рассчитать энтальпию некооперативной тепловой денатурации центральной части молекулы α -ТМ и оценить таким образом размеры этой области молекулы (60–70 аминокислотных остатков, т.е. приблизительно четверть длины молекулы ТМ) [47].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ ТРОПОМИОЗИНА

Как уже говорилось выше, все функции ТМ основываются на его способности взаимодействовать с фибриллярным актином и, так или иначе, связаны с регуляцией актинового цитоскелета. Одно из фундаментальных свойств ТМ – это придание упругости и механической прочности актиновому филаменту, что впервые было показано с помощью квазиупругого лазерного светорассеяния [103]. Кроме того, ТМ предохраняет актиновый филамент от дестабилизации и фрагментации такими факторами, как ДНКаза I, гельзолин и кофилин, а также препятствует разветвлению филаментов, опосредованному белком Agr2/3 [104–107]. Все это обуславливает участие ТМ в регуляции клеточной подвижности. В качестве иллюстрации приведем

результаты исследования Gupton и соавторов, которые показали, что гиперэкспрессия экзогенного ТМ драматически изменяет динамику актинового цитоскелета и влияет на миграцию клеток [108]. Ламеллоподии клеток обычно содержат развитую динамичную сеть актиновых филаментов, а также высокие концентрации кофилина и Arp2/3. В то же время, при движении вглубь клетки актиновый цитоскелет меняет как свою структуру, так и репертуар актин-связывающих белков: появляются более стабильные актиновые филаменты, содержащие ТМ и взаимодействующие с миозином II. Микроинъекции ТМ в лидирующий край клетки вызывают снижение в нем концентрации кофилина и Arp2/3 на фоне сохранения подвижности клетки. Тем не менее, если прежде механизм миграции был обусловлен полимеризацией–деполимеризацией актина, то теперь он основывается на работе молекулярных моторов – головок миозина II, которые, взаимодействуя с актиновыми филаментами, генерируют механическое усилие и движение.

Регуляция взаимодействия миозина с актиновым филаментом является, пожалуй, наиболее важным функциональным свойством ТМ, поскольку это имеет непосредственное отношение к молекулярному механизму сокращения мышц. Ниже мы кратко рассмотрим современные представления о механизме мышечного сокращения и подробно остановимся на регуляции этого процесса, осуществляемой ТМ.

Общие сведения о механизме мышечного сокращения.

В общих чертах, механизм сокращения мышечных клеток, получивший название «Теории скользящих нитей», основывается на движении двух систем белковых нитей параллельно и навстречу друг другу. Речь идет о тонких (актиновых) и толстых (миозиновых) филаментах. Три ключевых фактора обуславливают данный процесс. Во-первых, формирование «поперечных мостиков» – временных контактов между тонкими и толстыми нитями [109]. Во-вторых, конформационные изменения, происходящие в «поперечных мостиках», идентифицированных как глобулярные структуры («головки»), располагающиеся на N-конце молекулы миозина [110]. Наконец, в-третьих, гидролиз АТФ, осуществляемый головкой миозина [110, 111]. Bagshaw и Trentham, используя флуоресцентную спектроскопию, установили связь между конформационными изменениями головки миозина (точнее, хмотриптического субфрагмента I миозина, S1) и циклом АТФ-разной реакции [112]. White и Taylor показали, что удаление фосфата из активного центра миозиновой головки является важнейшим этапом цикла АТФ-разной реакции и сопряжено

с генерацией силы [113]. Несколькими годами ранее Lymn и Taylor показали, что ферментативная активность миозина ингибируется продуктом реакции (отщепленным γ -фосфатом АТР) и что актин вызывает высвобождение фосфата, активируя, таким образом, АТРазу миозина [114]. Сопоставляя свои данные с гипотезой Н. Huxley о конформационных изменениях поперечных мостиков в процессе мышечного сокращения, Lymn и Taylor предложили следующий механохимический цикл (в качестве иллюстрации хорошо известной схемы Лимна-Тэйлора, описывающей цикл работы поперечного мостика, см. рис. 5 в статье Н.А. Кубасовой и А.К. Цатуряна «Молекулярный механизм работы актин-миозинового мотора в мышце», опубликованной в этом же выпуске сборника «Успехи биологической химии» [115]):

1. В отсутствие нуклеотида поперечный мостик (головка миозина) прочно связан с актиновым филаментом и формирует т.н. «ригорный» комплекс («сильное связывание» миозина с актином).

2. Связывание АТР с активным центром миозиновой головки вызывает быструю диссоциацию актомиозинового комплекса. Далее миозин гидролизует АТР и формирует устойчивый комплекс фермент-продукт М-АДР- P_i (где М – головка миозина).

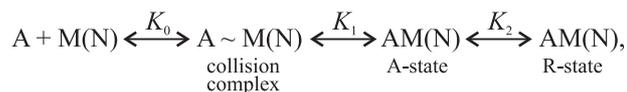
3. Комплекс М-АДР- P_i формирует слабое взаимодействие с актиновым филаментом.

4. Последующее сильное связывание с актином вызывает высвобождение продуктов реакции из активного центра миозина, формируя, таким образом, исходный прочный актин-миозиновый комплекс.

В ходе последнего этапа цикла в поперечном мостике происходит сильное конформационное изменение, подобное гребку весел, которое и обуславливает генерацию силы, а также способствует удалению продуктов АТРазной реакции из активного центра миозина. Отметим, что с технической точки зрения оказалось невероятно сложным визуализировать поперечный мостик в движении. Потребовалась разработка специальных подходов, прежде чем появились первые рентгеновские диаграммы мышц лягушки с разрешением во времени, демонстрирующие движения поперечных мостиков в процессе сокращения [116, 117].

