

Российская Академия Наук

Институт цитологии

---

*На правах рукописи*

РЫСЕВ Никита Александрович

**МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ РАБОТЫ АКТОМИОЗИНОВОГО МОТОРА  
В МЫШЕЧНОМ ВОЛОКНЕ МУТАЦИЯМИ ТРОПОМИОЗИНА**

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Научный руководитель:

доктор биологических наук, проф.

Юрий Сергеевич Боровиков

Санкт-Петербург

2015

## Оглавление

|                                                                                                                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Введение .....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>5</b>  |
| <b>Глава 1. Обзор литературы.....</b>                                                                                                                                                                        | <b>12</b> |
| 1.1. Структура и функция актина .....                                                                                                                                                                        | 12        |
| 1.2. Структура и функция миозина .....                                                                                                                                                                       | 17        |
| 1.3. Структура и функция тропомиозина .....                                                                                                                                                                  | 23        |
| 1.4. Области взаимодействия актина, миозина и тропомиозина .....                                                                                                                                             | 27        |
| 1.5. Мутации тропомиозина, связанные с наследственными<br>заболеваниями мышечной ткани человека .....                                                                                                        | 36        |
| <b>Глава 2. Материалы и методы .....</b>                                                                                                                                                                     | <b>45</b> |
| 2.1. Получение глицеринизированных мышечных волокон.....                                                                                                                                                     | 45        |
| 2.2. Приготовление теневых мышечных волокон.....                                                                                                                                                             | 46        |
| 2.3. Выделение миозина.....                                                                                                                                                                                  | 46        |
| 2.4. Получение субфрагмента-1 миозина .....                                                                                                                                                                  | 47        |
| 2.5. Получение рекомбинантного $\alpha$ - и $\beta$ -тропомиозина .....                                                                                                                                      | 47        |
| 2.6. Модификация мышечных белков флуоресцентными зондами .....                                                                                                                                               | 49        |
| 2.7. Реконструкция сократительной и регуляторной системы в теневом<br>мышечном волокне .....                                                                                                                 | 51        |
| 2.8. Определение концентрации мышечных белков .....                                                                                                                                                          | 51        |
| 2.9. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле .....                                                                                                                                                          | 51        |
| 2.10. Метод поляризационной микрофлуориметрии .....                                                                                                                                                          | 52        |
| <b>Глава 3. Результаты и обсуждение.....</b>                                                                                                                                                                 | <b>55</b> |
| 3.1. Влияние мутации Gly126Arg в $\alpha$ - и $\beta$ -изоформах ТМ на структурное<br>состояние актина и ТМ при моделировании различных промежуточных<br>стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне. .... | 55        |

|                                                                                                                                                                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2. Влияние мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в $\alpha$ -TM на структурное состояние актина, $\alpha$ -тропомиозина и субфрагмента-1 миозина при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне. .... | 76         |
| 3.3. Влияние мутаций Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в $\beta$ -TM на структурное состояние актина, $\beta$ -скелетного TM и S1 в цикле гидролиза АТФ .....                                                                               | 100        |
| <b>Выводы .....</b>                                                                                                                                                                                                                      | <b>114</b> |
| <b>Список работ, опубликованных по теме диссертации .....</b>                                                                                                                                                                            | <b>115</b> |
| <b>Список цитированной литературы .....</b>                                                                                                                                                                                              | <b>119</b> |

## Список используемых сокращений

|                                                          |                                                                |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| АМ – актомиозин                                          | EGTA – этиленгликольтетраацетат                                |
| АДФ (ADP) –                                              | F-актин – фибриллярный актин                                   |
| аденозиндифосфорная кислота                              | FITC – флуоресцеин 5-изотиоцианат                              |
| АТФ (ATP) –                                              | G-актин – глобулярный актин                                    |
| аденозинтрифосфорная кислота                             | 1,5-IAEDANS – N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтило)этилендиамин |
| АТФаза – аденозинтрифосфатаза                            | 5-IAF – 5-йодоацетамидофлуоресцеин                             |
| ДСН – додецилсульфат натрия                              | LB – жидкая среда Лурия-Бертрани                               |
| ПААГ – полиакриламидный гель                             | NEM – N-этилмалеимид                                           |
| ПЦР – полимеразно-цепная реакция                         | PMSF – фенилметилсульфонил флуорид                             |
| ТМ – тропомиозин                                         | pPDM – N,N'-пара-фенилдималеимид                               |
| ТН – тропонин                                            | S1 – субфрагмент-1 миозина                                     |
| Ф <sub>н</sub> (P <sub>i</sub> ) – неорганический фосфат | Tris – три(оксиметил)аминометан                                |
| ГКМ – гипертрофическая кардиомиопатия                    | TBE – Tris-боратный-EDTA буфер                                 |
| ДКМ – дилатационная кардиомиопатия                       | TRITC – тетраметилродамин-изотиоцианат                         |
| ДА – дистальный артрогрипоз                              |                                                                |
| НМ – немалиновая миопатия                                |                                                                |
| CFTD – врождённая диспропорция типов мышечных волокон    |                                                                |
| AMPPNP – аденозин 5'-[β'γ-имидо]трифосфорная кислота     |                                                                |
| АТРγS – аденозин 5'-[γ-тио]-трифосфорная кислота         |                                                                |
| DTT – DL-дителиотреитол                                  |                                                                |
| EDTA – этилендиаминтетраацетат                           |                                                                |

## Введение

**Актуальность проблемы.** Выяснение молекулярных механизмов мышечного сокращения является одной из фундаментальных проблем клеточной биологии. На данный момент хорошо известно, что генерация силы сердечной и скелетной мышц является результатом циклических взаимодействий миозиновых поперечных мостиков с актином и аденозинтрифосфорной кислотой (АТФ), которые запускаются освобождением ионов кальция из саркоплазматической сети. В цикле гидролиза АТФ поперечные мостики проходят через несколько конформационных состояний, так называемых «сильных» и «слабых» форм связывания миозина с актином [Geeves, Holmes 2005]. Регуляция взаимодействия актина с миозином осуществляется тропомиозином (ТМ) и кальций-чувствительным белком тропонином, которые формируют с F-актином тонкую нить саркомера мышечного волокна. Предполагается, что при низкой концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  тропомиозин занимает блокирующую позицию на периферии тонкой нити и закрывает участки актина, с которыми миозин способен формировать как сильные, так и слабые формы связывания [McKillop, Geeves, 1993]. Активация сокращения мышечного волокна происходит при увеличении концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и их связывании с тропонином. При этом тропомиозин, изменяя свою конформацию, сдвигается от внешнего домена актина по направлению к центру нити в закрытую позицию, позволяя миозину формировать слабые формы связывания с актином [Galińska-Rakoczy et al., 2008]. Только тогда, когда миозин смещает тропомиозин к внутреннему домену актина в открытую позицию, все области связывания миозина на актине открываются, и между миозином и актином образуются существенные для генерации силы сильные формы связывания [Houmeida et al., 2010].

Нарушение этого взаимодействия и его регуляции вследствие точечных мутаций в мышечных белках приводит к серьезным структурным и функциональным нарушениям в мышечной клетке. Так, в генах тропомиозина идентифицировано большое количество мутаций, вызывающих такие наследственные заболевания, как гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии, немалиновая миопатия, «кэп»-миопатия, и дистальный артрогрипоз. Врожденные миопатии разнородны по клиническим, гистологическим и генетическим признакам [Wallgren-Pettersson et al., 2011]. Гипертрофическая кардиомиопатия – одно из серьезных заболеваний миокарда, сопровождающееся его дисфункцией. Это заболевание характеризуется гипертрофией стенок левого желудочка сердца без расширения его полости, усилением систолической и нарушением диастолической функций. При дилатационной кардиомиопатии развиваются дилатации (растяжения) полостей сердца, с нарушением систолической функции без увеличения толщины стенок. Немалиновая миопатия характеризуется мышечной слабостью и наличием немалиновых тел в мышечных волокнах. «Кэп»-миопатия диагностируется при мышечной слабости и обнаружении шапочкообразных, или «кэп»-структур под сарколеммой мышечных волокон. При дистальном артрогрипозе повреждаются дистальные отделы конечностей. Данное заболевание сопровождается мышечными контрактурами, деформацией конечностей, недоразвитием суставов и мышц, фиброзом. Молекулярные механизмы нарушения регуляции сократительной функции мутациями в тропомиозине при этих заболеваниях изучены недостаточно.

**Цели и задачи работы.** Цель настоящей работы состояла в изучении механизма нарушений регуляции тропомиозином взаимодействия актина и миозина, вызванных точечными мутациями в генах *TPM1* и *TPM2* тропомиозина человека.

В задачи работы входило:

1. Исследовать конформационные перестройки, происходящие в F-актине, субфрагменте 1 миозина,  $\alpha$ -тропомиозине сердечных мышц и  $\beta$ -тропомиозинах скелетных и гладких мышц, при моделировании ряда последовательных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне.
2. Изучить влияние точечных мутаций Glu180Gly или Asp175Asn  $\alpha$ -тропомиозина, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией, на изменение позиции тропомиозина и на конформационные изменения актина и субфрагмента 1 миозина, происходящие в мышечном волокне в цикле гидролиза АТФ.
3. Исследовать характер движения  $\beta$ -тропомиозина скелетных мышц с мутациями Arg91Gly или Glu139del, которые вызывают дистальный артрогрипоз и «кэп»-миопатию, и  $\beta$ -тропомиозина скелетных мышц с мутацией Glu41Lys, которая ассоциирована с немалиновой миопатией, на конформационные изменения актина и субфрагмента 1 миозина в АТФазном цикле.
4. Изучить влияние точечной мутации Gly126Arg, вызывающей стабилизацию структуры центральной области  $\alpha$ -тропомиозина скелетных и  $\beta$ -тропомиозина гладких мышц, на движение тропомиозина и конформационные изменения актина в цикле гидролиза АТФ.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. В цикле гидролиза АТФ существуют несколько различных структурных состояний  $\alpha$ -тропомиозина сердечных мышц и  $\beta$ -тропомиозина скелетных и гладких мышц человека, которые отличаются между собой гибкостью тропомиозинового тяжа и его позицией на актиновых нитях. Движение тропомиозина к центру нити (к внутреннему домену актина) сопряжено со смещением равновесия в сторону «включения» мономеров актина и образования сильной формы связывания головок миозина с актином, в то время как движение

тропомиозина к периферии актиновой нити (к внешнему домену актина) сопровождается «выключением» мономеров актина и образованием слабой формы связывания головок миозина и актина.

2. Точечные мутации Glu180Gly и Asp175Asn в  $\alpha$ -тропомиозине сердечных мышц, Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в  $\beta$ -тропомиозине скелетных мышц и Gly126Arg в  $\alpha$ -тропомиозине скелетных и  $\beta$ -тропомиозине гладких мышц нарушают характер движения тропомиозина на поверхности актиновой нити в цикле гидролиза АТФ и вызывают аномальные конформационные изменения актина и головок миозина.

3. Мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном  $\alpha$ -тропомиозине, ассоциированные с гипертрофической кардиомиопатией, и мутация Arg91Gly в  $\beta$ -тропомиозине скелетных мышц, связанная с дистальным артрогрипозом, приводят к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и увеличению относительного количества головок миозина, способных к сильному связыванию с актином, при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ, что может быть причиной гиперсократимости мышечной ткани при этих мутациях.

4. Замена Glu41Lys в  $\beta$ -тропомиозине скелетных мышц, ассоциированная с немалиновой миопатией, приводит к смещению тропомиозина к периферии тонкой нити на всех стадиях цикла гидролиза АТФ и к уменьшению и увеличению относительного количества миозиновых мостиков, сильно связанных с актином, при моделировании, соответственно, сильных и слабых форм связывания актина и миозина, что может объяснить ослабление сократительной функции мышечной ткани при этой мутации.

5. Мутация Glu139del, связанная с «кэп»-миопатией, приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и уменьшению относительного количества миозиновых мостиков, сильно связанных с



актином, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ, что может вызывать ослабление сократительной функции мышечной ткани при этой мутации.

6. Замена Gly126Arg в  $\alpha$ -тропомиозине скелетных и  $\beta$ -тропомиозине гладких мышц, приводящая к стабилизации структуры центральной области тропомиозинового тяжа, вызывает смещение тропомиозина к периферии актиновой нити, увеличение жесткости С- и N-концевых участков тропомиозина и включение большего количества мономеров актина при моделировании почти всех стадий АТФазного цикла, что свидетельствует об увеличении кооперативности актиновой нити.

**Научная новизна.** Для  $\alpha$ -тропомиозина сердечных мышц человека впервые показано, а для  $\beta$ -тропомиозина скелетных и гладких мышц человека подтверждено, что в АТФазном цикле каждому положению тропомиозина на поверхности актиновой нити соответствует определенное структурное состояние актомиозиновой системы, характеризующееся подвижностью и позицией моторного домена миозина, актинового мономера и его субдомена 1. Впервые показано, что точечные мутации тропомиозина, связанные с миопатиями человека, приводят к тому, что движения тропомиозина становятся аномальными и изменяется характер конформационных изменений миозина и актина в цикле гидролиза АТФ. Обнаружено, что мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном  $\alpha$ -тропомиозине, ассоциированные с гипертрофической кардиомиопатией, и мутация Arg91Gly в  $\beta$ -тропомиозине скелетных мышц, связанная с дистальным артрогрипозом, приводят к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и активируют образование сильной формы связывания головки миозина с

Ф-актином при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ, что может вызывать гиперсократимость мышечного волокна. Установлено, что замена Glu139del, связанная с «кэп»-миопатией,

приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и уменьшению относительного количества миозиновых мостиков, сильно связанных с актином, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ. Показано, что мутация Glu41Lys в  $\beta$ -тропомиозине скелетных мышц, ассоциированная с немалиновой миопатией, фиксирует тропомиозин в положении ближе к периферии актиновой нити на всех стадиях цикла гидролиза АТФ. Такое расположение тропомиозина вызывает ингибирование образования сильной формы связывания головки миозина с актином на финальных стадиях цикла гидролиза АТФ, но активизирует формирование этой формы связывания актомиозина при расслаблении мышечного волокна. Эти нарушения в работе актомиозина могут быть причиной ослабления сократительной функции мышечного волокна. Обнаружено, что замена Gly126Arg в  $\alpha$ -тропомиозине скелетных и  $\beta$ -тропомиозине гладких мышц, приводящая к стабилизации центральной области молекулы, вызывает смещение тропомиозина к периферии нити в большинстве стадий АТФазного цикла и существенно увеличивает кооперативность включения мономеров актина.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные данные расширяют и углубляют представления о молекулярных механизмах регуляции клеточной подвижности и могут быть использованы при чтении курсов лекций по цитологии, клеточной биологии, биофизике, биохимии и физиологии. Новые данные о влиянии точечных мутаций в тропомиозине на его регуляторную функцию существенны для понимания того, какие нарушения характера конформационных перестроек сократительных белков могут лежать в основе таких тяжелых болезней человека, как гипертрофическая кардиомиопатия, дистальный артрогрипоз, немалиновая миопатия и «кэп»-миопатия. Кроме того, полученные результаты могут

способствовать разработке тестов для диагностики заболеваний мышц человека. Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов кафедры биофизики и биохимии СПбГУ.

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные процедуры работы, за исключением получения рекомбинантных форм тропомиозина, проведены автором лично. Поляризационно-флуориметрические эксперименты на мутантной форме тропомиозина Arg91Gly выполнены совместно с А.О. Симоняном. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались с научным руководителем и соавторами, и статьи были подготовлены к публикации при активном участии диссертанта.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены на 37-й Европейской мышечной конференции в 2008 г. (Оксфорд, Великобритания), 39-й Европейской мышечной конференции в 2010 г. (Падуа, Италия), 40-й Европейской мышечной конференции в 2011 г. (Берлин, Германия), 41-й Европейской мышечной конференции в 2012 г. (Родос, Греция), 38-м Международном конгрессе Федерации Европейских биохимических Обществ в 2013 г. (Санкт-Петербург, Россия), 42-й Европейской мышечной конференции в 2013 г. (Амстердам, Нидерланды), Международном симпозиуме “Биологическая подвижность” в 2014 г. (Пущино, Россия), 43-й Европейской мышечной конференции в 2014 г. (Зальцбург, Австрия), 44-й Европейской мышечной конференции в 2015 г. (Варшава, Польша) и на научных семинарах лаборатории Молекулярных основ клеточной подвижности ИНЦ РАН.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ.

## **Глава 1. Обзор литературы**

В основе современных представлений о механизмах мышечного сокращения лежит фундаментальное открытие, сделанное Х. Хаксли и Хэнсеном [Huxley, Hanson, 1954] и - независимо от них – А. Хаксли и Найдегерком [Huxley, Niedegerke, 1954] в 1954 году. С помощью интерференционной микроскопии было установлено, что сокращение мышцы является результатом продольного движения (скольжения) нитей актина и миозина друг относительно друга. Ранее было показано, что гидролиз АТФ головками миозина происходит в процессе их циклического взаимодействия с нитями актина [Engelhardt, Ljubimova, 1939; Straub, 1942]. Регуляция этого взаимодействия осуществляется регуляторными белками: тропомиозином и тропонином. Сигналом для начала сокращения служит повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки [Gordon et al., 2000]

### **1.1. Структура и функция актина**

Актин является одним из самых распространённых белков эукариот. В мышечных клетках он составляет 20% всего клеточного белка, и от 1% до 5% в остальных клетках. Актин способен взаимодействовать с большим количеством других белков, которые образуют целую группу актин-связывающих белков (АВР), и благодаря этому выполняет широкий спектр функций. Этот белок участвует в процессах мышечного сокращения, клеточной подвижности, деления клеток, движения органелл и везикулярного транспорта, клеточного сигналинга, обеспечения межклеточных контактов и поддержания формы клеток. У позвоночных обнаружено три основные изоформы актина:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ .  $\alpha$ -актин является основной составляющей сократительного аппарата мышечной клетки.  $\beta$ - и  $\gamma$ -изоформы актина существуют в большинстве клеток как компоненты цитоскелета и внутриклеточного транспорта.

Актин был впервые обнаружен в 1887 году Хэллибёртоном, который экстрагировал его из мышцы и назвал «миозиновый фермент» [Halliburton, 1887]. В то время не существовало еще методов выделения и анализа чистых белков, и полученный Хэллибёртоном белок на самом деле являлся смесью нескольких мышечных белков. В 1942 году Штрауб, проводивший исследования в лаборатории Сент-Дьёрды в

Институте медицинской химии Университета Сегеда (Венгрия), разработал оригинальную методику экстракции чистого актина, которая позволила ему выделить существенное его количество [Szent-Gyorgyi, 1945]. Эта методика применяется для получения актина и сейчас. Свое название новый белок получил в связи с тем, что обладал способностью активировать гидролиз АТФ миозином. Добавление АТФ к смеси актомиозина приводило к уменьшению вязкости раствора [Szent-Gyorgyi, 1945]. Штрауб продолжил исследование актина и в 1950 году показал, что актин содержит в своем составе связанный АТФ и в результате полимеризации (поликонденсации) нуклеотид гидролизует до АДФ и неорганического фосфата, которые остаются связанными с актиновым филаментом. Он предположил, что трансформация АТФ-связанного актина в АДФ-связанный актин играет важную роль в мышечном сокращении.

Известно, что мономерный актин является глобулярным белком и обнаружен почти во всех эукариотических клетках. Его молекулярная масса составляет примерно 42 кДа. Актин обладает одной из наиболее консервативных среди белков аминокислотной последовательностью. У разных видов организмов, от водорослей до человека, она отличается не более чем на 20%. Поэтому считается, что структура актина оптимальна.

Эльзинга и соавторы в 1973 году впервые определили полную пептидную последовательность, которая была уточнена в более поздних работах [Elzinga et al., 1973]. Актин скелетных мышц человека содержит 375 аминокислотных остатков. Его N-концевая область более кислая и начинается с ацетиласпартата. В то же время, его C-концевая область – щелочная и формируется фенилаланином, предшествующем цистеину, который имеет функциональную значимость. Оба конца молекулы расположены в непосредственной близости друг от друга в пределах одного субдомена 1 [Collins, Elzinga, 1975].

Рентгеноструктурный анализ актина был проведен в 1990 году В. Кабшем и соавторами [Kabsch et al., 1990]. Структурная модель актина, полученная Кабшем, является широко используемой моделью этого белка. Кристаллизованный актин имеет размеры 67 x 40 x 37 Å, молекулярную массу 41785 Да и изоэлектрическую точку 4,8. Согласно этой модели, актиновый мономер состоит из двух долей, разделённых щелью – больших и малых доменов. Таким образом, образуется

«АТФазная складка», которая является центром гидролиза АТФ. Молекула АТФ необходима для поддержания структурной целостности актина [Gunning, 2015].

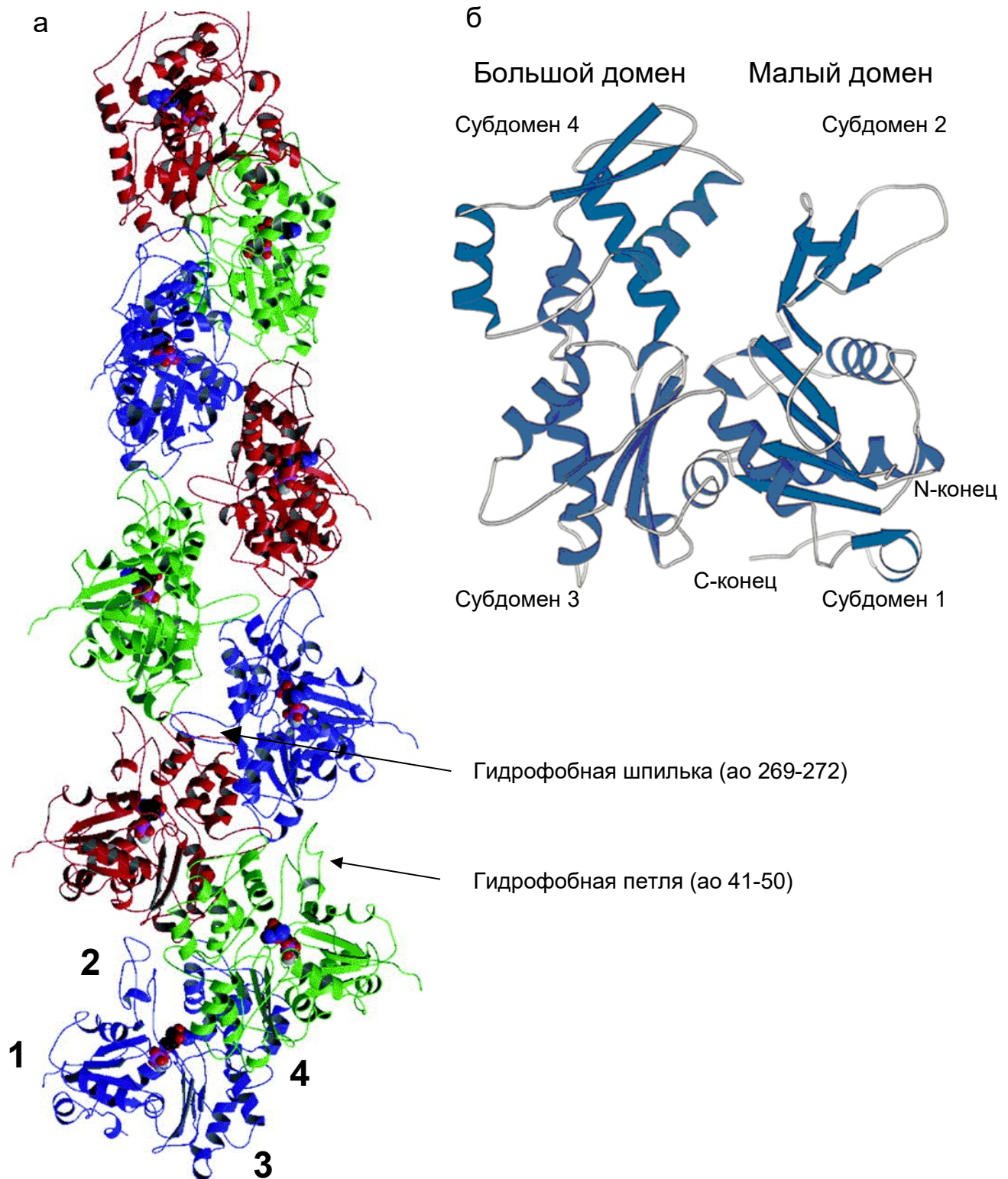
В классическом изображении актина большой домен располагается слева, а малый – справа. Малый домен делится на два субдомена: субдомен 1 (остатки 1-32, 70-144, 338-374) и субдомен 2 (остатки 33-69). Большой домен также делится на два субдомена: субдомен 3 (остатки 145-180 и 270-337) и субдомен 4 (остатки 181-269). [Cristóbal et al., 2008]. Наиболее значимыми участками вторичной структуры являются пять цепей  $\beta$ -складчатости, которая состоит из  $\beta$ -изгиба и участка  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ . Этот участок присутствует в обоих доменах.

Сайт связывания АТФ расположен между двумя  $\beta$ -шпильками, относящихся к первому и третьему субдоменам (остатки Asp11-Lys18 и Asp154-His161). Сайт связывания двухвалентных ионов расположен ниже сайта связывания АТФ и *in vivo* чаще всего связывает  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ . Ион кальция связан с шестью молекулами воды, которые удерживаются аминокислотными остатками актина Asp11, Asp154, и Gln137. Они формируют комплекс с нуклеотидом, который ограничивает движение так называемой «шарнирной» области, расположенной между 137 и 144 остатками, что поддерживает белок в нативном состоянии до его денатурации. Этот участок может иметь открытую или закрытую конформацию актиновой «щели» [Otterbein et al., 2001; Cristóbal et al., 2008]. Также актин имеет, по крайней мере, три других центра с промежуточным сродством для двухвалентных катионов и ещё три других с низким сродством. Предполагается, что эти центры могут играть определённую роль в полимеризации актина [Cristóbal et al., 2008]. В субдомene 2 актина есть структура, называемая «D-петля», связывающаяся с ДНКазой I и находящаяся между His40 и Gly48 остатками [Otterbein et al., 2001; Rould et al., 2006]

В результате поликонденсации глобулярный актин (G-актин) способен образовывать тонкие нити (F-актин), которые формируют сократительный аппарат мышечных клеток и являются одним из трёх основных компонентов цитоскелета. Модель F-актина была предложена в 1990 году Холмсом на основании данных изучения сокристаллизации актина с различными белками [Holmes et al., 1990]. Группа Савая, получив в 2008 году кристаллы актиновых димеров, предложила более точную модель структуры актиновых нитей [Sawaya et al., 2008].

Применение криоэлектронной микроскопии и метода синхротронного излучения позволили повысить разрешение и улучшить понимание природы актин-актиновых взаимодействий и тех конформационных изменений, которые лежат в основе формирования актиновых нитей [Narita et al., 2006; Oda et al., 2009].

F-актин можно представить в виде двух правозакрученных спиралей, обвивающих друг друга, диаметром 7 нм (рис. 1, а). Две параллельные F-актиновые нити поворачиваются на 166 градусов друг относительно друга. Длина спирального повтора составляет примерно 37 нм. Каждая молекула актина в F-форме имеет в своем составе преимущественно АДФ и катион  $Mg^{2+}$  [Graceffa, Dominguez, 2003; Reisler, 1993]. Мономеры актина ориентированы определенным образом, что придает асимметричность тонкому филаменту. В F-актине различают “положительный” и “отрицательный” концы, характеризующиеся, соответственно, высокой и низкой скоростью присоединения мономера актина. В саркомере положительный конец F-актина располагается в непосредственной близости от Z-линии.



**Рисунок 1.** Ленточная модель строения F-актина (а) и G-актина (б), основанная на данных электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа [Holmes et al., 1990; Kabsch et al., 1990].  $\alpha$ -спирали показаны спиралями;  $\beta$ -складчатости обозначены стрелками.



Актин считается относительно пассивным элементом сократительного аппарата. Однако существуют данные, указывающие на активную роль конформационных перестроек F-актина в развитии силы [Yanagida, Oosawa, 1978; Borovikov et al., 1982; Borovikov, Levitsky, 1985; Levitsky et al., 1990]. Актин-связывающие белки и гидролиз АТФ в активном центре миозина [Strzelecka-Golaszewska et al., 1993] способны значительно изменять структурное состояние актина [Borovikov, 1999]. Головка миозина, связываясь с актином, вызывает существенные изменения гибкости актиновой нити [Oosawa et al., 1983] и движение малого домена актина [Popp et al., 1991]. В состоянии, существенном для развития силы, тонкая нить становится гибкой, что делает маловероятным предположение о роли тонкой нити только как опоры для работы миозиновой головки [Borovikov, 1999]. Благодаря наклону мономеров актиновая нить может “дышать”, то есть принимать различные структурные состояния и приспосабливаться к взаимодействию с другими белками [Egelman et al., 1982]. Структурные изменения F-актина носят ярко выраженный кооперативный характер [Orlova, Egelman, 1997]. Обнаружено, что в передаче кооперативных изменений вдоль тонкой нити принимает участие субдомен 2 актинового мономера [Moraczewska et al., 2004].

В аллостерической системе регуляции тонкой нити конформационным изменениям актина отводится ключевая роль. Однако структурные состояния актина на разных стадиях цикла гидролиза АТФ актомиозином не охарактеризованы, а роль изменений конформации актина в мышечном сокращении остается до сих пор мало изученной.

## **1.2. Структура и функция миозина**

Миозиновые нити представляют собой пучки из сотен молекул миозина, расположенных параллельно и биполярно. В филаментном состоянии миозин поддерживают специальные минорные белки.

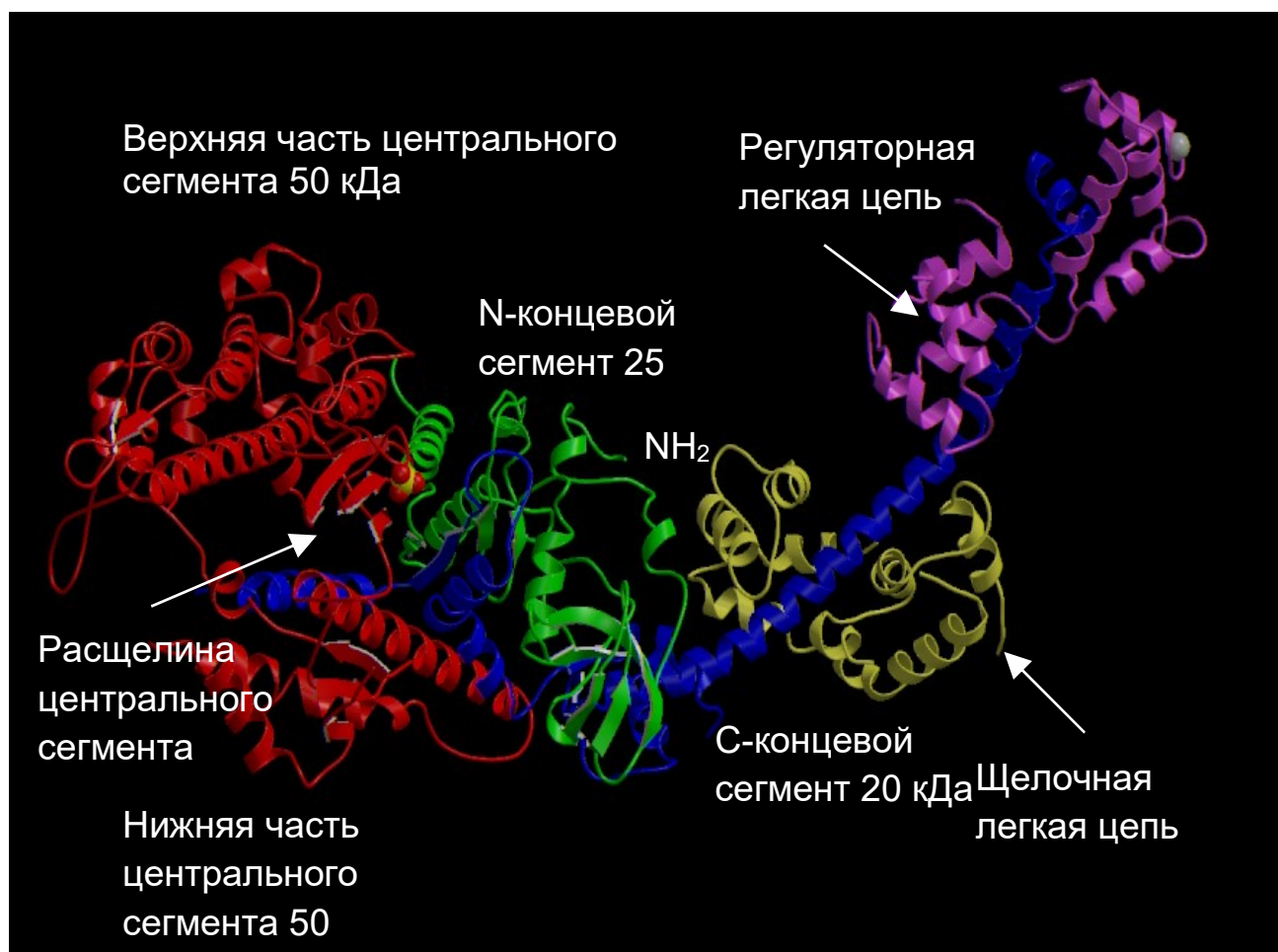
Мономерный миозин состоит из двух закрученных в длинную асимметричную суперспираль “тяжелых” полипептидных цепей, которые образуют на N-конце две глобулярные головки (некоторые изоформы миозина имеют только одну головку) [Lowey et al., 1969]. В области перехода фибриллярной части каждой тяжелой цепи в глобулярную часть (“шейки”) располагаются две “легкие” цепи – щелочная и

регуляторная, играющие структурную и регуляторную роль. Субъединицы миозина удерживаются между собой за счет нековалентных взаимодействий.

Фибриллярная часть миозина является прямой и жесткой вследствие высокого содержания  $\alpha$ -спиралей и может изгибаться только в одном участке, где частично нарушена спиральная структура. В области шейки расположен второй “шарнирный” участок, который обеспечивает высокую подвижность головок миозина. При протеолизе этого участка молекула миозина расщепляется на три фрагмента: стержневую часть и две головки, называемые субфрагментом-1 миозина (S1) [Mueller, Perry, 1962]. Фрагмент между двумя шарнирными участками называется субфрагментом-2 миозина. При расщеплении шарнирного участка в стержневой части миозина образуется тяжелый меромиозин, несущий обе головки, и легкий меромиозин. Тяжелые цепи S1, в свою очередь, распадаются на три фрагмента: N-концевой 25 кДа, центральный 50 кДа и C-концевой 20 кДа [Tong, Elzinga, 1990].

Основной функцией миозина является способность гидролизовать молекулу АТФ [Энгельгардт, Любимова, 1939]. Связывание с актином способствует увеличению активности АТФазы миозина. АТФазный центр, а также области связывания миозина с актином расположены в глобулярной головке белка. Фибриллярная часть миозина ответственна за образование упорядоченных биполярных филаментов [Lowey et al., 1969].

Субфрагмент-1, полученный протеолитическим расщеплением миозина  $\alpha$ -химотрипсином, сохраняет все свойства головки миозина, и потому может быть использован в модельных экспериментах. Например, S1, закрепленный на подложке, эффективно перемещает актиновые нити в искусственной системе биологической подвижности (*in vitro motility assay*) [Toyoshima et al., 1987]. Структура S1 была определена с разрешением 0,3 нм с помощью рентгеноструктурного анализа (рис. 2) [Rayment et al., 1993]. Было показано, что субфрагмент-1 состоит из моторного (каталитического) и регуляторного доменов. Легкие цепи входят в состав регуляторного домена. АТФазный центр и области, вовлеченные во взаимодействие с актином, находятся в моторном домене, но пространственно отдалены друг от друга – на 40-50 нм.



**Рисунок 2.** Ленточная модель строения субфрагмента-1 миозина из скелетных мышц курицы, созданная на основании данных рентгеноструктурного анализа [Rayment et al., 1993].

Актин-связывающие участки формируются в основном двумя областями 50 кДа фрагмента, которые рассечены глубокой щелью. Размер этой щели может изменяться в зависимости от связанного нуклеотида. АТФазный центр состоит из определенных участков 25 и 50 кДа фрагментов, включающих три петлевые структуры: P-loop, switch-I и switch-II. P-loop принадлежит 25 кДа фрагменту и служит для связывания фосфатных групп нуклеотида. Солевой мостик между switch-I и switch-II необходим для гидролиза АТФ. Биохимические исследования миозина из гладких мышц показали, что switch-I способна модулировать АТФазную активность, скорость освобождения молекулы аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) из активного центра и скорость передвижения миозина вдоль актиновой нити. Некоторые остатки этой петлевой структуры способны к электростатическому взаимодействию с

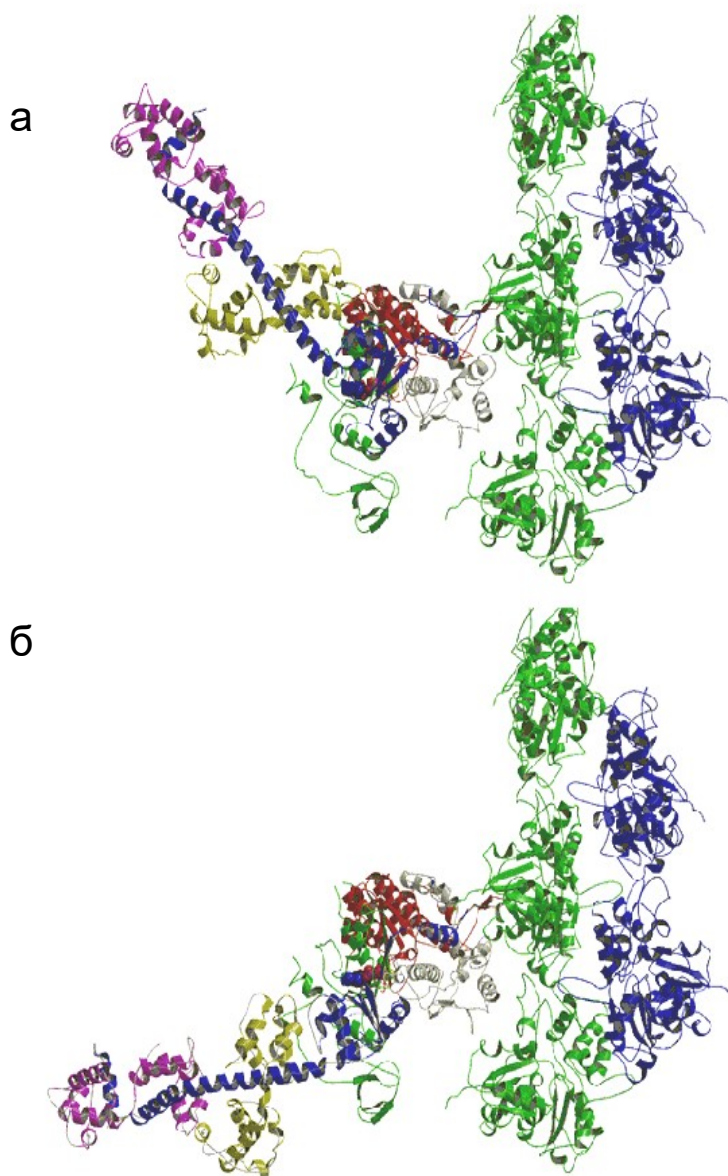
одной из легких цепей при образовании слабой формы связывания гладкомышечного миозина с актином.

Под центром связывания нуклеотида располагается структура спираль-поворот-спираль, принадлежащая 20 кДа фрагменту. Этот крайне консервативный участок на противоположных концах содержит два цистеиновых остатка с наиболее реактивными сульфгидрильными группами миозина SH1 (Cys707) и SH2 (Cys697). При окислении или при связывании бифункциональных реагентов длиной от 0,3 до 1,4 нм группы SH1 и SH2 могут взаимодействовать друг с другом [Wells, Yount, 1979]. Анализ строения S1 показал, что связывание нуклеотида в активном центре должно вызывать конформационные перестройки в области локализации этих остатков [Rayment et al., 1993a]. Действительно, с помощью спектроскопических проб было установлено, что спираль, содержащая Cys707 (SH1 спираль), испытывает значительные вращательные движения при растяжении мышечного волокна, которые коррелируют с развитием напряжения [Burghardt et al., 1997]. Подвижность SH1 спирали может играть важную роль для корректной функции миозина [Nitao et al., 2002]. Ковалентная сшивка SH1 и SH2 или точечная мутация в позициях 707 или 697 приводит к ингибированию АТФазы миозина [Root, Reisler, 1992]. Рядом с SH1 спиралью расположен небольшой компактный «конвертерный» домен (около 60 аминокислотных остатков), который может играть важную роль в передаче сигнала от активного центра в моторном домене на регуляторный домен миозина [Geeves et al., 2005].