Регуляция взаимодействия головки миозина с актиновым филаментом

Итак, взаимодействие актина с миозином, лежащее в основе мышечного сокращения, сводится к следующей принципиальной схеме [118]:



где А – актин, М – миозин, N – нуклеотид, A-state – состояние слабого связывания, R-state – состояние сильного (ригорного) связывания.

Из приведенной схемы можно сделать два важных вывода: 1) взаимодействие головки миозина с актином происходит в два этапа (если не считать быстро образующийся и короткоживущий collision complex); 2) регуляция взаимодействия миозина с актином, закономерно, может осуществляться на одном из этих этапов. Таким образом, это может быть либо регуляция взаимодействия миозина с участками связывания на актине (первое и второе равновесие схемы), либо регуляция перехода миозина из состояния слабого связывания в сильное связывание.

Достаточно давно был установлен тот факт, что мышечное сокращение запускается при увеличении концентрации ионов кальция в цитозоле мышечной клетки в ответ на внешние стимулы (иннервация, химическая стимуляция). В 1960 г. Ebashi и коллеги установили, что Ca^{2+} связывается с белком, входящим в состав тонких (актиновых) филаментов, который они назвали тропонин (цит. по [119]). Было показано, что данный белок ассоциирован с одной молекулой ТМ и с семью мономерами актина в составе тонкого филамента. Впоследствии выяснилось, что тропонин представляет собой комплекс трех белков: тропонина С, способного обратимо связывать ионы Ca^{2+} , тропонина I, который самостоятельно может ингибировать сокращение, и тропонина Т, который взаимодействует с тропонинами I и С, а также прочно связывается с ТМ. Идентификация тропонина поставила новый вопрос: каким образом один тропониновый комплекс может вызывать активацию 7 мономеров актина в составе тонкой нити? В качестве ответа на этот вопрос на основе рентгеноструктурных данных была сформулирована «Теория стерического блокирования», которая постулирует, что в отсутствие Ca^{2+} молекула ТМ экранирует участки связывания головки миозина на актиновой нити. При связывании ионов Ca^{2+} с тропониновым комплексом происходит перемещение ТМ на поверхности актинового филамента, что делает доступными участки связывания головки миозина.

Рассмотрим некоторые биохимические свойства реконструированных тонких филаментов. Изолированный тропонин С из скелетных мышц имеет два участка, кооперативно связывающих ионы Ca^{2+} . Коэффициент кооперативности Хилла в данном случае оценивается как 1,5–2 [120]. С другой стороны, данные по изучению генерации

изометрической силы в ответ на повышение концентрации кальция предполагают более кооперативный характер активации тонкого филамента, описываемый более высокими значениями коэффициента Хилла. Такой эффект, т.е. несовпадение кривой связывания кальция с тропонином С и кривой развития силы (как функции $[Ca^{2+}]$), можно объяснить влиянием ТМ – два иона кальция кооперативно активируют один тропониновый комплекс, который, в свою очередь, активирует не один, а семь актиновых мономеров, действуя через ТМ. Результаты дальнейших биохимических экспериментов показали, что связывание субфрагмента 1 миозина (S1) с актиновым филаментом, содержащим ТМ, носит кооперативный характер, что выражается в наличии сигмоидной формы у кривой насыщения [121]. Результаты экспериментов Lehger и Moggis, измерявших актин-активируемую АТФазу S1 как функцию концентрации S1 в присутствии ТМ, показали нелинейный характер такой зависимости, что также говорит о кооперативности, приносимой ТМ в тонкий филамент. В данном случае, при низких концентрациях S1 наблюдалось ингибирование его АТФазной активности, тогда как при высокой концентрации S1 – наоборот, активация [122]. Такой же эффект имеет место и в системе, содержащей полностью реконструированный тонкий филамент (F-актин–ТМ–тропониновый комплекс). Эти данные уже сложно объяснить, если рассматривать только два состояния тонкого филамента – «OFF» (без кальция, связывание миозина невозможно) и «ON» (в присутствии кальция, связывание миозина возможно). Действительно, как же в присутствии кальция зависимость актин-активируемой АТФазы S1 от $[S1]$ может быть нелинейной, если в этом случае все сайты связывания головки миозина на актине доступны? Очевидно, для разрешения этих разногласий потребовалась модификация простой двухстадийной схемы OFF ($-Ca^{2+}$) \leftrightarrow ON ($+Ca^{2+}$). McKillor и Geeves, изучая связывание S1 с регулируемым тонким филаментом с помощью методов равновесного титрования и быстрой кинетики, пришли к выводу, что для адекватного описания наблюдаемых феноменов схема регуляции тонкого филамента должна включать не два, а три состояния [123]. Эти состояния были названы ими **B** (*Blocked*, связывание головки миозина не происходит), **C** (*Closed* = *Ca-induced*, головки миозина способны слабо связываться с актиновым филаментом) и **M** (*Myosin induced* или *Open*, головки миозина способны формировать сильное связывание с актином) (см. рис. 5).