Очевидно, что головка миозиновой молекулы (поперечный мостик), играет активную роль в скольжении тонких и толстых нитей друг относительно друга. Химическая энергия гидролиза АТФ превращается в механическую работу поперечного мостика в результате сложного механохимического сопряжения. Лимн и Тэйлор [Lymn, Taylor, 1971] предложили схему циклической работы поперечного мостика, согласно которой в отсутствие нуклеотида миозин жестко связан с актином, формируя «сильную» форму связывания. Присоединение АТФ к миозину вызывает диссоциацию актин-миозинового комплекса. Для образования стабильного состояния (М-АДФ-Р<sub>i</sub>, где М – миозин, Р<sub>i</sub> – неорганический фосфат) миозин гидролизует АТФ и формирует с актином «слабую» форму связывания. Последующая изомеризация актин-миозинового комплекса в сильную форму связывания способствует освобождению

продукта гидролиза, в результате чего образуется исходный комплекс. При слабой форме связывания головка миозина обладает низким сродством к актину, высокой кинетикой присоединения/отсоединения и не способна кооперативно включать регулируемые тонкие нити [Chalovich et al., 1981; Frisbie et al., 1998]. В этом состоянии миозиновая головка быстро присоединяется к актину и отсоединяется от него. Слабая форма связывания миозина с актином возникает вследствие присоединения АТФ к миозину. Напротив, сильная форма характеризуется высоким сродством к актину, низкой кинетикой присоединения/отсоединения миозина к актину и способностью к кооперативному включению регулируемых тонких нитей [Bremel, Weber, 1972; Marston, 1982]. Сильную форму связывания формирует миозин, не содержащий нуклеотида или содержащий АДФ. Считается, что генерация силы происходит при переходе из слабого к сильному связыванию поперечных миозиновых мостиков с актиновой нитью [Roopnarine et al., 1998].

Кристаллографические исследования субфрагмента-1 показали, что регуляторный домен, представляющий собой  $\alpha$ -спиральную структуру, способен значительно изменять свою ориентацию относительно моторного домена в цикле гидролиза АТФ [см. обзор: Holmes, 1995]. На основании этого наблюдения появилась популярная в настоящее время модель «рычага» («lever arm»), согласно которой небольшие структурные изменения в активном центре моторного домена передаются на регуляторный домен и усиливаются подобно механизму рычага (рис. 3). В результате головка миозина перемещается на расстояние около 5 нм, что соответствует расстоянию между субъединицами актина [Cooke, 1997]. Предполагается, что SH1 спираль непосредственно участвует в передаче сигнала с активного центра на регуляторный домен [Rayment et al., 1993a; Holmes, Geeves, 2000], однако механизмы этой передачи остаются не исследованными.



**Рисунок 3.** Модель взаимодействия головки миозина с актином, основанная на данных электронной микроскопии [Holmes et al., 2004]. Показано положение регуляторного домена миозина в состоянии перед генерацией усилия (а) и после генерации усилия (б).

Согласно модели рычага, моторный домен миозина остается жестко связанным с актином и практически не изменяет свою ориентацию в процессе мышечного сокращения. Однако нет уверенности в том, что структурные изменения, наблюдаемые на кристаллах белка, действительно происходят в процессе мышечного

сокращения. Также эта модель предполагает, что шаг поперечного мостика прямо пропорционален длине регуляторного домена. Вместе с тем было показано, что скорость перемещения головки миозина по актиновой нити не всегда зависит от длины регуляторного домена миозина [Trybus et al., 1999], и при гидролизе одной молекулы АТФ возможно несколько механических перемещений поперечного мостика [Sakamoto et al., 2000]. Кроме того, существуют данные о том, что удаление регуляторного домена в миозине не оказывает влияния на перемещение головки миозина по актину [Tanaka et al., 1999].

Возможно, что развитие силы актомиозиновой системой сопровождается не статичным изменением ориентации некоторых структур поперечного миозинового мостика, а переходом от неупорядоченного состояния миозиновых головок к упорядоченному (disorder-to-order) [Berger, Thomas, 1994]. Также было предположено, что головка миозина может «шагать» по актину в результате броуновского движения от одной субъединицы к другой [Yanagida et al., 2000]. Выяснение истинного механизма работы поперечного миозинового мостика требует дальнейших исследований.

### 1.3. Структура и функция тропомиозина

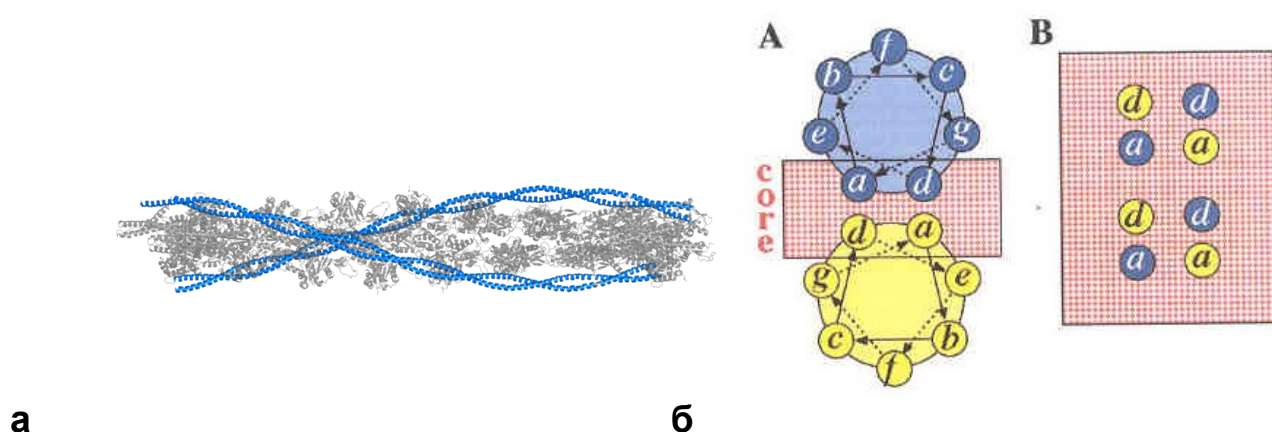
В 1946 году английский биохимик К. Бэйли при обработке миофибрилл органическим растворителем изолировал новый белок, который назвал тропомиозином (ТМ), благодаря некоторому сходству в аминокислотной последовательности и физических свойствах с миозином [Bailey, 1948]. Была отмечена асимметричность белка, высокая вязкость раствора белка при низкой ионной силе и выдвинута гипотеза о димерной структуре тропомиозина. В начале 60-х годов появилось предположение о важной роли тропомиозина в  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции мышечного сокращения. Был изолирован «нативный» тропомиозин, обладающий чувствительностью к  $\text{Ca}^{2+}$  [Ebashi, 1963]. Позже выяснилось, что это свойство белка обусловлено другим компонентом сократительной системы – тропонином (ТН) [Ebashi et al., 1968].

Тропомиозин встречается практически во всех клетках эукариот. Его взаимодействие с F-актином играет важную роль в полимеризации и стабилизации актиновой нити [Gordon, 2000] и в регуляции мышечного сокращения [см. обзор: Perry, 2001]. Тропомиозин является одним из

основных регуляторов реорганизации актиновых нитей в разнообразных сигнальных процессах, требующих изменения клеточной формы [Payne, Rudnick, 1984].

Тропомиозин – биспиральный белок длиной 40 нм. Полимеризуясь конец к концу, он формирует непрерывную суперспиральную прядь, которая симметрично связывается вдоль спиральных цепей актина (рис. 1а). Угол между спиралями равен  $\sim 20^\circ$ , шаг спирали – 1,4 нм. Молекулярный вес каждой цепи-субъединицы составляет от 19 до 40 кДа в зависимости от изоформы белка. Наиболее распространенные изоформы тропомиозина содержат 284 и 248 аминокислотных остатков и называются соответственно длинной (высокомолекулярной) и короткой (низкомолекулярной) изоформами. Различие в длине является следствием наличия двух альтернативных промоторов транскрипции генов – внешнего 1 (для тропомиозина с высокой молекулярной массой) и внутреннего 1' (для тропомиозина с низкой молекулярной массой) [Gunning et al., 2005]. Сократительная система мышечных клеток содержит в основном длинные изоформы тропомиозина. Сам тропомиозин представляет собой модульный белок, состоящий из семи tandemных квази-повторяющихся единиц (псевдоповторов), предназначенных для связывания с семью последовательными мономерами актина длиной  $\sim 55$  Å каждый вдоль тонкой нити. Азимутальное расположение тропомиозина на поверхности актиновой нити определяет доступность и, следовательно, возможность и активность взаимодействия актина с многочисленными актин-связывающими белками.





**Рисунок 4.** а. Расположение тропомиозина на актиновой нити. Димеры тропомиозина полимеризуются конец к концу, образуя вытянутый тяж.  
 б. Схема, объясняющая образование суперспиральной структуры белка [Jeong et al., 2004]. Аминокислотные остатки в позициях а и d образуют гидрофобный центр (core). Суперспираль стабилизируется ионными связями между аминокислотными остатками в позициях е и g.

Суперспиральные белки уникальны: многие свойства их третичной структуры можно вывести напрямую из данных о первичной последовательности. Английский биолог Фрэнсис Крик для описания закручивания двух  $\alpha$ -спиралей друг относительно друга фибриллярных белков группы *k-m-e-f* (кератин-миозин-эпидермис-фибриноген) ввёл термин «суперспираль» («coiled coil») (одновременно с появлением другой модели двойной спирали – ДНК) [Crick, 1953]. На примере тропомиозина было введено фундаментальное понятие гидрофобных взаимодействий «холмы во впадины» («knobs-into-holes»). Эти взаимодействия характерны для упаковки неполярных групп аминокислотных остатков двух  $\alpha$ -спиралей в суперспирали, например, валина, лейцина и изолейцина, которые называются «каноническими» остатками суперспиральной структуры. Крик предположил, что неполярные (гидрофобные) и полярные остатки каждой  $\alpha$ -спирали чередуются, причем неполярные аминокислоты, располагаясь внутри молекулы, повторяются приблизительно каждые 3,5 остатка. Не оставил без внимания автор и роль суперспирали в белок-белковых взаимодействиях. Впоследствии многие предположения Крика, сделанные в этой работе, подтвердились.

Известно, что образованию суперспирали тропомиозина способствует наличие на протяжении всей длины белка

«гептоповторов» полярных и неполярных аминокислот *a-b-c-d-e-f-g*, которые гомологичны по своему составу (рис. 4, б). Такие повторы, способствующие упаковке молекулы в виде суперспирали, обнаружены в парамиозине, фибриллярной части миозина и других белках. Неполярные аминокислотные остатки располагаются в основном в позициях *a* и *d* внутри спирали, тогда как в позициях *e* и *g* – заряженные остатки, кислые и основные, соответственно. За счёт этого в соседних полипептидных цепях между аминокислотными радикалами в позициях *a* и *d* образуются гидрофобные связи «knobs-into-holes», при этом каждый гидрофобный остаток находится во впадине, образованной тремя другими радикалами. Гидрофобные взаимодействия стабилизируются ионными связями (солевыми мостиками), которые образуются между заряженными аминокислотными остатками, расположенными в позициях *e* и *g* противоположных цепей, а также электростатическими взаимодействиями внутри одной цепи [Kohn et al., 1997]. Помимо этих связей при наличии цистеинового остатка в позиции 190 в обеих субъединицах между цепями возможно образование ковалентной дисульфидной сшивки, что наблюдается в  $\alpha$ -тропомиозине.

При низкой ионной силе димеры тропомиозина полимеризуются, образуя вытянутый тяж. 11 аминокислотных остатков С- и N-концов двух димеров соединяются друг с другом ионными и гидрофобными связями между соответствующими субъединицами [Greenfield et al., 2006]. Аминокислотная последовательность концевых областей тропомиозиновой молекулы существенна для полимеризации тропомиозина. Так, 8 из 9 первых аминокислотных остатков идентичны у всех мышечных изоформ тропомиозина от дрозофилы до человека, а 18 из 20 первых остатков консервативны среди всех мышечных тропомиозинов позвоночных. Показано, что модификация N-конца тропомиозина сильно влияет на сродство белка к актину и миозин-зависимую кооперативную активацию актин-тропомиозиновой нити [Maytum et al., 2000]. Кристаллические структуры высокого разрешения концевых участков тропомиозина свидетельствуют о том, что в С-конце тропомиозина из поперечно-полосатых мышц происходит расхождение  $\alpha$ -спиралей, что может являться участком узнавания для тропонина [Li, 2002].

В тонких филаментах мышц предполагается существование трёх разных положений тропомиозина. При низких концентрациях кальция,

тропонин удерживает тропомиозин в блокирующей позиции. При увеличении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  тропонин позволяет тропомиозину азимутально двигаться на 25 градусов, чтобы перейти в закрытую позицию, которая позволяет образовать исходное связывание (слабое) миозина с актином. Связывание миозина вызывает дальнейший сдвиг ещё на 10 градусов в открытую позицию [McKillop and Geeves, 1993; Vibert et al., 1997].

#### **1.4. Области взаимодействия актина, миозина и тропомиозина**

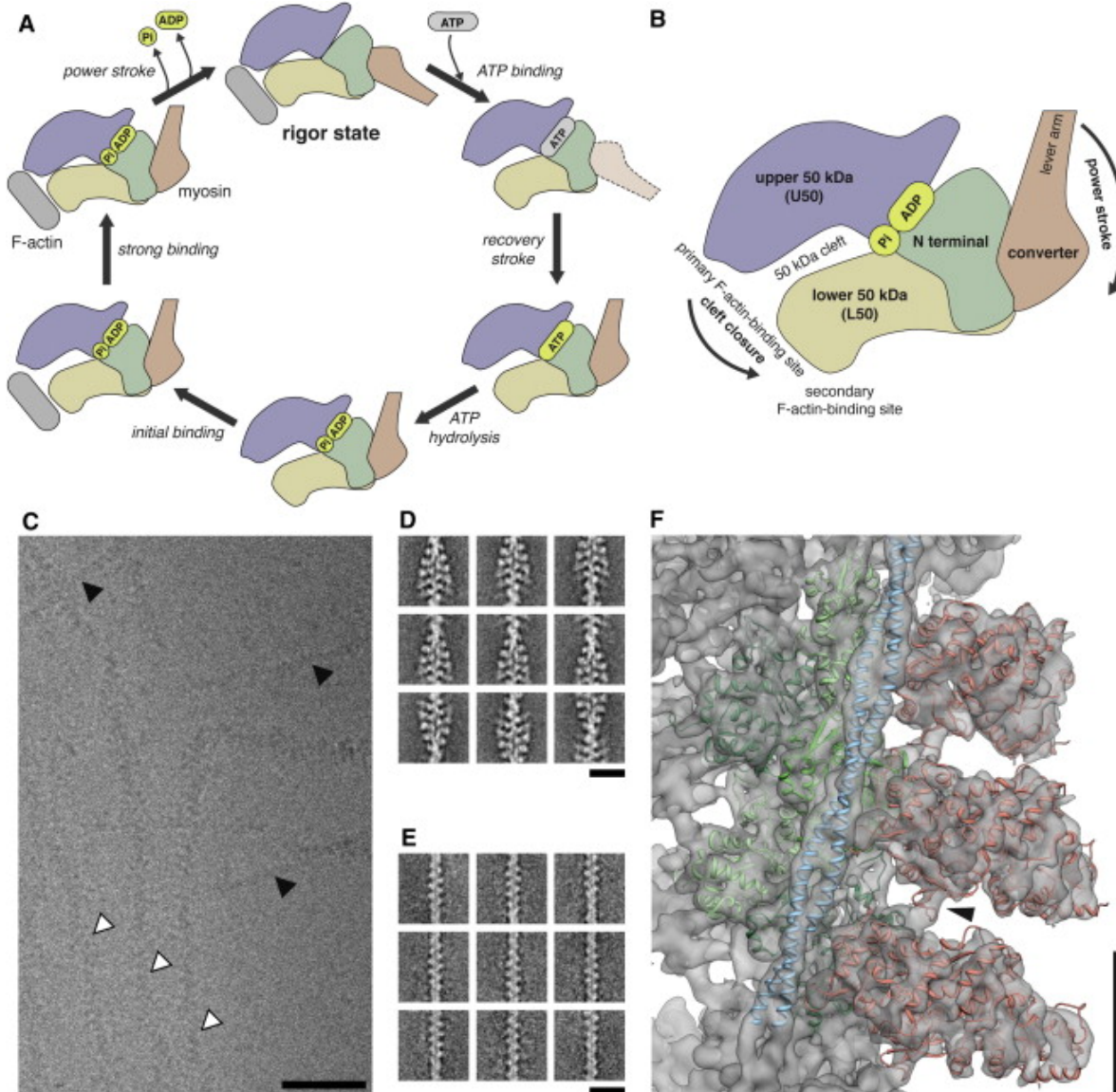
На данный момент существует две основные гипотезы, объясняющие механизмы взаимодействия тропомиозина с актином. Согласно первой, процесс взаимодействия тропомиозина с актином сводится к образованию специфических контактов между этими белками. Этому способствует локальная нестабильность актин-связывающих сайтов тропомиозина. Вторая гипотеза основывается на комплементарности поверхностных форм актина и тропомиозина, при этом взаимодействия между ними являются неспецифическими, а конформационная подвижность ТМ не играет большой роли для взаимодействия с актином. Экспериментальные данные, подтверждающие обе гипотезы. Так в 2011 г. была опубликована работа, в которой с помощью молекулярного моделирования была определена равновесная позиция тропомиозина на поверхности актина и те аминокислотные остатки, которые с наибольшей вероятностью участвуют во взаимодействии актина с тропомиозином [Li et al., 2011]. Результаты этой работы показывают, что энергетический ландшафт различных позиций тропомиозинового тяжа на поверхности актиновой нити является относительно ровным, то есть вероятность расположения тропомиозина на актине в той или иной позиции практически одинакова.

Остановимся подробно на основных гипотезах взаимодействия актина с тропомиозином. Известно, что одна молекула тропомиозина связывается с семью мономерами актина. Это свидетельствует о существовании как минимум семи актин-связывающих участков в молекуле тропомиозина. В аминокислотной последовательности молекулы тропомиозина существуют равноудалённые области кислых аминокислотных остатков, которые находятся в положениях b, c и f гептадных повторов, на поверхности суперспирали тропомиозина.

На атомной модели было показано, что миозин взаимодействует с двумя соседними молекулами актина. Область взаимодействия актина и

миозина включает в себя несколько петлевых структур и представляет собой большую поверхность межбелкового контакта в  $1820 \text{ \AA}^2$ . Петля 2 и спираль HW, петля 4 и CM петля головки миозина образуют большие контакты с субдоменами 1 и 3 (SD1 и SD3) соседних актиновых мономеров. Петля 3 связывается с SD1 мономера актина, расположенного ниже. Кроме того, участок спираль-петля-спираль нижнего 50 кДа субдомена миозина располагается в полости, образованной SD1 и SD3 верхнего и SD2 нижнего (актин-2) мономеров актина, тем самым взаимодействуя с двумя соседними мономерами.

В результате изучения гидрофобных поверхностных потенциалов белков стало очевидным, что обе эти структуры – и мотив миозина спираль-петля-спираль, и актиновая полость – преимущественно гидрофобны (рис. 5B). Кроме того, два кластера гидрофобных аминокислотных остатков на CM петле взаимодействуют с гидрофобной областью актина, содержащей остатки 29-31, 329-334. Кроме того, было показано, что эти гидрофобные участки существенны для образования сильной формы связывания актомиозина [Sasaki et al., 1999]. Интересно отметить, что мутации гидрофобных аминокислот в этих областях  $\alpha$ -актина и сердечного  $\beta$ -миозина приводят к нарушению сократительной функции мышц (рис 5E).



**Рисунок 5.** АТФазный цикл актомиозина и криоЭМ F-актина и комплекса F-актина, тропомиозина и моторного домена миозина [Behrmann et al., 2012].

A. Схема АТФазного цикла

B. Схематичное изображение головки миозина

C. Показан участок необработанного изображения, записанного при дефокусировке в 1 мкм. Видно присутствие обоих типов филаментов (декорированные филаменты обозначены белыми стрелками, а недекорированные – чёрными). Нити кажутся декорированными, или недекорированными по всей длине. Масштаб 50 нм.

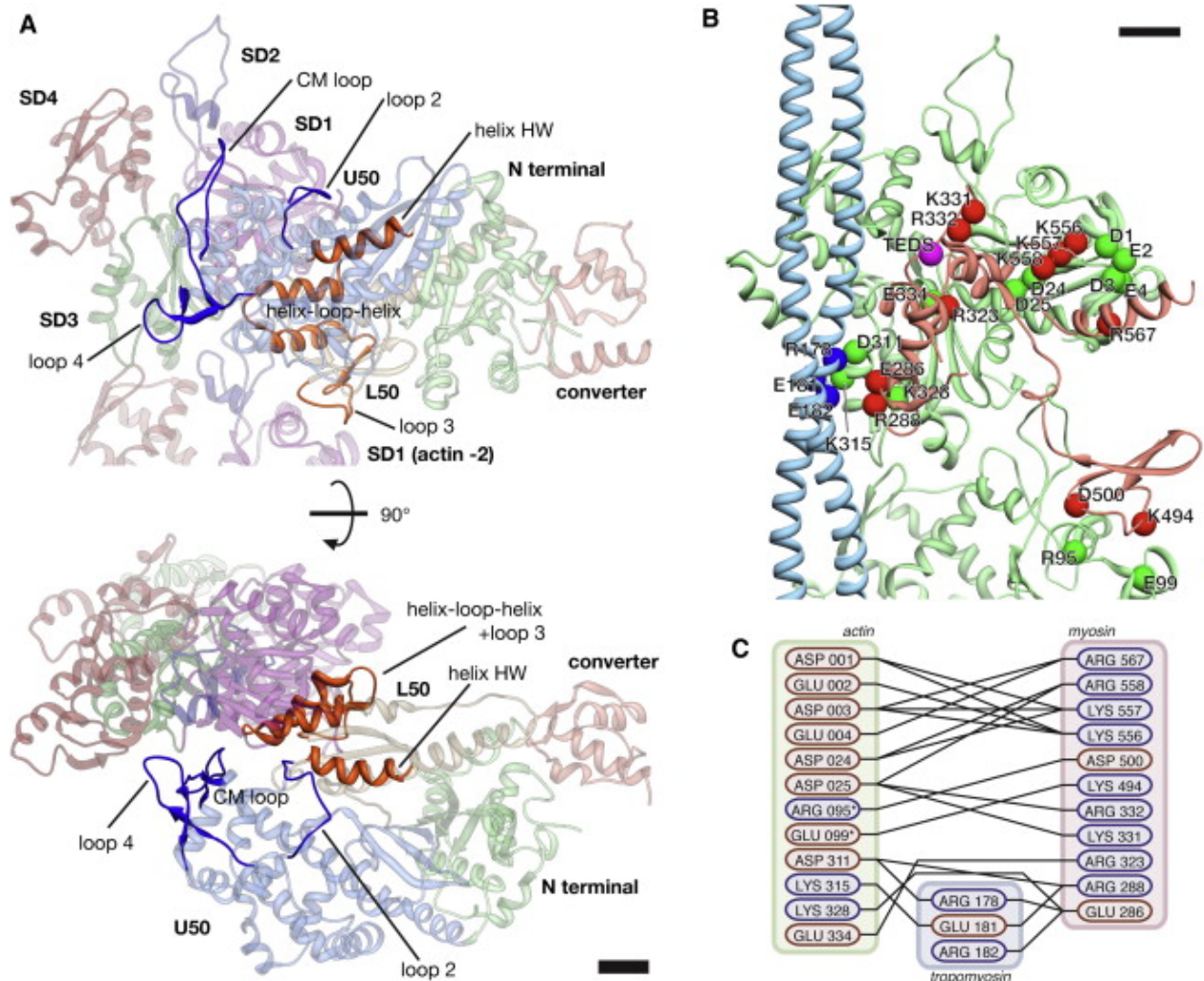
D. Представлены репрезентативные усреднённые изображения декорированных филаментов (35374 сегмента). Не было выявлено никаких частично декорированных филаментов. Масштаб 20 нм.

E. Продемонстрированы усреднённые изображения недекорированных филаментов (4629 сегментов). Также не выявлено никаких недекорированных филаментов. Масштаб 20 нм.

F. Показано совмещение псевдоатомной модели и изображений электронной плотности АТМ комплекса. S1, актин и тропомиозин обозначены розовым, светло-зелёным и голубым цветами, соответственно. Стрелкой показано место контакта между S1 и актином-2. Масштаб 5 нм.

Контакты между другими областями актин-миозинового интерфейса в основном опосредованы электростатическими взаимодействиями и, возможно, связаны с формированием солевых мостиков (рис. 6B). Солевые мостики, по-видимому, способствуют образованию двойного «сэндвича», состоящего из N-конца актина с большим отрицательным зарядом (остатки D1, E2, D3, E4), положительно заряженной области петли 2 S1 и спирали HW (остатки K556, K557, R558, R567) отрицательно заряженной петли SD1 актина (остатки 20-28 [D24, D25]), и положительно заряженных остатков CM петли S1 (остатки R323, K331, R 332) (рис 6C, 6D). Остаток аргинина в положении 332 в данной модели соответствует остатку сердечного  $\beta$ -миозина человека R403, мутация в котором на глутамин связана с тяжёлыми формами наследственных кардиомиопатий (рис. 3E) [Sparrow et al., 2003]. Два консервативных остатка лизина в C-конце петли 2 миозина (K652/K653 в гладкомышечном миозине II и K556/K557 в данной модели) необходимы для запуска активации актина. Суммарный заряд и плотность заряда петли 2 миозина значительно влияют на сродство миозина к актину и на активность актин-активируемой АТФазы [Furch et al., 1998; Joel et al., 2001].



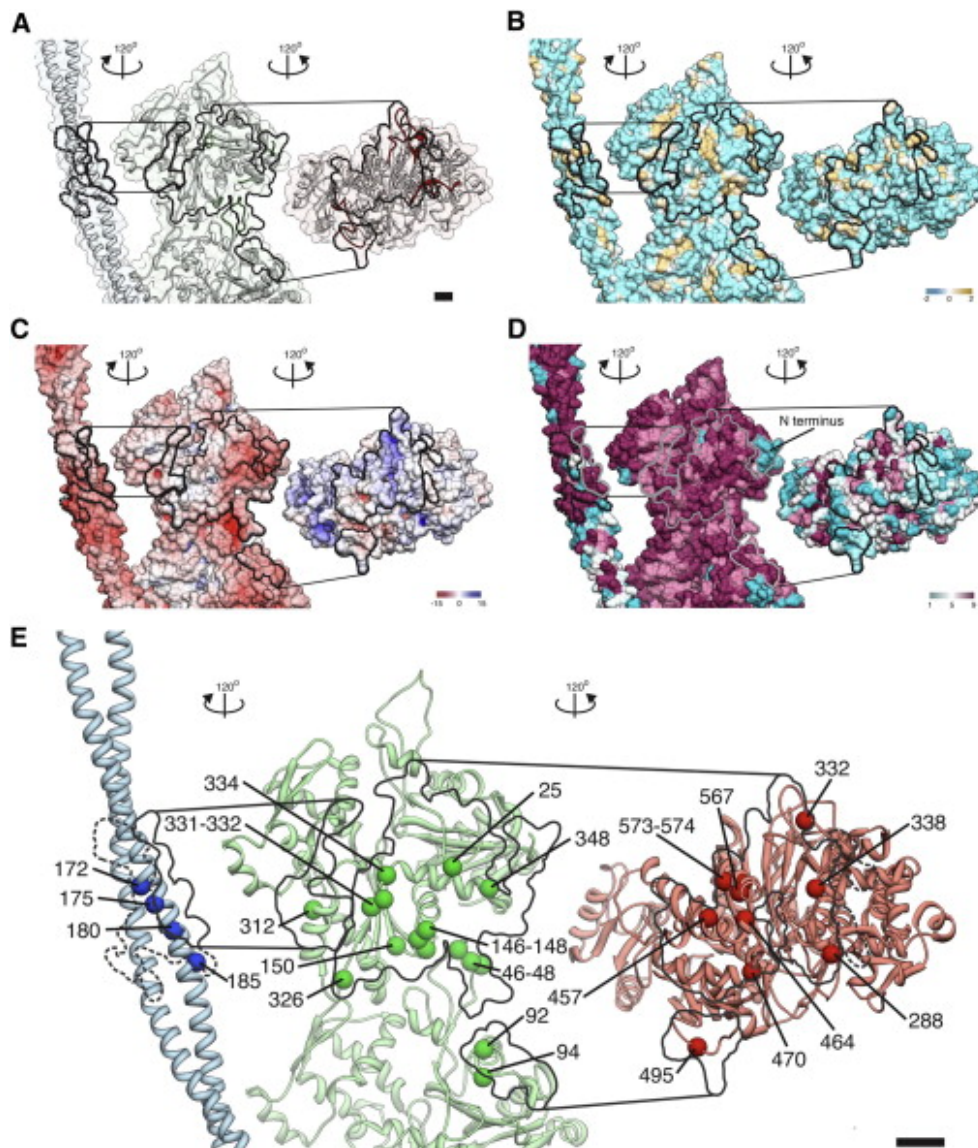


**Рисунок 6.** Область связывания миозина, тропомиозина и актина с потенциальными ключевыми электростатическими взаимодействиями между белками [Behrmann et al., 2012].

- A. Область связывания миозина и актина. Вид сбоку и сверху. Участки миозина, вовлечённые во взаимодействие с актином выделены и обозначены: петля 2 (loop 2; 547-561), спираль HW (helix HW; 563-577), петля 3 (loop 3; 482-502), петля 4 (loop 4; 278-298), CM петля (CM loop; 322-342), участок спираль-петля-спираль L50 субдомена (helix-loop-helix; 445-481).
- B. Атомная модель интерфейса. Площадь интерфейса взаимодействия между мономером актина-0 и миозина составляет 1450 Å<sup>2</sup>, между мономером актина-2 и миозинном – 370 Å<sup>2</sup>, между мономером актина-0 и тропомиозином – 210 Å<sup>2</sup> и между миозином и тропомиозином – 300 Å<sup>2</sup>.
- C. Схема взаимодействия в интерфейсе.

Петля 2 миозина находится не только в центре описанного двойного «сэндвича», но также в центре актин-миозинового интерфейса. Хорошо известно, что отрицательный заряд N-концевой области актина критически важен для АТФ-зависимого актин-миозинового взаимодействия [Miller et al., 1996], особенно при образовании слабых форм связывания [Hansen et al., 2000]. Примечательно, что N-концевая

часть является одной из немногих областей актина, не отличающихся высокой консервативностью (рис. 7C и 7D).



**Рисунок. 7.** Области взаимодействия между F-актином, миозином и тропомиозином и аминокислотные остатки, ответственные за миопатии при мутациях в этих белках [Behrman et al., 2012].

Тропомиозин поворачивается на  $120^\circ$  по часовой стрелке и сдвигается влево, в то время, как миозин поворачивается  $120^\circ$  против часовой стрелки и сдвигается вправо. Интерфейсы взаимодействия обозначены линиями на поверхностях.

- А. Выделены важные петли актина и миозина.
- В. Показана степень гидрофобности поверхности. Гидрофобные области обозначены оранжевым.
- С. Показаны поверхностные заряды. Положительно заряженные аминокислотные остатки окрашены синим цветом, а отрицательно заряженные – красным.
- Д. Показаны консервативные аминокислотные остатки (окрашены розовым).
- Е. Атомная модель интерфейса связывания с обозначенными мутациями, которые связаны с заболеваниями мышечной ткани.



Интересно понять роль консервативного TEDS сайта (S334, в данной структуре заменён на E334, чтобы имитировать фосфосерин), который расположен в СМ петле. Как следует из этой модели, боковая цепь остатка E334 миозина не ориентирована к актину, но стабилизирует СМ петлю через взаимодействие с соседним остатком K332. Этот тип взаимодействия был обнаружен при сравнении кристаллической структуры нефосфорилированного моторного домена миозина, где СМ петля нарушена, со структурами других миозинов, содержащих остаток глутамата или аспартата в этом положении [Kollmar et al., 2002].

Было показано, что остатки D460, E461 и A462 в области спираль-петля-спираль важны для актомиозинового взаимодействия [Furch et al., 2000; Giese, Spudich, 1997]. Хотя эти консервативные остатки, согласно модели, входят в состав актомиозиновой области взаимодействия, не обнаружено очевидных комплементарных зарядов на поверхности актина. Поэтому более вероятно, что отрицательные заряды в этой области миозина важны для стабилизации щели 2 миозина (остаток R567) электростатическими взаимодействиями. Это также может объяснить влияние мутаций в миозине, связанных с изменением поверхностного заряда, на сродство миозина к актину [Furch et al., 2000].

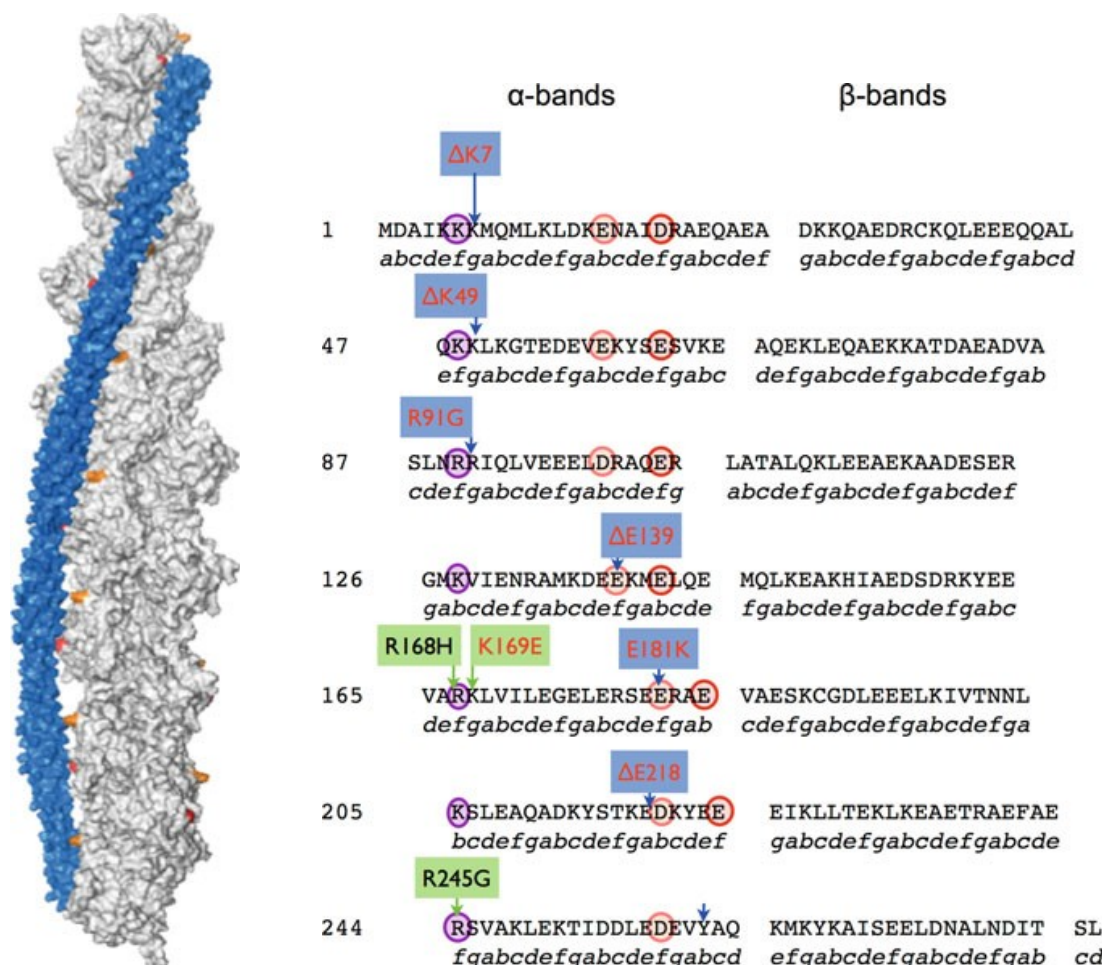
В более ранних исследованиях была предположена дополнительная стабилизация актомиозинового комплекса за счёт взаимодействия петли 3 миозина с SD2 актина-2 [Milligran, 1996; Rayment et al., 1993; Schröder et al., 1993]. Крио-ЭМ структура подтверждает, что этот контакт существует (рис. 5F). Основываясь на этой модели, можно показать, как солевые мостики способствуют формированию этого взаимодействия (рис. 6B и 6C). Биохимические эксперименты показывают, что петля трех опосредованных контактов не является общим признаком для всех изоформ миозина [Van Dijk et al., 1999]. Их присутствие в комплексе, образованном моторным доменом миозина и F-актином, вместе с другими факторами, таким, как, отсутствие SH3-подобного N-концевого домена, может способствовать поддержанию хорошо упорядоченной и прямой структуры филаментов, используемых в исследованиях.

Значительно меньше информации имеется о взаимодействии тропомиозина с актином и миозином. Так по данным электронной микроскопии, тяжи тропомиозина оборачиваются вокруг актиновых

нитей, причем тропомиозин прекрасно вписывается в паз между актином и миозином. Такая комплементарность формы, называемая гештальт-связыванием, была предложена Холмсом и Леманом как необходимое условие для специфического взаимодействия актина и тропомиозина [Holmes and Lehman, 2008]. Кроме того, актомиозиновый комплекс стабилизируется электростатическими взаимодействиями между миозином и тропомиозином [Behrmann et al., 2012].

Петля 4 миозина действует как центральный линкер, который может взаимодействовать сразу, и с актином, и с тропомиозином через солевой мостик (рис. 6В, С). Постулируется существование, по крайней мере, 16 солевых мостиков между миозином и ТМ [Behrmann et al., 2012]. По данным электронной микроскопии и компьютерного моделирования предположено существование 30 потенциальных солевых мостиков между актином и ТМ в тонких филаментах без тропонина [Lehman et al., 2013]. При этом предполагается всего 11 мостиков в присутствии миозина.

Как отмечалось выше, тропомиозин содержит семь псевдоповторов, каждый из которых связывается с одним из семи последовательно расположенных актиновых мономеров. Псевдоповтор состоит из 40 аминокислотных остатков. Первые 20 остатков принадлежат так называемой  $\alpha$ -зоне, а остальные -  $\beta$ -зоне. Эти зоны могут участвовать попеременно в специфическом взаимодействии с семью мономерами актина в различных конформационных состояниях тонкого филамента [McLachlan, Stewart, 1976]. Считается, что  $\alpha$ -зоны вовлечены во взаимодействие с актином тогда, когда тяж ТМ располагается в закрытой позиции [Barua et al., 2013]. По данным Ли и соавторов [Li et al., 2011], в выключенном состоянии p.Asp25 актина взаимодействует со всеми семью актин связывающими повторами тропомиозина, а конкретно с остатками K6, K48, R90, K128, R167, K205 и R244 (рис. 8А).



**Рисунок 8.** Структура связывания ТМ с актином по данным Ли и соавторов [Li et al., 2011]. Слева: Остатки Asp25 актина показаны красными точками, а Lys326 – оранжевыми. Справа: Последовательность  $\beta$ -ТМ с семью псевдоповторами и  $\alpha$ - и  $\beta$ -зонами, определёнными МакЛаханом и Стьюартом (1976) [McLachlan, Stewart, 1976]. Фиолетовыми кругами обозначены остатки тропомиозина, взаимодействующие с Asp25 актина, оранжевыми – с R147, K326 и K328 актина.

Другая область связывания ТМ с актином в закрытой позиции включает Lys326, Lys328 и Arg147 актина, которые связываются с пятью псевдоповторами ТМ со второго по шестой (рис. 8А) [Li et al., 2011]. Эти остатки актина, возможно, взаимодействуют с E139, E181 и E218 остатками тропомиозина [Martilla, 2014]. Поэтому эти пять гептоповторов определяют сродство ТМ с актином. Считается, что  $\beta$ -зоны псевдоповторов 3-6 играют важную роль в активации тонкого филамента миозином [Barua et al., 2012] и в переходе тропомиозина из закрытой в открытую позицию.