Рис. 5 наглядно демонстрирует суть предлагаемой модели. Из него видно, что равновесие $C \leftrightarrow M$ определяется присутствием миозина в системе. Таким образом, введение этого дополнительного

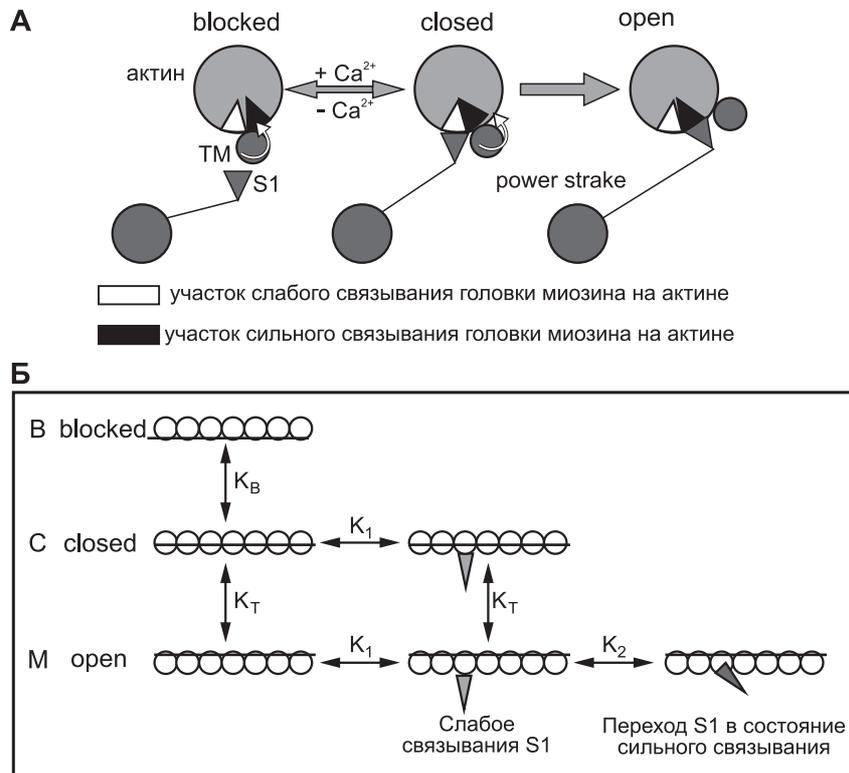


Рис. 5. Регуляция взаимодействия актина с миозином при участии тропонин-тропомиозинового комплекса.

А – схема регуляции актинового типа, включающая три разных состояния тонкого филамента («blocked», «closed» и «open»). Представлен вид с торца актиновых (сверху) и миозиновых (снизу) филаментов (по материалам статьи [123]).

Б – кинетическая схема «теории трех состояний» (по материалам статьи [123]; пояснения см. в тексте).

равновесия объясняет кооперативность связывания миозина с актином в присутствии ТМ. McKillor и Geeves предположили, что переход тонкого филамента из состояния С в состояние М сопряжен с переходом головки миозина из состояния слабого связывания в сильное [123]. Таким образом, авторам удалось объединить в рамках одной схемы как регуляторные процессы, так и процессы, связанные с самой АТФазной реакцией миозина и генерацией силы. Необходимо отметить, что кооперативность эффекта предусматривает

существование кооперативной единицы: в нашем случае это количество актиновых мономеров, переводимых в состояние **M** сильным связыванием одной головки миозина. Рассмотрим более подробно факторы, влияющие на различные стадии кинетической схемы «теории трех состояний» (рис. 5Б). Равновесная константа K_T имеет значение 0,2 в присутствии Ca^{2+} и значение $<0,2$ в отсутствие Ca^{2+} . Поскольку эта константа определяется свойствами самого тонкого филамента, она не зависит от связывания нуклеотида с S1, в отличие от константы K_2 , которая равна ~ 200 в отсутствие связанных нуклеотидов. Другой важный параметр, влияющий на равновесие $C \leftrightarrow M$, это размер кооперативной единицы, n . Поскольку соотношение кооперативных единиц в состояниях **C** и **M** составляет $M/C = K_T(1 + K_2)^n$, где m – количество актиновых мономеров, занятых S1 в пределах одной кооперативной единицы [124], размер кооперативной единицы влияет на M/C (чем больше n , тем больше шансов, что с одной кооперативной единицей свяжутся несколько молекул S1, увеличив, таким образом, отношение M/C). Константы K_T и K_2 мало зависят от свойств белков тонкого филамента, тогда как размер кооперативной единицы проявляет сильную зависимость от свойств ТМ. Например, Lehrer и соавторы установили, что размер кооперативной единицы в случае ТМ из гладких мышц мускульных желудков утки в два раза больше, чем в случае ТМ скелетных мышц [125]. Равновесие $B \leftrightarrow C$ зависит от Ca^{2+} и определяется равновесной константой K_B . Было показано, что значения этой константы не зависят от изоформ ТМ, зато на них сильно влияют различные изоформы тропонинов (цит. по [126]).

Дальнейшие исследования были направлены на выяснение структурных особенностей трех состояний тонкого филамента, предложенных McKillop and Geeves. Наличие атомной структуры головки миозина [127] и атомной модели актинового филамента [128] позволило проводить реконструкцию трехмерной структуры тонкого филамента на новом уровне. Используя электронную микроскопию, Lehman с соавторами провели реконструкцию комплекса F-актина, ТМ, тропонина и S1 в присутствии и в отсутствие кальция (цит. по [129]). Таким образом, им удалось выявить три различных положения тропомиозиновых тяжей на поверхности актинового филамента. Было показано, что переход из состояния В в состояние С, а потом в состояние М сопровождается смещением тропомиозиновой нити по направлению к «желобку» актинового филамента. Выше обсуждалось, что различные положения ТМ на поверхности актинового филамента энергетически мало различаются вследствие отсутствия специфических контактов между актином и

ТМ. Такое свойство ТМ определяет его как идеального кандидата для стерической регуляции – его положение на поверхности актинового филамента легко изменяется и определяется взаимодействиями с другими белками.