### **1.5. Мутации тропомиозина, связанные с наследственными заболеваниями мышечной ткани человека**

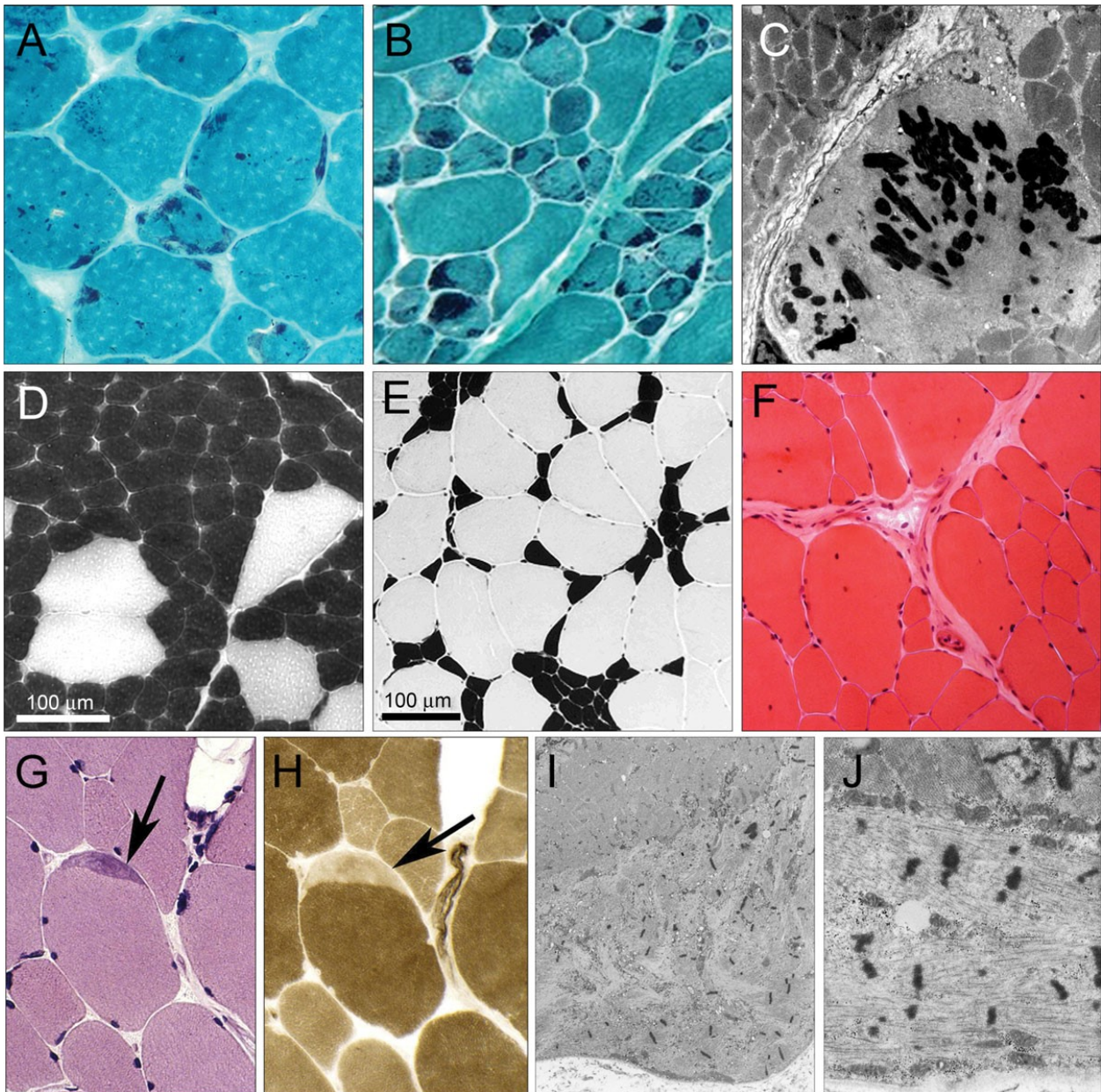
Мутации выявлены во всех генах мышечного тропомиозина. Мутации в гене TPM1, кодирующем  $\alpha$ -изоформу тропомиозина, обнаружены у больных дилатационной (ДКМ) и гипертрофической (ГКМ) кардиомиопатиями. Оказалось, что оба заболевания развиваются вследствие определенных первичных изменений сократительной функции кардиомиоцитов, при этом гипертрофическая кардиомиопатия характеризуется повышенной сократимостью, а дилатационная кардиомиопатия, наоборот, пониженной сократительной функцией [Robinson et al., 2007]. Предположено, что молекулярный механизм этих заболеваний, лежащий в основе таких противоположных эффектов, состоит в нарушении регуляции ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , возникающем вследствие мутаций.

Известны две мутации в гене сердечного тропомиозина (TPM1), связанные с ДКМ: Glu40Lys и Glu54Lys [Olson et al., 2001]. В обоих случаях происходит замена отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты на положительно заряженный остаток лизина (рис. 5). Такая мутация вызывает локальное изменение поверхностного заряда белка [Olson et al., 2001], что может приводить к изменению характера взаимодействия тропомиозина с актином. Кроме того, остатки глутаминовой кислоты 40 и 54 занимают позицию е в гептоповторе тропомиозина, и, как считается, формируют ионные связи (солевые мостики) с остатками, расположенными в позиции g другой субъединицы белка. Разрушение этих солевых мостиков вследствие изменения заряда аминокислотного остатка может дестабилизировать суперспираль тропомиозина. В результате этих изменений может снизиться чувствительность тонкой нити к  $\text{Ca}^{2+}$ , что и наблюдали в растворе мышечных белков и на мышечных волокнах [Mirza et al., 2005; Mirza et al., 2007]. У мыши с искусственно внедренной в ген TPM1 мутацией Glu54Lys также наблюдали снижение чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  сердечных волокон, и уменьшение напряжения, развиваемого миоцитами [Rajan et al., 2007]. Авторы предположили, что мутация способна уменьшать гибкость молекулы, что может влиять на присоединение тропомиозина к актину и на  $\text{Ca}^{2+}$  чувствительность сократительной системы.

Мутации в генах тропомиозина TPM2 и TPM3, кодирующих скелетно-мышечную изоформу белка, могут приводить к немалиновой миопатии, кэп-миопатии, болезни центрального стержня, миопатии с диспропорцией типов мышечных волокон (CFTD), дистальному артрогрипозу и синдрому Эскобара. Большинство из них – гетерозиготные мутации, связанные с аутосомно-доминантными заболеваниями. У пациентов с мутациями в TPM2, как правило, симптомы проявляются мягче, чем у пациентов с мутациями в TPM3. Дистальный артрогрипоз встречается только у пациентов с мутациями в TPM2. Исследования показали, что пять мутаций в TPM2 и одна мутация в TPM3 приводят к гиперсократимости мышечной ткани, которая характеризуется повышенной чувствительностью мышечных волокон к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ . У пациентов с таким фенотипом часто развиваются контрактуры суставов конечностей и челюсти, в отличие от пациентов, у которых мышечные волокна не проявляют повышенной  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности. В последнем случае чаще встречаются осевые контрактуры. Предполагается, что большинство мутаций влияет на взаимодействие тропомиозина с актином или на связывание концов соседних молекул тропомиозина при их полимеризации.

Врожденные миопатии разнородны по клиническим, гистологическим и генетическим признакам [Wallgren-Pettersson et al., 2011]. Большинство миопатий проявляются в перинатальный период или в младенчестве, меньшее количество – в детстве, с задержкой моторных этапов, и лишь немногие – в зрелом возрасте. Диагноз ставится на основании статической или медленно прогрессирующей слабости мышц и ряда структурных аномалий в мышечных волокнах. Так, например, при обнаружении в мышечных волокнах немалиновых тел (рис. 9) и наличия мышечной слабости различной степени определяется немалиновая миопатия. Впервые немалиновая миопатия была описана двумя научно-исследовательскими группами независимо друг от друга в 1963 году [Conen et al., 1963; Shy et al., 1963]. Эта миопатия является генетически гетерогенным заболеванием, демонстрирующим широкую клиническую изменчивость [Wallgren-Pettersson et al., 2004].





**Рисунок. 9** Гистологическая характеристика НМ (А-С), CFTD (D-F) и кэп-миопатии (G-J). Показаны нарушения в скелетных мышцах, которые могут возникать при мутациях в тропомиозине [Martilla, 2014].

А. Мутация p.K7del в TPM2, наблюдаются неупорядоченные немалиновые тела.

В. Мутация M9R в TPM3, наблюдаются немалиновые тела в волокнах медленного типа, которые обычно гипотрофированы.

С. Электронно-микроскопическая фотография немалиновых тел.

Д, Е. Показаны различия в размерах медленных (окрашены в темный цвет) и быстрых (окрашены в светлый цвет) мышечных волокон. Можно заметить, что медленные волокна преобладают, хотя и существует некоторый разброс.

Д. Мутация L100M в TPM3.

G-J. Мутация Glu139del в TPM2. Шапочкообразные структуры.

I, J. Электронно-микроскопические фотографии типичных шапочкообразных структур.

При нахождении шапочкообразных, или кэп-структур (рис. 9) под сарколеммой мышечных волокон диагностируется кэп-миопатия. Это заболевание было впервые описано в одной из работ 1981 года [Fidzianska et al., 1981]. Немалиновая и кэп-миопатии клинически и гистологически перекрываются друг с другом, хотя для каждого вида миопатии характерна слабость определенных групп мышц. Описаны случаи, когда одна и та же мутация была обнаружена при обоих заболеваниях (мутация Glu41Lys, обнаруженная у матери и ее дочери, [Tajsharghi et al., 2007]). Немалиновые тела и кэп-структуры похожи по своему составу и часто возникают трудности при их диагностике в биопсии мышечной ткани [Brandis et al., 2008].

Показано, что кэп-структуры могут состоять из небулина, актина, тропомиозина, десмина, миотилина, тропонина Т, SERCA2 [Lehtokari et al., 2007]. В состав немалиновых тел также входят актин, тропомиозин, десмин, миотилин [Schröder et al., 2003] и, в отличие от кэп-структур, большое количество  $\alpha$ -актинина. Считается, что немалиновые тела образуются вследствие нарушения регуляции тонкого филамента, поскольку могут появляться в мышечной ткани намного позднее, чем проявляется мышечная слабость и гипотония. Немалиновые тела встречаются в норме у людей пожилого возраста. С другой стороны, немалиновые тела и кэп-структуры могут влиять на функцию мышечных клеток, а мутантные белки могут играть роль белков-ядов. Механизмы образования этих структурных нарушений в клетке остаются неизвестными.

При наследственных миопатиях часто наблюдается увеличение размера мышечных волокон медленного типа (рис. 9). Если при биопсии не выявлено ультраструктурных нарушений в виде немалиновых тел или кэп-структур, такому пациенту часто ставится диагноз врожденной диспропорции типов мышечных волокон (CFTD). Первые случаи этой миопатии были описаны Бруком в 1973 году.

Существует группа преимущественно врожденных системных заболеваний мышечной ткани, которые не всегда относят к врожденным миопатиям. Это артрогрипозы, характеризующиеся мышечными контрактурами, деформацией конечностей, недоразвитием суставов и мышц, фиброзом. Заболевание является медленно прогрессирующим. При дистальном артрогрипозе (ДА) повреждаются дистальные отделы конечностей. В 1974 году были описаны три пациента с дистальным

артрогрипозом типа 1А [Daentl et al., 1974]. Другая форма ДА типа 2В была впервые выявлена Краковяком и соавторами в 1997 году [Krakowiak et al., 1997].

Дистальный артрогрипоз наблюдался только среди пациентов с мутациями в гене TPM2. Это может быть связано с тем, что ТМ2 начинает экспрессироваться в процессе развития раньше, чем ТМ3 [Muthuchamy et al., 1993].

Еще один вид миопатии – синдром Эскобара, который является нелетальным типом такого заболевания, как крыловидный синдром. Он был впервые охарактеризован Норумом и соавт. в 1969 году [Norum et al., 1969] и связан в одном из случаев с немалиновой миопатией [Monnier et al., 2009]. Если немалиновая миопатия, кэп-миопатия и CFTD обладают часто перекрывающимися клиническими признаками, то ДА и синдром Эскобара являются заболеваниями с меньшим перекрытием клинических проявлений с другими нарушениями, входящих в эту группу заболеваний.

Кэп-структуры и немалиновые тела чаще встречались при биопсии в пожилом возрасте (в трех семьях). Это подтверждает предположение, что саркомерные белковые включения накапливаются в процессе заболевания. Большинство биопсий в случаях с CFTD были взяты в раннем возрасте. Возможно, что диагноз этих пациентов может измениться. Такие ситуации встречались, в ряде случаев с кэп-миопатией: в биопсии, взятой в возрасте 11 лет, наблюдалась только диспропорция типов мышечных волокон, в то время как при более поздней биопсии в возрасте 33 лет, были обнаружены кэп-структуры [Lehtokari et al., 2007]. Широкая вариативность признаков немалиновой и кэп-миопатий в семьях и даже у отдельных пациентов с течением времени [Lehtokari et al., 2007; Tajsharghi et al., 2007] позволяют создать концепцию, согласно которой кэп-миопатия является подкатегорией немалиновой миопатии.

Таким образом, не обнаружено никакой чёткой корреляции между типами мутации и клиническим фенотипом. Подобный вывод был сделан в недавнем обзоре [Tajsharghi et al., 2012].

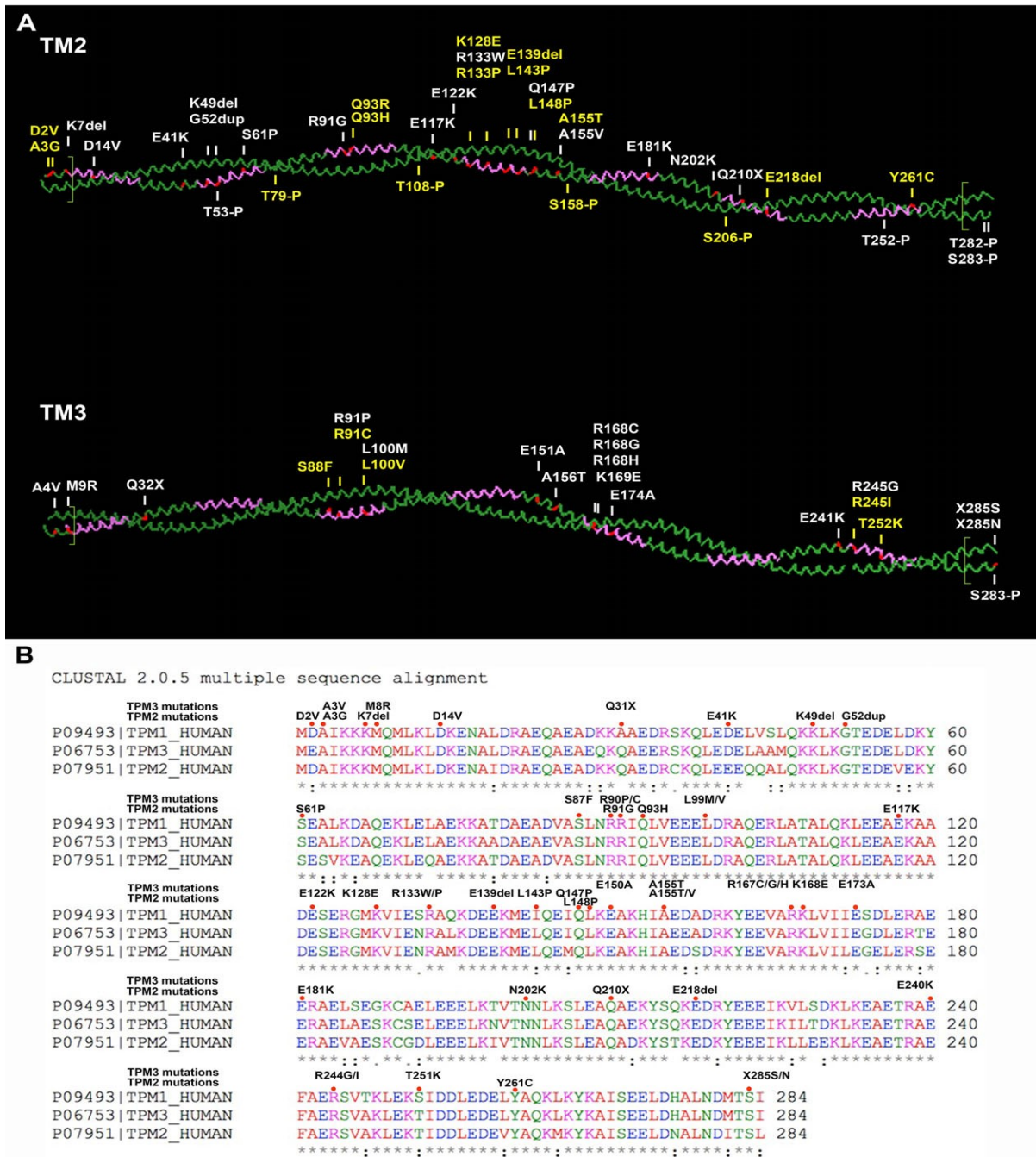
В последние годы была предпринята попытка выявить механизмы появления гипер- и гипосократимости мышечных волокон, вызванной мутациями в тропомиозине. Так в работе Ли с соавторами было показано, что в "выключенном" состоянии Asp25 актина



взаимодействует со всеми семью актин-связывающими повторами тропомиозина [Li et al., 2011]. Мемо и Марстон предположили, что с этим аминокислотным остатком могут взаимодействовать области тропомиозина, включающие остатки K6-K7, K48-K49, R90-R91 и R167-K168. Другим тропомиозин-связывающим сайтом на актине считается Lys326. Этот сайт, возможно, связывается с остатками глутаминовой кислоты в положениях 139, 181 и 218 аминокислотной последовательности тропомиозина. Интересно отметить, что мутации, повышающие сократимость, расположены рядом с актин-связывающими сайтами TM: Lys7del, Lys49del и Arg91Gly в TPM2 и Lys169Glu в TPM3 [Memo, Marston, 2013].

Во «включенном» состоянии тропомиозин сдвигается относительно актина, и образуются миозиновые мостики с актином [Behrmann et al., 2012]. Во «включенном» состоянии контакты тропомиозина с актином определены менее четко, и тропомиозин может просто быть вытолкнут со своей позиции образованием сильной формой связывания миозина с актином. В целом, число связанных с заболеваниями мутаций, примыкающих к предполагаемым контактам тропомиозина с актином во «включенном» состоянии, меньше: это мутации в TPM2 Asp14Val, Glu139del, Glu218del и в TPM3 - мутация Leu100Met/Val (рис. 10,11).

**Рисунок 10.** Контакты тропомиозина с актином во «включенном» состоянии и мутации ТМ. В TPM2 ( $\beta$ -TM) и в TPM3 ( $\gamma$ -TM) последовательность делится на семь псевдоповторов и  $\alpha$ - и  $\beta$ -зоны [McLachlan, Stewart, 1976]. Фиолетовыми кругами выделены остатки, взаимодействующие с остатком актина Asp25; оранжевыми кругами выделены остатки, взаимодействующие с остатками актина R147, K326, K328, как это определено Ли и соавт. [Li et al., 2011]. Мутации TPM2 указаны синим цветом; мутации TPM3 указаны зеленым. Мутации, увеличивающие  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность, показаны красным цветом, а снижающие - черным.



**Рисунок 11.** Сравнение последовательностей TPM1, TPM2 и TPM3 человека. Обозначены мутации, связанные с развитием наследственных миопатий человека и сайты фосфорилирования [Martilla, 2014].

А. Схематическое представление димеров TPM2 и TPM3 с мутациями, связанными с мышечными заболеваниями (обозначены красными точками). Фиолетовым обозначены  $\alpha$ -зоны. Зелёные линии, пересекающие молекулы ТМ на концах, обозначают зоны перекрывания. Сайты фосфорилирования подписаны под молекулами.

В. Последовательность TPM1, TPM2 и TPM3. Мутации на последовательности обозначены красными точками. Для последовательности TPM3 номенклатура отличается от таковой на других рисунках. Звёздочками под последовательностями обозначены консервативные аминокислотные остатки, а чёрными точками показаны сайты, где последовательность расходитсся.