В заключение этого раздела интересно рассмотреть вопрос о том, как влияет конформационная подвижность центральной части молекулы ТМ на выполняемые им регуляторные функции. Нам удалось показать, что стабилизация центральной части ТМ путем замены неканонического остатка Gly126 на остаток Arg оказывает заметное влияние на регуляторные свойства ТМ в полностью реконструированных тонких филаментах (т.е. филаментах, состоящих из F-актина, ТМ и тропонина): это проявляется в двукратном увеличении актин-активируемой АТФазы S1 при высоких концентрациях кальция (при $pCa = 5$) [47]. Такой же эффект был ранее продемонстрирован в группе S. Lehrer в случае мутации Asp137Leu в центральной части молекулы α -ТМ [46]. Таким образом, можно заключить, что данный эффект обуславливается именно стабилизацией центральной части молекулы ТМ, а не заменой конкретного аминокислотного остатка. Основываясь на описанной выше теории трех состояний тонкого филамента [123], мы предполагаем, что двукратное увеличение актин-активируемой АТФазы миозина при высокой концентрации Ca^{2+} в случае мутации Gly126Arg объясняется сдвигом равновесия между состояниями С (closed) и М (open) в сторону последнего из них [47]. Представляется вполне вероятным, что именно сниженная конформационная подвижность ТМ с мутациями Gly126Arg или Asp137Leu может быть ответственной за этот сдвиг. Действительно, если связанный с актином ТМ более жесткий (как это предполагается в случае ТМ с мутациями Gly126Arg или Asp137Leu), то это должно вызывать увеличение размера кооперативной единицы регуляторной системы тонкого филамента. В этом случае переход одной головки миозина из состояния слабого связывания в состояние сильного связывания, которое сопровождается перемещением ТМ на поверхности актина, должен «включать» больше соседних сайтов на актиновой нити для взаимодействия с миозином и, соответственно, больше головок миозина будет прочно связываться с актином. Именно такая повышенная кооперативность взаимодействия головок миозина с актином, обусловленная повышенной жесткостью центральной части молекулы ТМ, и является, по нашему мнению, причиной заметного увеличения АТФазной активности в этих условиях.

IV. МИОПАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В ТРОПОМИОЗИНАХ

Выше уже обсуждались различные эффекты направленных мутаций в ТМ на его сродство к актину. В данном, заключительном разделе мы проанализируем функциональные эффекты некоторых избранных мутаций в ТМ, ассоциированных с развитием наследственных заболеваний мышц. В основе патогенеза большинства миопатий, т.е. нарушений в структуре и функции мышц, лежат наследственные факторы. В число подобных заболеваний входят немалиновые миопатии [130], дистальные артрогриппозы [131] и наследственные кардиомиопатии в двух своих вариантах – гипертрофическая (ФНС, Familial Hypertrophy Cardiomyopathy) и дилатационная (DCM, Dilated Cardiomyopathy) [132, 133]. Немалиновые миопатии проявляются в виде генерализованной мышечной слабости и присутствия так называемых немалиновых телец в скелетных мышцах [130]. Частота встречаемости немалиновых миопатий — 1 случай на 50000 новорожденных [134]. Генетический анализ показал, что эти миопатии ассоциированы с мутациями в генах β -ТМ (*TPM2*) и α -ТМ_{slow} (*TPM3*, или γ -Тм). Наиболее известные мутации в α -ТМ_{slow} — это замены Met9Arg и Arg167His. Определенный прогресс в понимании патогенеза немалиновых миопатий сыграло появление трансгенных мышечей, несущих мутацию Met9Arg в гене *TPM3*. Было установлено, что в медленных мышцах таких мышечей нарушается соотношение гетеродимерных и гомодимерных форм ТМ, что может являться частью механизма развития болезни [134]. Основные симптомы в случае дистальных артрогриппозов – это повышенная сократимость (контрактура) мышц конечностей в отсутствие каких-либо явных морфологических изменений и неврологических расстройств [131, 134]. Подавляющее число случаев артрогриппоза ассоциировано с мутациями в гене β -ТМ (*TPM2*), хотя также встречаются мутации в генах тропонинов. На сегодняшний день практически не имеется сведений о механизмах развития данных патологий.

В случае кардиомиопатий наблюдаются обширные морфологические изменения ткани миокарда. ФНС проявляется в виде увеличения массы сердечной мышцы, в основном за счет утолщения (гипертрофии) стенки левого желудочка. Как следствие, при этом объем полости левого желудочка уменьшается. Несмотря на такую патологическую морфологию, сократительная функция при ФНС нарушается редко, а иногда даже превышает по показателям норму; тем не менее, наличие данной кардиомиопатии в большинстве случаев приводит к сердечной недостаточности или внезапной остановке сердца. Развитие ФНС может быть связано с наличием

мутаций во многих сократительных белках (актин, ТМ, тропонины, тяжелая цепь миозина, миозин-связывающий С-белок) [132, 133]. В случае ТМ наиболее ярким примером мутаций, ассоциированных с ФНС, являются замены Asp175Asn и Glu180Gly в α -ТМ_{fast} (ген *TRPM1*), изучению которых посвящено большое количество работ [135]. Определенный прогресс в понимании механизмов развития кардиомиопатий данного типа был достигнут трудами Х. Уоткинса, Ч. Редвуда и соавторов. Ими было установлено, что основной функциональный эффект, объединяющий ФНС мутации, заключался в повышении кальциевой чувствительности тонкого филамента (цит. по [135]). Главные характеристики DCM – это увеличение объема полостей желудочков, утоньшение их стенок, аритмия, сердечная недостаточность и в ряде случаев – летальный исход. Характерно, что ассоциированные с DCM мутации в ТМ (например, замены Glu40Lys и Glu54Lys в α -ТМ_{fast}) вызывают, в отличие от ФНС, снижение кальциевой чувствительности тонкого филамента.

В большинстве случаев причиной той или иной миопатии являются мутации в регуляторных белках тонкого филамента. Именно поэтому изучение структуры и функций белков, несущих такие мутации, может оказаться полезным для понимания механизмов развития миопатий и разработки подходов к их коррекции. Кроме того, мутантные белки представляют собой удобную модельную систему для изучения принципов устройства и функционирования данных молекул.

Основные методические подходы, применяемые для изучения миопатических мутаций в регуляторных белках (ТМ и тропонины), сводятся в основном к характеристикам функциональных свойств реконструированного тонкого филамента. Это измерение кальциевой чувствительности тонкого филамента и актин-активируемой АТФазы миозиновой головки, а также изучение скорости перемещения реконструированных тонких филаментов в системе *in vitro motility*. Такие исследования зачастую дают представление об общих тенденциях изменений в функционировании тонкого филамента, содержащего мутацию в одном из своих компонентов. Например, в статье С. Марстона с соавторами [136] в случае всех исследованных мутантов тропонинов Т и С наблюдалось уменьшение АТФазной активности актомиозина и ее кальциевой чувствительности. Однако, несмотря на всю пользу и многочисленность данных исследований, конкретная причина нарушений функционирования тонкого филамента в них зачастую остается неясной. Именно поэтому наиболее плодотворный результат приносит совмещение функциональных и структурных

подходов, таких как спектроскопия кругового дихроизма [137], использование флуоресцентных меток [138], дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и изучение температурных зависимостей диссоциации комплексов тропомиозина с F-актином [55]. Хорошим примером подобного совмещения является работа Марстона с соавторами [61], где упомянутые выше функциональные тесты удачно сочетаются с изучением методом ДСК тепловой денатурации препаратов α -ТМ, несущих DCM мутации Glu40Lys и Glu54Lys, и их комплексов с F-актином.

Имеются и другие примеры успешного применения метода ДСК в сочетании с другими методами и подходами для исследования препаратов ТМ, несущих миопатические мутации. Так, например, было показано, что из двух мутаций в молекуле α -ТМ, ассоциированных с ФНС, одна (Asp175Asn) не оказывает существенного влияния на тепловую денатурацию связанного с F-актином ТМ, тогда как вторая (Glu180Gly) заметно снижает термостабильность ТМ, присоединенного к F-актину, и температуру его диссоциации с поверхности актинового филамента [55]. Эти данные впервые позволили объяснить серьезную разницу в физиологических эффектах этих мутаций в молекуле ТМ. Известно, что мутация Asp175Asn вызывает лишь легкую сердечную недостаточность, тогда как мутация Glu180Gly 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) ТМ с мутацией Glu180Gly начинает диссоциировать с поверхности актиновых филаментов и денатурировать, что и приводит в конечном счете к столь тяжелым последствиям. Не менее интересные результаты были получены недавно при исследованиях β -ТМ с мутацией Arg91Gly, ассоциированной с развитием дистального артрогриппоза [62, 63]. Оказалось, что эта мутация оказывает очень сильное влияние на структуру и свойства β -ТМ: она вызывает значительные структурные изменения в его молекуле, резко снижая термостабильность ее N-концевой части [62, 63], в значительной степени подавляет способность β -ТМ к образованию $\alpha\beta$ -гетеродимеров с α -изоформой ТМ и существенно снижает сродство β -ТМ к F-актину. Все это свидетельствует о том, что β -ТМ с мутацией Arg91Gly неспособен нормально исполнять свои функции в мышце, и отчасти позволяет объяснить, почему эта мутация в β -ТМ ассоциирована с наследственным заболеванием мышц – дистальным артрогриппозом.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Завершая обзор, можно заключить, что в последнее время представления о структуре ТМ и об особенностях его взаимодействия с актином существенно изменяются. Если раньше ТМ считался одним из самых типичных представителей в своем классе белков с суперспиральной структурой, то в настоящее время данная концепция активно пересматривается. Отмечаются необычные, характерные только для ТМ черты структуры, которые обуславливают выполняемые им важнейшие функции в регуляции мышечного сокращения. Удивительным свойством молекулы ТМ является то, что несмотря на кажущуюся однородность структуры (фибриллярный α -спиральный белок), свойства различных участков молекулы резко отличаются друг от друга. Согласно современным представлениям, молекула ТМ состоит из двух относительно стабильных и достаточно жестких доменов (N- и C-концевого), соединенных подвижным центральным участком. Высокая конформационная подвижность центральной части молекулы ТМ и ее влияние на функциональные свойства данного белка являются в настоящее время предметом острой дискуссии. В частности, интенсивно обсуждается роль такой подвижности в осуществлении взаимодействия ТМ с актином и в перемещениях ТМ по поверхности актинового филамента, лежащих в основе молекулярного механизма регуляции мышечного сокращения. Таким образом, вопрос о структурно-функциональных взаимосвязях в молекуле ТМ, который мы постарались осветить в настоящем обзоре, не имеет на сегодняшний день однозначного ответа и интенсивно обсуждается в современной литературе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bailey, K. (1948) *Biochem. J.*, **43**, 271–279.
2. Astbury, W.T., Reed, R., Spark, L.C. (1948) *Biochem. J.*, **43**, 282–287.
3. Crick, F.H.C. (1953) *Acta Cryst.*, **6**, 689–697.
4. Sodek, J., Hodges, R.S., Smillie, L.B., Jurasek, L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3800–3804.
5. Stone, D., Smillie, L.B. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 1137–1148.
6. Lehrer, S.S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3377–3381.
7. Parry, D.A. (1975) *J. Mol. Biol.*, **98**, 519–535.
8. McLachlan, A.D., Stewart, M., Smillie, L.B. (1975) *J. Mol. Biol.*, **98**, 281–291.
9. O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S., Alber, T. (1991) *Science*, **254**, 539–544.
10. Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V. (2001) *Trends Cell Sci.*, **11**, 82–88.
11. O'Shea, E.K., Ruthkowski, R., Kim, P. (1992) *Cell*, **68**, 699–708.