Было предположено, что изменение заряда, присущее большинству гиперсократительных мутаций, дестабилизирует "выключенное" состояние и способствует смещению равновесия в сторону "включенного" состояния, этим, по-видимому, обусловлена более высокая  $\text{Ca}^{2+}$  чувствительность [Orzechowski et al., 2013]. Такое смещение равновесия, по-видимому, происходит в случае с мутациями в TPM2 p.Lys7del, p.Lys49del, p.Arg91Gly, p.Glu139del и p.Glu181Lys, и с мутацией в TPM3 p.Lys169Glu; и коррелируют с гиперсократительным фенотипом или фенотипом, который наблюдается при мутациях p.Lys7del, p.Arg91Gly, p.Arg133Trp и p.Glu181Lys при ДА.

Мутации же, связанные с врождённой мышечной слабостью, смещают равновесие в противоположную сторону – от "включенного" к "выключенному", что может приводить к потере регуляторной функции. Мутации, демонстрирующие снижение  $\text{Ca}^{2+}$  чувствительности: TPM2-Glu41Lys, TPM2-Glu117Lys, TPM3-Arg168His и TPM3-Arg245Gly.

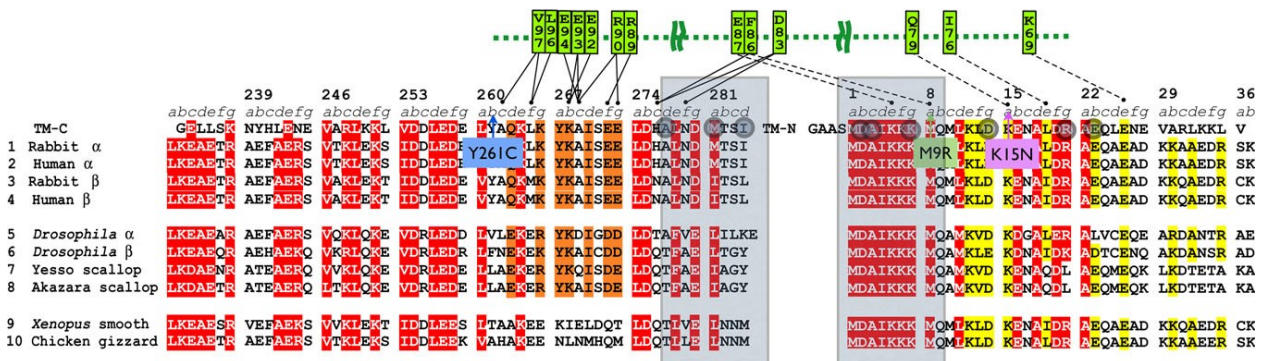
18 из изученных 30 мутаций в TPM2 и 14 из 20 в TPM3 находятся в  $\alpha$ -зонах, которые содержат остатки, взаимодействующие с актином в "выключенном" состоянии. Кроме того, три (p.Asp2Val, p.Ala3Gly, и p.Lys7del) мутации в TPM2 и четыре (p.Ala4Val, p.Met8Arg, p.Stop285Ser и p.Stop285Asn) мутации в TPM3 расположены в области перекрытия тропомиозина (рис. 12). Эти области имеют важное значение для таких функций тропомиозина как связывание с актином и полимеризация.

Большинство мутаций локализовано в консервативных областях TPM2 и TPM3. Только пять мутаций (TPM2-Asp2Val, TPM3-Gln31Stop, TPM2-Glu41Lys, TPM2-Leu143Pro, и TPM3-Thr252Lys) находятся в неконсервативных областях. Четыре из аминокислот различных между тропомиозинами (TPM2-Asp2Val, TPM2-Glu41Lys, TPM2-Leu143Pro, и TPM3-Thr252Lys) замещены аналогичными аминокислотами, например, один кислый аминокислотный остаток на другой кислый.

Наряду с мутациями ТМ, находящимися в областях взаимодействия с актином, обнаружены мутации в участках взаимодействия с ТnТ. Среди них мутация Tyr261Cys в TPM2 и Met9Arg в TPM3 [Murakami et al., 2008] (рис. 11).

Полимеризация тропомиозина (N-конец к С-концу) требуется для связывания с актином и играет важную роль как в стабилизации актиновой нити, так и в регуляции актин-миозинового взаимодействия [Murakami et al., 2008]. Мутации Ala3Gly, Lys7del в TPM2 и Ala4Val,

Met9Arg и Stop285Ser/Asn в TPM3 находятся в области перекрывания соседних молекул ТМ, участвующей в полимеризации ТМ (рис. 12).



**Рисунок 12.** Перекрывание концов тропомиозина и взаимодействие тропомиозина с ТnТ. Перекрывание концов тропомиозина (8:59 и 277-284, серые блоки) и взаимодействие тропомиозина с ТnТ, основано на модели Мураками и др. [Murakami et al., 2008]. Мутации в зонах перекрывания показаны серым; розовым - мутация в TPM1 (кардиомиопатия), синим – в TPM2. Только несколько мутации участвуют в контактах с ТnТ (зеленым цветом обозначена) в этой области тропомиозина. TPM2 Y261C находится рядом с A262, M9R предполагается, что связывается с F86 в ТnТ, а K15N (TPM1) с Q79 в ТnТ.

В целом, фенотипы наследственных миопатий можно разделить на два типа: те, которые характеризуются врожденной слабостью мышц и те, которые характеризуются нормальной или повышенной сократимостью мышц. Сократительная функция изменяется в результате мутаций сократительных и регуляторных белков, в том числе тропомиозина. Классифицировать данные расстройства весьма затруднительно, потому что одна мутация может вызвать целый ряд клинических и морфологических проявлений. Для того чтобы понять первопричину этих заболеваний, необходимо выявить механизмы нарушения работы актомиозинового мотора на молекулярном уровне.

## Глава 2. Материалы и методы

Объектом исследования были одиночные мышечные волокна, выделенные из скелетных мышц кролика, сократительная и регуляторная системы которых были реконструированы.

### 2.1. Получение глицеринизированных мышечных волокон

Глицеринизированные мышечные волокна получали из m. psoas кролика по методу Сент-Дьордьи [Szent-Gyorgyi, 1949]. Пучок мышечных волокон диаметром около 2 мм из поясничной мышцы кролика закрепляли при длине покоя на лигатурах-распялках и помещали на



сутки в охлажденный до 4°C глицеринизирующий раствор, содержащий 50 % глицерина, 0.1 М KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0). Через сутки пучки мышечных волокон переносили в новую порцию глицеринизирующего раствора на 24 часа. В следующей порции этого раствора материал хранился при -20°C в течение 3-4 месяцев. За 2 часа до эксперимента из пучков выделяли одиночные волокна и помещали их в охлажденный до 4°C отмывающий раствор, содержащий 0.1 М KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0).

## **2.2. Приготовление теневых мышечных волокон**

“Теневые” волокна получали из одиночных глицеринизированных мышечных волокон кролика. Для экстракции миозина, тропомиозина и тропонина волокна помещали в экстрагирующий раствор, содержащий 0.8 М KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ АТФ, 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0). Волокна инкубировали в этом растворе в течение 1 часа 30 минут при комнатной температуре. После экстракции волокно состоит на 80 % – 90 % из актина. Далее “теневые” мышечные волокна закрепляли на предметных стеклах и помещали в отмывающий раствор, содержащий 0.1 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0).

## **2.3. Выделение миозина**

Миозин выделяли из скелетных мышц кролика методом Иванова и Юрьева [Иванов, Юрьев, 1961]. Мышцы задних конечностей кролика тщательно очищали от соединительной и жировой ткани, охлаждали на льду и пропускали через предварительно охлажденную мясорубку. Приблизительно 100 г фарша заливали 300 мл раствора Вебера, содержащего 0,6 М KCl, 0,01 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

0,04 М NaHCO<sub>3</sub>. Полученный материал энергично перемешивали на холоде в течение 7 минут и затем центрифугировали 15-20 минут при 3000 об./мин. К осадку добавляли 10 объемов холодной воды и доводили pH раствора до 6,8 0,5 % уксусной кислотой. Выпавший осадок белка через 2-3 часа отделяли центрифугированием и промывали один раз холодной водой. К супернатанту постепенно добавляли 0,02 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и 0,01 % фенолфталеина при тщательном перемешивании до получения стойкого розового окрашивания (pH 8,3). Затем добавляли раствор KCl до конечной концентрации 0,5 М. Полученный раствор разводили в 10 раз водой комнатной температуры, предварительно

подщелоченной  $K_2CO_3$  до слабо-розового окрашивания по фенолфталеину. При этих условиях миозин оставался в растворе, а актомиозин выпадал в виде рыхлого осадка. Осадок актомиозина отделяли центрифугированием и отбрасывали. Слабо-розовый супернатант охлаждали и добавляли к нему равный объем холодной воды. pH раствора доводили до 7,0 0,5 % уксусной кислотой. При сильном перемешивании раствора происходило выпадение осадка миозина, который при хранении 10-12 часов оседал, образуя студенистый слой. Осадок миозина отделяли от надосадочной жидкости декантацией и центрифугированием. Затем миозин растворяли добавлением KCl до конечной концентрации 0,6 М с таким расчетом, чтобы объем раствора увеличился вдвое по сравнению с количеством осадка миозина. Небольшое количество нерастворившихся взвешенных частиц отделяли фильтрованием через бумажный фильтр, смоченный 0,6 М KCl. Миозин хранили в растворе, содержащем 50 % глицерина, 0,5 М KCl, 0,005 М ДТТ, 0,001  $NaN_3$ , при  $-20^\circ C$ .

#### **2.4. Получение субфрагмента-1 миозина**

Субфрагмент-1 миозина (S1), не содержащий регуляторных легких цепей, получали ограниченным протеолизом скелетного миозина  $\alpha$ -химотрипсином [Okamoto, Sekine, 1985] в буфере: 0.01 М Трис-HCl (pH 6.8), 0.12 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ  $NaN_3$  в весовом отношении миозин:химотрипсин равном 300:1 при  $25^\circ C$  и постоянном перемешивании в течение 20 минут. Реакцию ингибировали добавлением PMSF до конечной концентрации 1 мМ и охлаждением на льду. Затем добавляли раствор  $Mg^{2+}$  до концентрации 3 мМ и далее центрифугировали при 15 тыс. об./мин. в течение 15 минут. Супернатант смешивали с двумя объемами насыщенного раствора сульфата аммония (до 70 % насыщения). Центрифугировали при 15 тыс. об./мин. в течение 15 минут. Осадок S1 растворяли в 1мл буфера, содержащем 0.02 М Трис-гидрохлорида pH 7.5, 1 мМ  $MgCl_2$ , 0.1 мМ ДТТ, 0.1 мМ  $NaN_3$ , а затем диализовали в течение ночи против того же буфера.

#### **2.5. Получение рекомбинантного $\alpha$ - и $\beta$ -тропомиозина**

Рекомбинантные сердечные  $\alpha$ - и скелетные  $\beta$ -тропомиозины человека были любезно предоставлены для работы профессором

Ч.Редвудом, работающим в Оксфордском Университете (Лондон). Методика получения тропомиозина приведена ниже.

С целью получения последовательности с нуклеотидной заменой проводилось три этапа ПЦР. На первом этапе проводилась амплификация двух фрагментов кодирующей последовательности, фланкированных с одного конца мутагенным праймером, а с другого – Т7-праймером. Для работы использовалась высокоточная термостабильная ДНК полимеразы Pfx (Invitrogene) и дезоксинуклеотид трифосфаты фирмы Fermentas. На втором этапе ПЦР проводился отжиг ранее амплифицированных фрагментов на себя и восстановление полной кодирующей последовательности, несущей мутацию. Третий этап ПЦР был предназначен для амплификации мутантной последовательности. Далее ПЦР-фрагмент выделялся из смеси с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, с использованием Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas), обрабатывался рестриктазами NdeI и EcoRI (Fermentas) и лигировался в вектор pMW172, предварительно обработанный теми же рестриктазами. В работе применялась Т4 ДНК-ликаза фирмы Fermentas. Компетентные клетки *E. Coli* трансформировались лигазной смесью и высевались на чашки Петри с LB-агаром и ампициллином. Выросшие на чашках колонии анализировались с помощью ПЦР с Т7 праймерами на предмет наличия вставки нужного размера (~1000 kb) в плазмиде. Положительные колонии использовались для приготовления «ночных культур», из которых впоследствии выделялась плазмидная ДНК с помощью GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Корректность нуклеотидной последовательности генов ТМ проверялась с помощью секвенирования ДНК. В среднем, для трансформации 100 мкл компетентных клеток *E.coli* использовалось 0,5 мкл водного раствора плазмиды с концентрацией 100 нг/мкл.

Для экспрессии гена использовались *E. Coli* линии BL21(DE3), в качестве переносчика – фаг Т7. Культура выращивалась в 50 мл. среды, содержащей Триптон 16 г/л, экстракт дрожжей 10 г/л, NaCl 5 г/л, карбенициллин 100 мкг/мл, хлорамфеникол 200 мкг/мл, рН 7.4. Инкубация производилась при 37°C в течении 3 часов. Затем 10 мл культуры переносилось в 1 литр свежей среды и инкубировалось до достижения оптической плотности  $A_{600\text{nm}}=0,8$ , затем в среду добавлялся изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид до концентрации 0,4



мМ, после чего проводилась дальнейшая инкубация еще 3 часа. Клетки собирались центрифугированием (4500 g, 10 мин, 4°C), замораживались. Затем, после размораживания, клетки ресуспензировались в 20 мл 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0) в присутствии 25 % сахарозы, 1 мМ ЭДТА и лизировались под прессом. Лизат очищался (10000 g, 20 мин., 4°C), к супернатанту добавлялся трёхкратный объём этанола. Осадок, сформировавшийся за ночь при комнатной температуре, собирался центрифугированием (10000 g, 20 мин, 4°C), промывался в 4 объемах этанола и высушивался. Этаноловый порошок экстрагировался в 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 1М KCl, 14 мМ  $\beta$ -мекаптоэтанол, 0,1 мМ фенилметилсульфонил флуорид при 4°C 4 часа при помешивании. После экстракции препарат очищался (10000 g, 20 мин, 4°C), pH супернатанта доводился до 4.6 1N HCl на льду при помешивании. Осадок, полученный центрифугированием (8000 g, 15 мин, 4°C), ресуспензировался в 1 мМ ДТТ, pH доводился до 7.0 1N NaOH. Сульфат аммония добавлялся до конечной концентрации 40%, pH доводился до 7.0 1N NaOH и оставлялся на льду на 20 мин. После центрифугирования (16000 g, 30 мин, 4°C), сульфат аммония добавлялся до конечной концентрации 70%. Выпавшие в осадок белки, собирались центрифугированием (16000 g, 30 мин, 4°C), ресуспензировались в 20 мл. 50мМ Tris-HCl (pH 8.0), 0,1 % NaN<sub>3</sub>, 0,5мМ ЭДТА, 14мМ  $\beta$ -мекаптоэтаноле и диализировались против такого же буфера. В полученный раствор добавлялась мочевиная до конечной концентрации 8М, затем он очищался в целлюлозной колонке и диализировался вначале против 50мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150мМ KCl, 1мМ ДТТ для удаления мочевины, а затем против 1мМ ДТТ, 1мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Полученный препарат подвергался сухой заморозке и хранился при -70°C.

## **2.6. Модификация мышечных белков флуоресцентными зондами**

G- и F-актин, S1 миозина, кальдесмон, скелетномышечный и гладкомышечный тропомиозины окрашивали с помощью флуоресцентных красителей по методикам, разработанным ранее.

G-актин окрашивали N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)этилен-диамином (1,5-IAEDANS) по Cys374, как описано ранее [Miki et al., 1987]. Для этого белок концентрацией 2 мг/мл смешивали с 10-кратным количеством красителя в течение 3-4 ч при комнатной температуре. Затем G-актин полимеризовали в течение 12-16 ч при 4°C. Препарат

белка центрифугировали при  $100000 \times g$  2 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ , осадок растворяли в G-буфере (см. раздел 2.3), и снова центрифугировали при  $100000 \times g$  1 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . Препарат очищали с помощью колонки с наполнителем Sephadex G-25. Степень модификации, рассчитанная с помощью коэффициента поглощения  $77000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 496 нм, составила 0,55.

В некоторых экспериментах F-актин теневых волокон окрашивали FITC-фаллоидином. Для этого мышечное волокно инкубировали в отмывающем растворе (см. раздел 2.1), содержащем 40 мкМ красителя, в течение 20 мин при комнатной температуре [Galazkiewicz et al., 1987]. Согласно опубликованным данным [Oda et al., 2005], производные фаллоидина связываются к актину в области контакта трех мономеров актина.

Модификацию наиболее реактивной сульфгидрильной группы миозина SH1 (остатка Cys707) флуоресцентным красителем 1,5-IAEDANS осуществляли согласно методу Борејдо и Путнам [Borejdo, Putnam, 1977]. Для этого в буфере, содержащем 60 мМ KCl, 0,1 мМ DTT, 30 мМ Tris-HCl, pH 7,5, S1 смешивали с 3-кратным количеством красителя в течение 18 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . Реакцию останавливали избыточным количеством DTT. Несвязавшийся краситель удаляли диализом против раствора, содержащего 10 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 мМ DTT, 10 мМ Tris-HCl, pH 6,8. После этого препарат очищали с помощью колонки с наполнителем Sephadex G-25. Степень модификации, рассчитанная с помощью коэффициента поглощения  $6100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 336 нм, составила 0,9–0,95.

Рекомбинантный  $\beta$ -тропомиозин, содержащий в своей структуре один цистеиновый остаток Cys36, окрашивали 5-йодоацетоамидофлуоресцеином (5-IAF) по методике, предложенной Ламкин и др. [Lamkin et. al., 1983]. Вначале сульфгидрильные группы тропомиозина восстанавливали с помощью 10 мМ DTT в течение 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем белок отмывали от DTT путем диализа и помещали в раствор, содержащий 1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 20 мМ Tris-HCl, pH=8,0 и 20-кратный избыток красителя в течение 24 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакцию окрашивания останавливали избыточным количеством DTT. Излишки красителя и DTT отмывали в буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 0,1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 2 мМ HEPES, pH=7,5. Соотношение красителя к белку вычисляли как разницу между поглощением препарата белка при 337 и 277 нм с помощью коэффициентов поглощения  $E_{337}=6100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  и  $E_{277}=1060$

$M^{-1}cm^{-1}$ . При измерении параметров флуоресценции окрашенного тропомиозина использовали препарат белка концентрацией 2 мг/мл при соотношении красителя к белку (0,8-1,2):1. Мечение Cys36 и Cys190 гладкомышечного  $\alpha\beta$ -ТМ тропомиозина осуществляли без диссоциации  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц флуоресцентными красителями соответственно 1,5-IAEDANS и 5-IAF. Специфичность окрашивания препаратов определяли методом ДСН-электрофореза в ПААГ с последующей визуализацией гелей.

## **2.7. Реконструкция сократительной и регуляторной системы в теневом мышечном волокне**

Взаимодействие F-актина с актин-связывающими белками происходило при инкубации теневого мышечного волокна с каждым из белков в соответствующем растворе следующего состава: 100 мМ KCl, 3 мМ  $MgCl_2$ , 1 мМ  $NaN_3$ , 67 мМ Na,K-фосфатного буфера (pH 7,0) и 2–5 мг/мл тропомиозина; 5 мМ KCl, и 2 мг/мл S1. Несвязавшийся белок отмывали инкубацией волокон в соответствующем буферном растворе. Белковый состав реконструированных волокон контролировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН [Laemmli, 1970]. Молярные отношения тропомиозина, S1, кальдесмона или рекомбинантного пептида к актину в теневых волокнах были равны 1:6,5 ( $\pm 3$ ), 1:5 ( $\pm 2$ ), 1:7 ( $\pm 3$ ) и 1:5 ( $\pm 3$ ), соответственно.

## **2.8. Определение концентрации мышечных белков**

Концентрацию белков определяли с помощью спектрофотометра СФ-46, используя следующие коэффициенты поглощения ( $(мг/мл)^{-1}cm^{-1}$ ) и молекулярные массы: актин,  $E_{280}=110$ , 42000; S1,  $E_{280}=75$ , 110000; скелетный и сердечный тропомиозин,  $E_{277}=0,24$ , 66000; кальдесмон,  $E_{278}=38$ , 87000; гладкомышечный тропомиозин,  $E_{277}=19$ , 68000.

## **2.9. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле**

Анализ препаратов белков и белковый состав мышечных волокон определяли с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфат натрия (ДСН) в вертикальном блоке по методике Лаемли [Laemmli, 1970].