12. Arndt, K.M., Pelletier, J.N., Miller, K.M., Plickthun, A., Alber, T. (2002) *Structure*, **10**, 1235–1248.
13. Lau, S.Y., Taneja, A.K., Hodges, R.S. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 13253–13261.
14. Wagschal, K., Tripet, B., Lavigne, P., Mant, C., Hodges, R.S. (1999) *Protein Sci.*, **8**, 2312–2329.
15. Tripet, B., Wagschal, K., Lavigne, P., Mant, C., Hodges, R.S. (2000) *J. Mol. Biol.*, **300**, 377–402.
16. Tang, Y., Tirrell, D.A. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11089–11090.
17. Zhou, N.E., Kay, C.M., Hodges, R.S. (1994) *J. Mol. Biol.*, **237**, 500–512.
18. Mason, J.M., Arndt, K.M. (2004) *Chem. BioChem.*, **5**, 170–176.
19. Brown, J.H., Cohen, C., Parry, D. (1996) *Proteins*, **26**, 134–145.
20. Herrmann, H., Häner, M., Brettel, M., Ku, N.-O., Aebi, U. (1999) *J. Mol. Biol.*, **286**, 1403–1420.
21. Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., Wiley, D.C. (1994) *Nature*, **371**, 37–43.
22. Pace, C.N., Scholtz, J.M. (1998) *Biophys. J.*, **75**, 422–427.
23. Kwok, S.C., Hodges, R.S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 35248–35254.
24. Kwok, S.C., Hodges, R.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 21576–21588.
25. Perry, S.V. (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **22**, 5–49.
26. Liu, H.P., Bretscher, A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 90–93.
27. Jung-Ching Lin, J., Eppinga, R.D., Warren, K.S., McCrae, K.R. (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 201–222.
28. Gunning, P.W., Schevzov, G., Kee, A.J., Hardeman, E.C. (2005) *Trends in Cell Biol.*, **15**, 333–341.
29. Gunning, P., Gordon, M., Wade, R., Gahlmann, R., Lin, C.S., Hardeman, E. (1990) *Dev. Biol.*, **138**, 443–453.
30. Kee, A.J., Hardeman, E.C. (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 143–15.
31. Nilsson, J., Taijsharghi, H. (2008) *Eur. J. Neurol.*, **15**, 573–578.
32. Sanders, C., Burtnick, L.D., Smillie, L.B. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 12774–12778.
33. Strand, J., Nili, M., Homsher, E., Tobacman, L.S. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 34832–34839.
34. Li, X.(E.), Lehman, W., Fischer, S., Holmes, K.C. (2010) *J. Struct. Biol.*, **170**, 307–312.
35. Lehrer, S.S. (1978) *J. Mol. Biol.*, **118**, 209–226.
36. Yukioka, S., Noda, I., Nagasawa, M., Holtzer, M.E., Holtzer, A. (1985) *Macromolecules*, **18**, 1083–1086.
37. Betteridge, D.R., Lehrer, S.S. (1982) *J. Mol. Biol.*, **167**, 481–496.
38. Greenfield, N., Hitchcock-DeGregori, S. (1993) *Protein Sci.*, **2**, 1263–1273.
39. Betcher-Lange, S.L., Lehrer, S.S. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 3757–3760.
40. Graceffa, P., Lehrer, S.S. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 11296–11300.
41. Ishii, Y., Lehrer, S.S. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 6894–6903.
42. Ooi, T. (1967) *Biochemistry*, **6**, 2433–2439.
43. Gorecka, A., Drabikowski, W. (1977) *FEBS Lett.*, **75**, 145–148.
44. Pato, M.D., Mak, A.S., Smillie, L.B. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 593–601.
45. Ueno, H. (1984) *Biochemistry*, **23**, 4791–4798.
46. Sumida, J.P., Wu, E., Lehrer, S.S. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 6728–6734.
47. Nevzorov, I.A., Nikolaeva, O.P., Kainov, Y.A., Redwood, C.S., Levitsky, D.I. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 15766–15772.
48. Brown, J. H., Kim, K.H., Jun, G., Greenfield, N.J., Dominguez, R., Volkmann, N., Hitchcock-DeGregori, S.E., Cohen, C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 8496–8501.

49. Brown, J. H., Zhou, Z., Reshetnikova, L., Robinson, H., Yammani, R.D., Tobacman, L.S., Cohen, C. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **102**, 18878–18883.
50. Williams, D.L., Jr., Swenson, C.A. (1981) Biochemistry, **20**, 3856–3864.
51. Ishii, Y., Hitchcock-DeGregori, S., Mabuchi, K., Lehrer, S.S. (1992) Protein Sci., **1**, 1319–1325.
52. Potekhin, S. A., Privalov, P.L. (1982) J. Mol. Biol., **159**, 519–535.
53. Sturtevant, J.M., Holtzer, M.E., Holtzer, A. (1991) Biopolymers, **31**, 489–495.
54. O'Brien, R., Sturtevant, J.M., Wrabl, J., Holtzer, M.E., Holtzer, A. (1996) Biophys. J., **70**, 2403–2407.
55. Kremneva, E., Boussouf, S., Nikolaeva, O., Maytum, R., Geeves, M.A., Levitsky, D.I. (2004) Biophys. J., **87**, 3922–3933.
56. Левецкий Д.И. (2004) Успехи биол. химии, **44**, 133–170.
57. Levitsky, D.I. (2004) In: «The nature of biological systems as revealed by thermal methods» /ed. D. Lőrinczy/, Dordrecht/Boston/London: Kluwer Acad. Publ., 127–158.
58. Kremneva, E., Nikolaeva, O., Maytum, R., Arutyunyan, A.M., Kleimenov, S.Yu., Geeves, M.A., Levitsky, D.I. (2006) FEBS J., **273**, 588–600.
59. 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.
60. Кремнева Е.В., Николаева О.П., Гусев Н.Б., Левецкий Д.И. (2003) Биохимия, **68**, 976–984.
61. Mirza, M., Robinson, P., Kremneva, E., Copeland, O., Nikolaeva, O., Watkins, H., Levitsky, D., Redwood, C., EL-Mezgueldi, M., Marston, S. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 13487–13497.
62. Невзоров И.А., Редвуд Ч.С., Левецкий Д.И. (2008) Биофизика, **53**, 917–921.
63. Nevzorov, I.A., Redwood, C.S., Levitsky, D.I. (2008) J. Muscle Res. Cell Motil., **29**, 173–176.
64. Whitby, F.G., Phillips, G.N. Jr. (2000) Proteins, **38**, 49–59.
65. Nitanaï, Y., Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Maeda, Y. (2007) Adv. Exp. Med. Biol., **592**, 137–151.
66. Li, Y., Mui, S., Brown, J.H., Strand, J., Reshetnikova, L., Tobacman, L.S., Cohen, C. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 7378–7383.
67. Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Wakabayashi, K., Nitanaï, Y., Maeda, Y. (2008) Biophys. J., **95**, 710–719.
68. Greenfield, N.J., Palm, T., Hitchcock-DeGregori, S.E. (2002) Biophys. J., **83**, 2754–2766.
69. Brown, J.H. (2010) Protein Sci., **19**, 1366–1375.
70. Eaton, B.L., Kominz, D.R., Eizenberg, E. (1975) Biochemistry, **14**, 2718–2725.
71. Yang, Y.-Z., Gordon, D., Korn, E.D., Eizenberg, E. (1977) J. Biol. Chem., **252**, 3374–3378.
72. Yang, Y.-Z., Korn, E.D., Eizenberg, E. (1979) J. Biol. Chem., **254**, 7137–7140.
73. Mak, A.S., Smillie, L.B. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., **101**, 208–214.
74. Dabrowska, R., Nowak, E., Drabikowski, W. (1983) J. Muscle Res. Cell Motil., **4**, 143–161.
75. Goonasekara, C.L., Gallivan, L.J., Jackman, D.M., Heeley, D.H. (2007) J. Muscle Res. Cell Motil., **28**, 175–182.
76. Hitchcock-DeGregori, S.E., Heald, R.W. (1987) J. Biol. Chem., **262**, 9730–9735.
77. Monteiro, P.B., Lataro, R.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 10461–10466.
78. Pittenger, M.F., Kistler, A., Helfman, D.M. (1995) J. Cell. Sci., **108**, 3253–3265.