Состав разделяющего геля: 0.38 М Трис-HCl (pH 8.8), 10 % акриламид (АА), 0.27 % метиленбисакриламид (МБА), 0.1% ДСН, 0.1 % персульфат аммония (ПСА). Гель объемом 5 мл готовили сливанием 1.87 мл 1 М Трис-HCl (pH 8.8), 1 мл раствора, содержащего 50 % АА и

1.35 % МБА (соотношение АА к МБА составляло 50 г : 1.35 г на 100 мл), 50 мкл 10 % ДСН и 50 мкл 10 % персульфата аммония (ПСА). Полимеризацию осуществляли добавлением 5 мкл ТЕМЕД (N,N,N',N' - тетраметилендиамин).

Состав концентрирующего геля: 0.125 М Трис-НСI (рН 6.8), 4 % АА, 0.08 % МБА, 0.1 % ДСН, 0,1 % ПСА, 5 мкл ТЕМЕД. Гель объемом 5 мл готовили сливанием 0.625 мл 1 М Трис-НСI (рН 6.8), 0.4 мл раствора, содержащего 50 % АА и 1.3 % МБА, 50 мкл 10 % ДСН и 50 мкл 10 % ПСА. Полимеризацию осуществляли добавлением 5 мкл ТЕМЕД.

Верхний и нижний электродные буферы имели одинаковый состав и содержали 0.2 М Трис-глициновый буфер (рН 8.3) и 0.1 % ДСН.

Пробы для электрофореза содержали 1 М трис-НСI (рН 6.8), 25 % глицерин, 2 % ДСН, 3.75 %  $\beta$ -меркаптоэтанол, следы красителя бромфенолового синего, 3-5 мышечных волокон или раствор исследуемого белка в соотношении 1:1. Пробы инкубировали при 100°C в течение 2 минут и хранили при температуре ниже 0°C.

Электрофорез проводили в вертикальном полиакриламидном блоке размером 100×83×1 мм. Начальное значение тока составляло 10 мА, после входа зоны красителя в разделяющий гель – 25 мА. По окончании электрофореза гели окрашивали в растворе, содержащем 10 % уксусной кислоты, 25 % изопропанола и 0.05 % Кумаси ярко-голубого R-250, в течение 30 мин. на качалке. Избыток Кумаси отмывали раствором 10 % изопропанола и 10 % уксусной кислоты.

## 2.10. Метод поляризационной микрофлуориметрии

Измерения параметров поляризованной флуоресценции проводили на поляризационном микрофлуориметре [Borovikov et al., 2004]. Поляризованную флуоресценцию зонда возбуждали светом с длиной волны 365±5 нм и регистрировали в диапазоне 480–550 нм. Флуоресценцию измеряли в буфере А, содержащем 10 мМ КСI, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, 6,7 мМ Na, К–фосфатного буфера (рН 7,0) и 4 мМ ЭГТА в отсутствие или в присутствии 2,5 мМ ADP, 15 мМ AMPPNP, 25 мМ АТР $\gamma$ S или 5 мМ АТР.

Для каждого волокна регистрировали значения четырех составляющих интенсивности поляризационной флуоресценции:  $I_{\perp\perp}$ ,  $I_{\parallel\parallel}$ ,  $I_{\perp\parallel}$ ,  $I_{\parallel\perp}$ , где индексы слева от I обозначают параллельное ( $\parallel$ ) и перпендикулярное ( $\perp$ ) направления поляризации возбуждающего света,

а индексы справа от I - параллельное и перпендикулярное направления поляризации флуоресценции зондов относительно оси волокна. Эти данные позволяют рассчитать степени поляризации флуоресценции (P) при ориентации волокна параллельно ( $P_{\parallel}$ ) и перпендикулярно ( $P_{\perp}$ ) плоскости поляризации возбуждающего света по формулам:

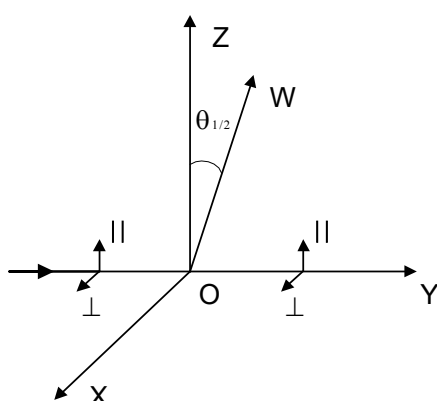
$$P_{\parallel} = \frac{({}_{\parallel}I_{\parallel} - {}_{\parallel}I_{\perp})}{({}_{\parallel}I_{\parallel} + {}_{\parallel}I_{\perp})}, \quad P_{\perp} = \frac{({}_{\perp}I_{\perp} - {}_{\perp}I_{\parallel})}{({}_{\perp}I_{\perp} + {}_{\perp}I_{\parallel})}$$

Математическая модель, в соответствии с которой производился анализ экспериментальных данных, основана на следующих допущениях [Каулин, 1968; Розанов и др., 1971; Tregear, Mendelson, 1975; Yanagida, Oosawa, 1978; Wilson, Mendelson, 1983; Irving, 1996; Borovikov et al., 2004]. Мышечное волокно рассматривается как цилиндрически симметричная система с осью симметрии, ориентированной вдоль волокна. В волокне имеются как ориентированные по спирали, так и хаотически расположенные флуорофоры. Флуорофоры неподвижны и не взаимодействуют между собой. Элементарные акты поглощения и испускания света осуществляются линейными, полностью анизотропными, осцилляторами поглощения (A) и излучения (E), которые жестко связаны с молекулами флуорофора. Оси осцилляторов, ориентированных флуорофоров располагаются по спирали вдоль образующей поверхности конуса, ось которого совпадает с осью F-актина. Осцилляторы поглощения и излучения образуют при вершине конусов углы  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$ , соответственно (рис. 13). Угол  $\gamma$  между осями осцилляторов поглощения и излучения является постоянной величиной для флуорофоров каждого данного зонда. Тонкая нить является гибкой и может отклоняться от оси мышечного волокна на угол  $\theta_{1/2}$ . Величина  $\theta_{1/2}$  позволяет определить эластичный модуль (жесткость тонкой нити на изгиб) [Yanagida, Oosawa, 1978]. Согласно теории полугибких нитей, среднее значение  $\sin^2\theta$  связано с модулем упругости  $\epsilon$ . Зависимость следующая:  $\sin^2\theta = 0,87(kT/\epsilon)L$ , где L – длина филамента. Таким образом, модуль упругости (или жесткость на изгиб,  $\epsilon$ ) можно получить, зная  $\sin^2\theta$  [T. Yanagida, Ф. Oosawa, 1978]. Величина N отражает относительное количество хаотично расположенных флуорофоров. Величина N прямо пропорциональна подвижности флуорофоров [Yanagida, Oosawa, 1978].

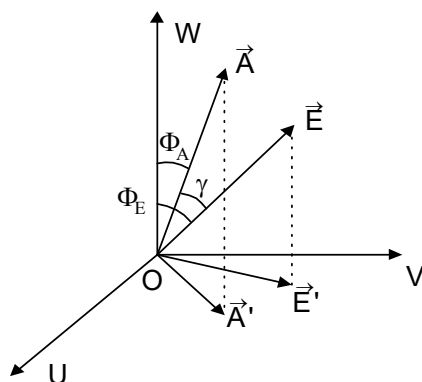
Соотношения четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции  ${}_{\parallel\perp}/{}_{\parallel\parallel}$ ,  ${}_{\perp\perp}/{}_{\parallel\parallel}$  и  ${}_{\perp\parallel}/{}_{\parallel\parallel}$  рассматривали как функции углов  $\Phi_A$ ,

$\Phi_E$  и величины  $N$ . В рамках описываемой модели  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$ , являются показателями ориентации флуорофоров в волокне, тогда как величина  $N$  прямо пропорциональна их подвижности. Поскольку изменения  $\Phi_A$  были аналогичны изменениям  $\Phi_E$ , значения угла  $\Phi_A$  в работе не приводятся.

Статистическую достоверность изменений параметров флуоресценции оценивали с помощью критерия Стьюдента, равного 0,95 %.



а



б

**Рисунок 13.** Диаграммы угловых координат тонкой нити (а) и диполей поглощения (OA) и излучения (OE) флуорофора (б) [Yanagida, Oosawa, 1978]. Ось актинового филамента (OW) отклоняется от длинной оси мышечного волокна (OZ) на угол  $\theta_{1/2}$ . Осцилляторы поглощения (A) и излучения (E) расположены вдоль образующей поверхности конусов, оси которых совпадают с осью OW, и образуют соответственно углы  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$  при вершине конусов. Значки (||) и ( $\perp$ ) обозначают параллельную и перпендикулярную составляющие этого света.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Влияние мутации Gly126Arg в $\alpha$ - и $\beta$ -изоформах ТМ на структурное состояние актина и ТМ при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне.

Консервативные неканонические остатки Gly126 и Asp137 вызывают локальное расхождение  $\alpha$ -спиралей молекулы ТМ и их частичное разворачивание. Такая дестабилизация структуры придает центральной части молекулы ТМ характерную конформационную подвижность, которая, как предполагается, важна для функционирования этого белка [Nevzorov et al., 2011; Sumida et al., 2008].

Для дальнейшего выяснения функциональной роли остатка Gly126 в данной работе проверили, как замена Gly126 на канонический остаток Arg в  $\alpha$ -ТМ скелетных или  $\beta$ -ТМ гладких мышц меняет пространственное расположение ТМ и конформационное состояние связанного с ним F-актина в теневых мышечных волокнах.

В этой части работы ТМ и F-актин были мечены флуоресцентными красителями: 5-IAF был ковалентно связан с Cys190  $\alpha$ -скелетного и Cys36  $\beta$ -гладкомышечного ТМ [Borovikov, et al., 2009a; Kulikova et al., 2006], FITC-фаллоидин связывался с F-актином теневых волокон в области желобка актина [Lorenz et al., 1993]. Анализ параметров поляризованной флуоресценции этих зондов позволил определить изменения в гибкости и локализации тяжей ТМ [Borovikov, et al., 2009a; Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2011a; Borovikov et al., 2009b], а также в ориентации субъединиц F-актина в волокнах [Borovikov et al., 2000; Borovikov et al., 2004; Prochniewicz-Nakayama et al., 1983; Borejdo et al., 2007; Borejdo et al., 2004]. В более ранних работах было установлено, что модификация не оказывает существенного влияния на структуру и функцию тропомиозина [Borovikov et al., 2009a].



Известно, что фаллоидин увеличивает жесткость актиновых филаментов [Isambert et al., 1995; Borovikov 1999], АТФазную активность скелетных миофибрилл и их чувствительность к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  [Bukatina, Fuchs 1994]. Однако волокна, содержащие модифицированный фаллоидином или родамин-фаллоидином F-актин, сохраняли способность к связыванию с S1 и ТМ и конформационным изменениям, подобным наблюдаемым в параллельных экспериментах с немодифицированными волокнами [Borovikov 1999; Borovikov et al., 2000]. Что же касается повышенной АТФазной активности, то этот эффект фаллоидина в наибольшей степени проявлялся при рСа 8, но исчезал при рСа 4 [Bukatina, Fuchs 1994]. Исходя из этих данных, при рСа в диапазоне от 4,0 до 5,5, то есть в экспериментальных условиях, использованных в данной работе, влияние фаллоидина было бы пренебрежимо малым. С этим хорошо согласуется тот факт, что и эффект FITC-фаллоидина на АТФазную активность S1 в контрольных экспериментах нами не был выявлен. Кроме того, показано, что включение FITC-фаллоидина в волокна поясничной мышцы кролика не меняет  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность и способность этих волокон развивать напряжение [Prochniewicz-Nakayama et al., 1983]. Таким образом, модификация F-актина FITC-фаллоидином не оказывает существенного влияния на те аспекты работы сократительного аппарата поперечно-полосатых мышц, которые изучаются в нашем исследовании.

В соответствии с ранее опубликованными данными [Borovikov, et al., 2009a; Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2011a; Borovikov et al., 2009b], включение 5-IAF-меченого рекомбинантного ТМ или FITC-фаллоидина в теневые мышечные волокна вызывает появление поляризованной флуоресценции. Значения  $P_{\parallel}$  были ниже значений  $P_{\perp}$  для ТМ-АФ и выше для FITC-актина, соответственно (табл. 1-4).

Следовательно, диполи 5-IAF были ориентированы преимущественно перпендикулярно, а диполи FITC – параллельно оси волокна.

**Таблица 1.** Влияние нуклеотидов (нукл.),  $\alpha$ -TM и S1 на параметры поляризованной флуоресценции ( $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ ) актин-FITC-фаллоидина. n – количество волокон в эксперименте. SEM – стандартная ошибка среднего значения

| Нукл.   | S1 | WT-TM | Gly126Arg | n  | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|-----------|----|--------------------------------|----------------------------|
| -       | -  | -     | -         | 15 | $0.359 \pm 0.002$              | $0.151 \pm 0.002$          |
| -       | -  | +     | -         | 7  | $0.387 \pm 0.001$              | $0.160 \pm 0.002$          |
| -       | -  | -     | +         | 8  | $0.371 \pm 0.002$              | $0.156 \pm 0.001$          |
| -       | +  | +     | -         | 7  | $0.352 \pm 0.001$              | $0.158 \pm 0.002$          |
| -       | +  | -     | +         | 8  | $0.337 \pm 0.002$              | $0.165 \pm 0.001$          |
| ADP     | +  | +     | -         | 7  | $0.346 \pm 0.001$              | $0.181 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +         | 8  | $0.338 \pm 0.001$              | $0.191 \pm 0.001$          |
| ANP-PNP | +  | +     | -         | 7  | $0.347 \pm 0.002$              | $0.110 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +         | 5  | $0.340 \pm 0.001$              | $0.104 \pm 0.001$          |
| ATP     | +  | +     | -         | 5  | $0.362 \pm 0.002$              | $0.039 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +         | 5  | $0.359 \pm 0.001$              | $0.104 \pm 0.002$          |

**Таблица 2.** Влияние нуклеотидов (нукл.),  $\beta$ -TM и S1 на значения  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  поляризованной флуоресценции актин-FITC-фаллоидина. n – количество волокон в эксперименте. SEM – стандартная ошибка среднего значения

| Нукл.   | S1 | WT-TM | Gly126Arg | n  | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|-----------|----|--------------------------------|----------------------------|
| -       | -  | -     | -         | 15 | $0.359 \pm 0.002$              | $0.151 \pm 0.002$          |
| -       | -  | +     | -         | 5  | $0.364 \pm 0.003$              | $0.178 \pm 0.002$          |
| -       | -  | -     | +         | 8  | $0.364 \pm 0.003$              | $0.179 \pm 0.002$          |
| -       | +  | +     | -         | 5  | $0.311 \pm 0.001$              | $0.196 \pm 0.002$          |
| -       | +  | -     | +         | 8  | $0.305 \pm 0.002$              | $0.183 \pm 0.001$          |
| ADP     | +  | +     | -         | 5  | $0.296 \pm 0.001$              | $0.221 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +         | 8  | $0.298 \pm 0.001$              | $0.199 \pm 0.001$          |
| ANP-PNP | +  | +     | -         | 5  | $0.347 \pm 0.002$              | $0.110 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +         | 5  | $0.340 \pm 0.001$              | $0.104 \pm 0.001$          |
| ATP     | +  | +     | -         | 5  | $0.313 \pm 0.002$              | $0.159 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +         | 5  | $0.324 \pm 0.001$              | $0.128 \pm 0.002$          |

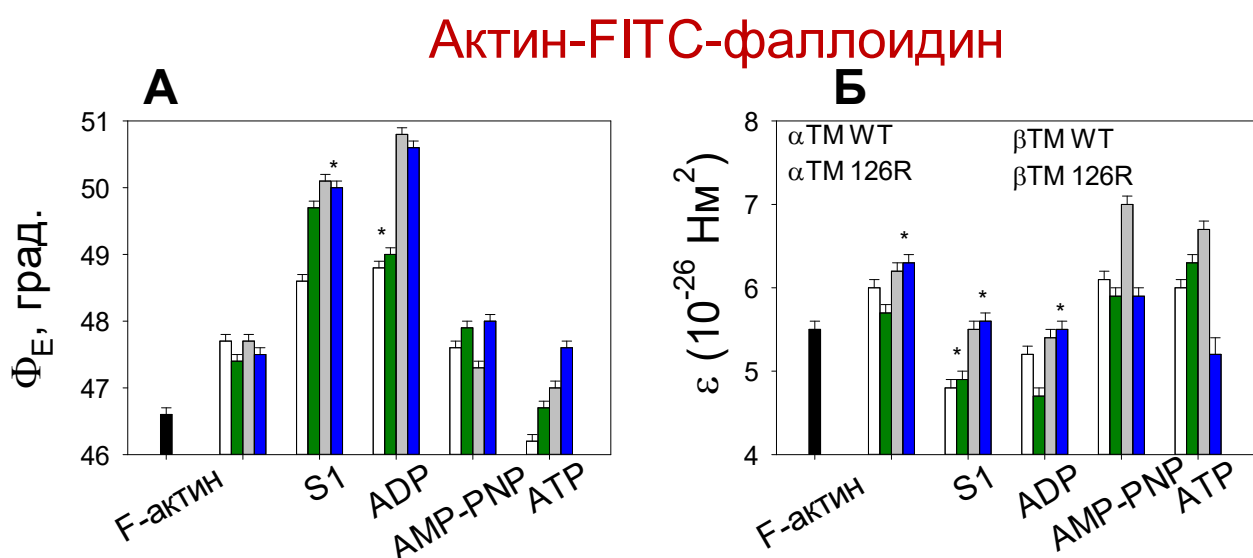
**Таблица 3.** Влияние нуклеотидов (нукл.) и S1 на параметры поляризованной флуоресценции ( $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ )  $\alpha$ -TM-AF. n – количество волокон в эксперименте. SEM – стандартная ошибка среднего значения

| Нукл.   | S1 | WT-TM | Gly126Arg | n | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|-----------|---|--------------------------------|----------------------------|
| -       | -  | +     | -         | 7 | $0.106 \pm 0.002$              | $0.201 \pm 0.003$          |
| -       | -  | -     | +         | 7 | $0.148 \pm 0.001$              | $0.263 \pm 0.001$          |
| -       | +  | +     | -         | 7 | $0.122 \pm 0.001$              | $0.174 \pm 0.001$          |
| -       | +  | -     | +         | 7 | $0.151 \pm 0.001$              | $0.249 \pm 0.001$          |
| ADP     | +  | +     | -         | 7 | $0.126 \pm 0.001$              | $0.174 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +         | 7 | $0.157 \pm 0.001$              | $0.247 \pm 0.001$          |
| ANP-PNP | +  | +     | -         | 6 | $0.110 \pm 0.002$              | $0.151 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +         | 7 | $0.134 \pm 0.002$              | $0.220 \pm 0.002$          |
| ATP     | +  | +     | -         | 6 | $0.176 \pm 0.002$              | $0.195 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +         | 5 | $0.191 \pm 0.001$              | $0.230 \pm 0.002$          |

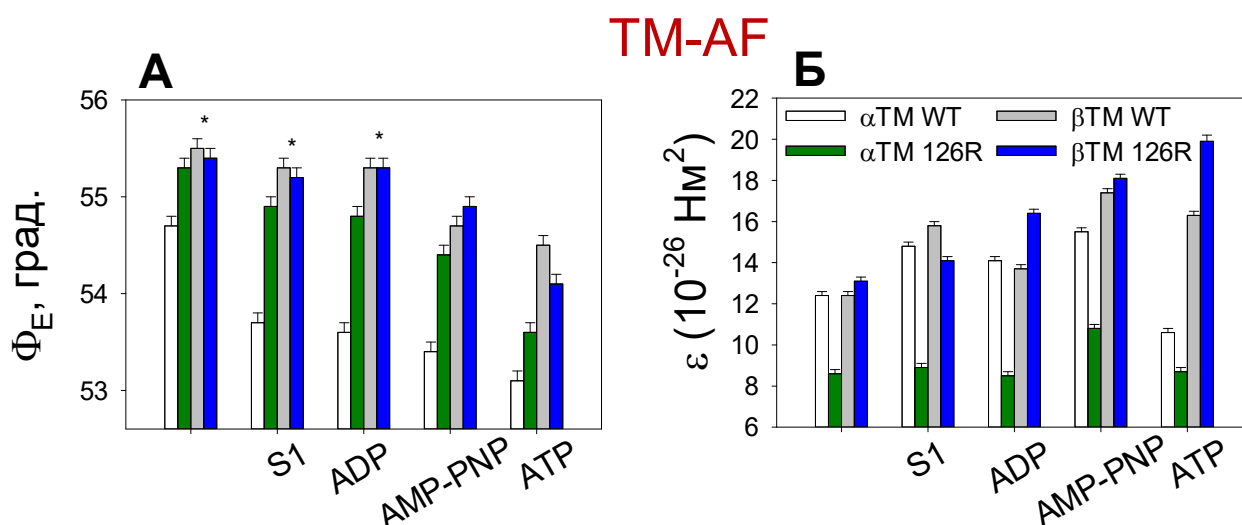
**Таблица 4.** Влияние нуклеотидов (нукл.) и S1 на параметры поляризованной флуоресценции ( $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ )  $\beta$ -TM-AF. n – количество волокон в эксперименте. SEM – стандартная ошибка среднего значения.

| Нукл.   | S1 | WT-TM | Gly126Arg | n | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|-----------|---|--------------------------------|----------------------------|
| -       | -  | +     | -         | 8 | $0.082 \pm 0.002$              | $0.236 \pm 0.002$          |
| -       | -  | -     | +         | 7 | $0.075 \pm 0.001$              | $0.229 \pm 0.002$          |
| -       | +  | +     | -         | 8 | $0.076 \pm 0.003$              | $0.221 \pm 0.001$          |
| -       | +  | -     | +         | 7 | $0.060 \pm 0.001$              | $0.214 \pm 0.001$          |
| ADP     | +  | +     | -         | 8 | $0.076 \pm 0.002$              | $0.224 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +         | 7 | $0.064 \pm 0.001$              | $0.217 \pm 0.001$          |
| ANP-PNP | +  | +     | -         | 7 | $0.067 \pm 0.002$              | $0.189 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +         | 6 | $0.060 \pm 0.002$              | $0.194 \pm 0.002$          |
| ATP     | +  | +     | -         | 6 | $0.082 \pm 0.002$              | $0.190 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +         | 6 | $0.104 \pm 0.001$              | $0.195 \pm 0.002$          |

В результате применения модель-зависимого метода были определены значения  $\Phi_E$  для FITC-актина и TM-AF, которые составили  $47,7^\circ$  и  $54,9^\circ$ , соответственно (рис. 14А и 15А). Относительное количество неупорядоченных зондов (N) было равно нулю для TM, меченного 5-IAF, и не превышало 0,35 для актина, меченого FITC-фаллоидином, что свидетельствует о жестком связывании зондов с белками и высоко упорядоченном расположении F-актина и TM в волокнах [Borovikov 1999]. Так как, FITC-фаллоидин жёстко связывается с актиновой нитью, то значения  $\Phi_E$  и  $\varepsilon$  содержат информацию о пространственной ориентации и жёсткости на изгиб тонких филаментов [Borovikov, et al., 2009a; Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2011a; Borovikov et al., 2009b; Rysev et al., 2012].