79. Urbancikova, M., Hitchcock-DeGregori, S.E. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 24310–24315.
80. Hilarioa, E., Latarob, R.L., Alegriaa, M.C., Lavardaa, S.C.S., Ferrob, J.A., Bertolini, M.C. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **284**, 955–960.
81. Johnson, M., Coulton, A.T., Geeves, M.A., Mulvihill, D.P. (2010) *PLoS One*, **5**, e15801.
82. Greenfield, N.J., Huang, Y.J., Swapna, G.V., Bhattacharya, A., Rapp, B., Singh, A., Montelione, G.T., Hitchcock-DeGregori, S.E. (2006) *J. Mol. Biol.*, **36**, 480–496.
83. Frye, J., Klenchin, V.A., Rayment, I. (2010) *Biochemistry*, **49**, 4908–4920.
84. Tobacman, L.S. (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 85–94.
85. Eaton, B.L. (1976) *Science*, **192**, 1337–1339.
86. Cassell, M., Tobacman, L.S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 12867–12872.
87. McLachlan, A.D., Stewart, M. (1976) *J. Mol. Biol.* **103**, 271–298.
88. Phillips, G.N.Jr. (1986) *J. Mol. Biol.*, **192**, 128–131.
89. Hitchcock-DeGregori, S.E., An, Y. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 3600–3603.
90. Hitchcock-DeGregori, S.E., Varnell, T.A. (1990) *J. Mol. Biol.*, **214**, 885–896.
91. Hammel, R.L., Hitchcock-DeGregori, S.E. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22409–22416.
92. Hitchcock-DeGregori, S.E., Song Y., Greenfield, N.J. (2002) *Biochemistry*, **41**, 15036–15044.
93. Hichcock-DeGregori, S.E., Singh, A. (2006) *Structure*, **14**, 43–50.
94. Hitchcock-DeGregori, S.E., Singh, A. (2010) *J. Struct. Biol.*, **170**, 319–324.
95. Singh, A., Hitchcock-DeGregori, S.E. (2003) *Biochemistry*, **42**, 14114–14121.
96. Holmes, K.C., Lehman, W. (2008) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **29**, 213–219.
97. Wegner, A. (1980) *FEBS Lett.*, **119**, 245–248.
98. Lorenz, M., Poole, K.J.V., Popp, D., Rosenbaum, G., Holmes, K.C. (1995) *J. Mol. Biol.*, **246**, 108–119.
99. Poole, K.J., Lorenz, M., Evans, G., Rosenbaum, G., Pirani, A., Tobacman, L.S., Lehman, W., Holmes, K.C. (2006) *J. Struct. Biol.*, **155**, 273–284.
100. Li, X., Holmes, K., Lehman, W., Jung, H., Fischer, S. (2010) *J. Mol. Biol.*, **395**, 327–339.
101. Li, X., Lehman, W., Fischer, S. (2011) *J. Struct. Biol.*, **170**, 313–318.
102. Li, X., Tobacman, L.S., Mun, J., Craig, R., Fischer, S., Lehman, W. (2011) *Biophys. J.*, **100**, 1005–1013.
103. Fujime, S., Ishiwata, S. (1971) *J. Mol. Biol.*, **62**, 251–265.
104. Hitchcock, S.E., Carisson, L., Lindberg, U. (1976) *Cell*, **7**, 531–542.
105. Ishikawa, R., Yamashiro, S., Matsu-mura, F. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 7490–7497.
106. Bamburg, J.R. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 185–230.
107. Blanchoin, L., Pollard, T.D., Hitchcock-DeGregori, S.E. (2001) *Curr. Biol.*, **11**, 1300–1304.
108. Gupton, S.L., Anderson, K.L., Kole, T.P., Fischer, R.S., Ponti, A., Hitchcock-DeGregori, S.E., Danuser, G., Fowler, V.M., Wirtz, D., Hanein, D., Waterman-Storer, C.M. (2005) *J. Cell. Biol.*, **168**, 619–631.
109. Huxley, H. E. (1957) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 631–648.
110. Margossian, S.S., Lowey, S. (1973) *J. Mol. Biol.*, **74**, 313–330.
111. Engelhardt, W.A., Liubimova, M.N. (1939) *Nature*, **144**, 688.
112. Bagshaw, C.R., Trentham, D.R. (1973) *Biochem. J.*, **133**, 323–328.
113. White, H.D., Taylor, E.W. (1976) *Biochemistry*, **15**, 5818–5826.

114. *Lynn, R.W., Taylor, E.W.* (1971) *Biochemistry*, **10**, 4617–4624.
115. *Кубасова Н.А., Цатурян А.К.* (2011) *Успехи биол. химии*, **51**, 233–282.
116. *Huxley, H.E., Simmons, R.M., Faruqi, A.R., Kress, M., Bordas, J., Koch, M.H.J.* (1981) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**, 2297–2301.
117. *Irving, M., Lombardi, V., Piazzesi, G., Ferenczi, M.A.* (1992) *Nature*, **357**, 156–158.
118. *Holmes, K.C., Geeves, M.A.* (2000) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **355**, 419–431.
119. *Squire, J.M., Morris, E.P.* (1998) *FASEB J.*, **12**, 761–771.
120. *Grabarek, Z., Grabarek, J., Leavis, P.C., Gergely, J.* (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 14098–14102.
121. *Greene, L.E., Eisenberg, E.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2616–2620.
122. *Lehrer, S.S., Morris, E.P.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 8073–8080.
123. *McKillop, D.F.A., Geeves, M.A.* (1993) *Biophys. J.*, **65**, 693–701.
124. *Maytum, R., Lehrer, S.S., Geeves, M.A.* (1999) *Biochemistry*, **38**, 1102–1110.
125. *Lehrer, S.S., Golitsina, N.L., Geeves, M.A.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 13449–13455.
126. *Boussouf, S.E., Geeves, M.A.* (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **592**, 99–109.
127. *Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M.* (1993) *Science*, **261**, 50–58.
128. *Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W.* (1990) *Nature*, **347**, 44–49.
129. *Lehman, W., Craig, R.* (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 95–109.
130. *Donner, K., Ollikainen, M., Ridanpaa, M., Chretien, H.-J., Goebel, H., Visser, M., de Pelin, K., Wallgren-Petersson, C.* (2002) *Neuromuscular Disorders*, **12**, 151–158.
131. *Robinson, P., Lipscomb, S., Preston, L., Altin, E., Watkins, H., Ashley, C., Redwood, C.* (2007) *FASEB J.*, **21**, 896–905.
132. *Seidman, J.G., Seidman, C.* (2001) *Cell*, **104**, 557–567.
133. *Fatkin, D., Graham, R.M.* (2002) *Physiol. Rev.*, **82**, 945–980.
134. *Kee, A.J., Hardeman, E.C.* (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 143–15.
135. *Wieczorek, D.F., Jagatheesan, G., Rajan, S.* (2008) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **644**, 132–142.
136. *Mirza, M., Marston, S., Willott, R., Ashley, C., Mogensen, J., McKenna, W., Robinson, P., Redwood, C., Watkins, H.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 28498–28506.
137. *Hichcock-DeGregori, S.E., Singh, A.* (2006) *Structure*, **14**, 43–50.
138. *Golitsina, N., Yougmi, A., Greenfield, N., Thierfelder, L., Iizuka, K., Seidman, J., Seidman, C., Lehrer, S., Hitchcock-DeGregori, S.E.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 4637–4642.