**Рисунок 14.** Влияние мутации Gly126Arg в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном TM на значения  $\Phi_E$ (А) и  $\varepsilon$ (Б) поляризованной флуоресценции комплекса FITC-фаллоидин-актин при имитации последовательности промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ.  $\Phi_E$  – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей.  $\varepsilon$  – значение жёсткости на изгиб. Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Gly126Arg.



**Рисунок 15.** Влияние Gly126Arg мутации в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном ТМ на значения  $\Phi_E$ (А) и  $\varepsilon$ (Б) поляризованной флуоресценции 5-IAF, связанного с ТМ при имитации последовательности промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ.  $\Phi_E$  – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей.  $\varepsilon$  – значение жёсткости на изгиб. Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Gly126Arg.

Известно, что FITC-фаллоидин и 5-IAF жёстко связываются с F-актином и ТМ, в то время как сами ТМ и F-актин связаны друг с другом электростатически. Это позволяет определять жёсткость на изгиб для каждого из этих белков отдельно. Очевидно, что если бы ТМ и F-актин были бы связаны жёсткими сшивками, то флуоресцентный зонд давал бы информацию о жёсткости всего комплекса F-актин-ТМ. По нашим данным жёсткость на изгиб для F-актина составляет примерно  $5,5 \cdot 10^{-26}$  Нм<sup>2</sup> (рис. 14Б). Жёсткость на изгиб для С- и N-концов ТМ составляла примерно  $12 \cdot 10^{-26}$  Нм<sup>2</sup>, т.е. в 2 раза выше, чем для F-актина (рис. 14Б и 15Б).

Замена Gly126 на Arg в  $\alpha$ -скелетном или  $\beta$ -гладкомышечном ТМ приводит к статистически значимым ( $P < 0,05$ ) изменениям значений  $\Phi_E$  и  $\varepsilon$  для FITC-актина и ТМ-AF (рис. 14 и 15, что свидетельствует об

изменении в структурном состоянии F-актина и ТМ, вызванной этой мутацией. Таким образом, в соответствии с рис. 14А, связывание ТМ с F-актином увеличивает значения  $\Phi_E$  для FITC-актина с  $46,6^\circ$  до  $47,7^\circ$  и до  $47,4^\circ$  ( $P < 0,05$ ) в присутствии  $\alpha$ -скелетных ТМ дикого типа и ТМ с мутацией Gly126Arg, соответственно. Для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и ТМ с мутацией Gly126Arg значения  $\Phi_E$  увеличиваются до  $47,7^\circ$  и до  $47,5^\circ$  ( $P < 0,05$ ), соответственно. Таким образом, мутация снижает значения  $\Phi_E$  для FITC-актина с обоими ТМ, и  $\alpha$ -скелетным и  $\beta$ -гладкомышечным.

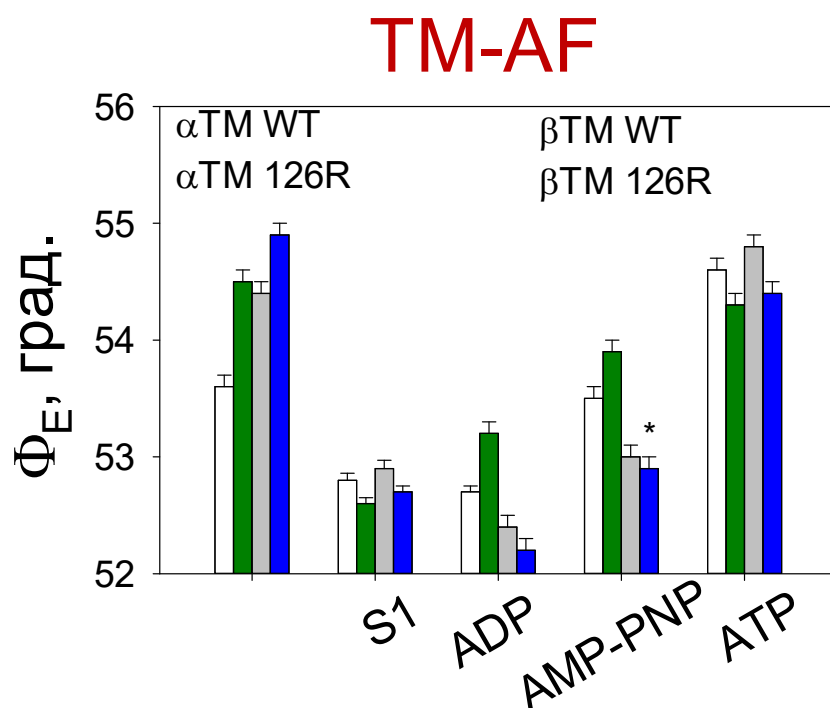
F-актин состоит из двух цепей, образующих правозакрученную спираль с длинным шагом. Так как FITC-фаллоидин располагается в канавке актиновой нити и специфически связывается с тремя соседними субъединицами актина [Lorenz et al., 1993], то изменения в значениях  $\Phi_E$ , могут отражать изменения в спиральной структуре F-актина [Egelman et al., 1982; Wakabayashi et al., 1994]. Увеличение значений  $\Phi_E$  легко объяснить вращением субъединиц актина к периферии тонкой нити [Borovikov et al., 2004; Avrova et al., 2012]. В соответствии с этим предположением уменьшение значений  $\Phi_E$  индуцированное мутацией Gly126Arg в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном ТМ (рис. 14А) можно интерпретировать как результат ингибирования вращения мономеров актина.

Согласно ранее выдвинутому предположению, в чистых филаментах F-актина существуют два различных структурно-функциональных состояний мономеров актина; так называемое «включенное» состояние, в котором актин способен активировать миозиновую АТФазу, и «выключенное» состояние в котором актин не способен активировать АТФазу. Эти два состояния находятся в равновесии, так что, в волокнах относительное количество мономеров в

каждом состоянии может меняться при связывании ТМ, миозина и тропонина с F-актином ([Borovikov, 1983; Borovikov, et al., 2009a], для обзора см., [Borovikov, 1999]). В регулируемых филаментах в присутствии и в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  (т.е. при моделировании так называемых закрытых и заблокированных состояний тонкой нити [Lehman, 2013; Li, 2011]), тропонин увеличивает и уменьшает, соответственно, число «включенных» мономеров актина. В свободных от тропонина мышечных волокнах число включенных мономеров актина выше, чем в регулируемых тонких нитях в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$ , и ниже, чем в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  [Borovikov, Gusev 1983; Borovikov et al., 2009]. Следовательно, можно предположить, что состояние F-актина в свободных от тропонина мышечных волокнах может быть промежуточным между закрытым и заблокированными состояниями. В нашей работе было показано, что связывание ТМ с F-актином увеличивает значения  $\Phi_E$  по сравнению со значениями F-актина без ТМ (рис. 14А). Увеличение значений  $\Phi_E$  в результате связывания с актином скелетного и гладкомышечного ТМ с мутацией Gly126Arg не такое значительное, как после связывания ТМ дикого типа (рис. 14А). Вполне возможно, что в волокнах, содержащих ТМ с мутацией Gly126Arg часть включенных актиновых мономеров может выключаться под влиянием ТМ с мутацией. Это может препятствовать связыванию миозина с F-актином в присутствии ТМ с этой мутацией.

На рис. 15А представлены значения  $\Phi_E$  для ТМ дикого типа и ТМ с заменой Gly126Arg, модифицированных 5-IAF. Поскольку при связывании ТМ с чистыми актиновыми филаментами, мономеры актина поворачиваются, и амплитуда этого вращения отличается для волокон с ТМ-WT и ТМ с мутацией (рис. 14А), то для определения позиции ТМ относительно актина необходимо учитывать изменение пространственной организации актиновой спирали. С учётом вращения

мономеров актина значения  $\Phi_E$  составляют  $53,6^\circ$  и  $54,5^\circ$  для  $\alpha$ -скелетных ТМ дикого типа и ТМ с мутацией, и  $54,4^\circ$  и  $54,9^\circ$  для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и ТМ с мутацией, соответственно (рис. 16). Это означает, что замещение Gly126 на Arg может вызвать поворот излучающих диполей к периферии волокна во всех ТМ. Поскольку флуоресцентный зонд 5-IAF жестко связан с ТМ, то можно предположить, что мутантный ТМ расположен ближе к внешней области актина, чем ТМ дикого типа. Похожая разница в положении  $\alpha$ - и  $\beta$ -ТМ наблюдалась ранее для свободных от тропонина актиновых нитей [Lehman, 2000].



**Рисунок 16.** Значения  $\Phi_E$  поляризованной флуоресценции 5-IAF, связанного с ТМ, при имитации последовательности промежуточных стадий АТФазного цикла после поправки на вращение актиновых мономеров. Угол  $\Phi_E$  дан с поправкой на вращение мономеров актина. Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-ТМ и Gly126Arg.



Таким образом, замена Gly126 на Arg в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном ТМ сдвигает его тяжи в сторону блокирующей позиции (рис. 16), переключает мономеры актина в «выключенное» состояние (рис. 14) и, таким образом, может ингибировать связывание S1 с актином. Существует немало доказательств (данные представленные здесь (рис. 14-16) и опубликованные ранее [Borovikov, 1983; Borovikov, et al., 2009]) в пользу предположения о том, что ингибирование связывания миозина с актином тропомиозином осуществляется не только с помощью простого перемещения ТМ нитей в блокирующее положение, но и с помощью аллостерического механизма, то есть путем индуцирования конформационных изменений в F-актине, сопровождаемых вращением мономеров актина.

Недавно было показано, что замещение Gly126 на Arg в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном ТМ вызывает снижение гибкости центральной части молекулы ТМ [Nevzorov, 2011]. Наши данные показывают, что помимо влияния на центральную часть ТМ, эта мутация также изменяет гибкость С-конца  $\alpha$ -скелетного ТМ и N-конца  $\beta$ -гладкомышечного ТМ. Так Gly126Arg мутация уменьшает жесткость на изгиб С-концевой области молекулы (область Cys190) на 31% в  $\alpha$ -скелетном ТМ, и слабо увеличивает гибкость на 6% N-концевой части (область Cys36)  $\beta$ -гладкомышечного ТМ (рис. 15Б).

Интересно отметить, что мутантный  $\alpha$ -скелетный ТМ уменьшает жесткость на изгиб F-актина, тогда как мутантный  $\beta$ -гладкомышечный ТМ не оказывает заметного влияния на эту величину (рис. 14Б). Можно предположить, что изменения в жесткости тяжей ТМ и F-актина происходят в результате конформационных изменений этих белков, вызванных изменениями электростатических связей между ТМ и F-актином. Действительно, мутация Gly126Arg вызывает изменение взаимного положения ТМ (рис. 16) и F-актина (рис. 14А). Мутантные ТМ

поворачиваются (сдвигаются) к периферии волокна, а актиновые мономеры вращаются в противоположном направлении, к центру нити. Это означает, что мутации вызывают конформационные изменения в ТМ и F-актине, которые могут распространяться на области, участвующие в электростатическом взаимодействии этих белков, и, в результате этого, происходят изменения в жесткости F-актина и ТМ.

Ранее Леманом и соавторами было предположено [Lehman et al., 2013], что свободные от тропонина актиновые нити находятся в состоянии, близком к В-(блокирующему) состоянию, а не к С-(закрытому) состоянию. Сравнение данных, полученных ранее [Borovikov et al., 1983; Borovikov et al., 2009] с результатами настоящей работы (рис. 16) позволяет предположить, что в свободных от тропонина актиновых нитях ТМ дикого типа находится между закрытой и блокирующей позициями, что согласуется с предположением Лемана [Lehman et al., 2013]. Мутация Gly126Arg сдвигает ТМ ближе к блокирующей позиции и увеличивает относительное количество выключенных мономеров актина.

Связывание S1 с F-актином в присутствии ТМ дикого типа или ТМ с мутацией Gly126Arg и присутствие нуклеотидов имели существенное влияние на параметры поляризованной флуоресценции ( $P_{||}$ ,  $P_{\perp}$ ,  $\Phi_E$ , и  $\epsilon$ ) 5-IAF-ТМ и FITC-актина (табл. 1-4, рис. 14 и 15). В противоположность этому, в случае отсутствия S1 не было обнаружено никаких существенных изменений в параметрах FITC-актина или F-актина-AF-ТМ, вызванных добавлением нуклеотидов или их аналогов. Следовательно, изменения поляризационных параметров отражают, прежде всего, конформационные изменения в F-актине и ТМ в ходе цикла гидролиза АТФ [Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2011; Borovikov et al., 2009; Borovikov et al., 2004; Rysev et al., 2012]).

В соответствии с рис. 14А и 15А, связывание S1 с F-актином (АМ состояние) увеличивает значения  $\Phi_E$  для флуоресцентных зондов FITC-фаллоидина и уменьшает их для 5-IAF, расположенных в F-актине и ТМ, соответственно. Для  $\alpha$ -скелетного ТМ дикого типа и ТМ с мутацией Gly126Arg, значения  $\Phi_E$  уменьшаются на  $1,0^\circ$  и  $0,4^\circ$  ( $P < 0,05$ ) для 5-IAF, и поднимаются на  $0,9^\circ$  и  $2,3^\circ$  ( $P < 0,05$ ) для FITC-актина, соответственно (рис. 14А и 15А). Следовательно, связывание S1 заставляет излучающие диполи зондов, связанных с F-актином и ТМ двигаться в противоположных направлениях. Диполи FITC-фаллоидина отклоняются к периферии волокна, а диполи 5-IAF - к центру. Аналогичные изменения значений  $\Phi_E$  наблюдаются и для  $\beta$ -гладкомышечного ТМ. Например, для  $\beta$ -гладкомышечного ТМ дикого типа и ТМ с мутацией значения  $\Phi_E$  увеличиваются на  $2,4^\circ$  и  $2,5^\circ$  для FITC-актина, соответственно и практически не изменяются для 5-IAF-ТМ (рис. 14А и 15А). Увеличения значения  $\Phi_E$  для FITC-актина можно легко объяснить вращением мономеров актина к периферии тонкой нити. Как предполагалось ранее [Avrova et al., 2012], изменения в ориентации актиновых мономеров, ведущие к увеличению величины  $\Phi_E$  могут быть интерпретированы как увеличение числа мономеров актина во «включенном» состоянии. В соответствии с рис. 14А, связывание S1 с F-актином увеличивает значения  $\Phi_E$  для  $\alpha$ -скелетного ТМ с мутацией Gly126Arg больше, чем для ТМ дикого типа; это означает, что эта мутация усиливает переключение мономеров актина в волокнах и стимулирует образование сильных форм связывания между миозином и актином, что очень важно для генерации силы [Geeves, Holmes, 2005; Rayment et al., 1993]. Такие изменения могут приводить к увеличению АТФазной активности миозина, наблюдавшейся ранее [Nevzorov et al., 2011]. В противоположность этому мутация Gly126Arg в  $\beta$ -гладкомышечном ТМ не оказывает заметного влияния на значения  $\Phi_E$  (рис. 14А), показывая,

что в комплексе F-актин-ТМ-S1, содержащем WT или мутантный  $\beta$ -гладкомышечный ТМ количество мономеров актина во включенном состоянии было примерно одинаковым.

В соответствии с рис. 15А, значения  $\Phi_E$  для 5-IAF, связанного с  $\alpha$ -скелетными ТМ дикого типа и ТМ с мутацией Gly126Arg изменяются при связывании S1 с комплексом F-актин-ТМ. Необходимо обратить внимание на то, что связывание S1 с тонкой нитью, поворот актиновых мономеров, и амплитуда этого вращения отличаются для WT и ТМ с мутацией (рис. 15А). Вращение субъединиц актина, скорее всего, индуцирует соответствующее смещение ТМ нитей, которые имеют несколько электростатических связей с F-актином. Таким образом, наблюдаемые значения  $\Phi_E$  для ТМ-AF (рис. 15А) рассматриваются как значения, включающие разность между значением  $\Phi_E$  для комплекса актин-ТМ-S1 и комплекса F-актина-ТМ (т.е.  $0.9^\circ$  и  $2.3^\circ$  для  $\alpha$ -скелетных ТМ-AF дикого типа и мутантного с и  $2.4^\circ$  и  $2.5^\circ$ , для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ-AF дикого типа и мутантного, соответственно, рис. 15А). После поправки, значения  $\Phi_E$  для ТМ-AF составляют  $52.8^\circ$  и  $52.6^\circ$   $\alpha$ -скелетных ТМ-AF дикого типа и мутантного, и  $52.9^\circ$  и  $52.7^\circ$  для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ-AF дикого типа и мутантного, соответственно (рис. 16). Вполне вероятно, что при связывании S1 с F-актином, значение  $\Phi_E$  снижается, что отражает движение излучающих диполей флуоресцентных зондов, расположенных на ТМ, к центру нити.

Поскольку флуоресцентные зонды 5-IAF ковалентно связаны с ТМ, то наблюдаемые изменения в значениях  $\Phi_E$  показывают, что S1 сдвигает тяжи ТМ к внутреннему домену актина, открывая сайт связывания с миозином на актине. Это предположение согласуется с данными экспериментов, в которых наблюдали за смещением нативного [Xu, 1999; Craig, 2001] и рекомбинантного [Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2011; Borovikov et al., 2009] ТМ в направлении открытой

позиции, вызванным S1. Так как значения  $\Phi_E$  были меньше для мутантных ТМ, чем для ТМ дикого типа (рис. 16) в состоянии АМ, то это означает, что мутантные ТМ были расположены ближе к внутреннему домену актина, чем ТМ дикого типа. Следовательно, в состоянии АМ S1 сдвигает нити  $\alpha$ -скелетного и  $\beta$ -гладкомышечного ТМ дикого типа по направлению к открытой позиции и увеличивает количество включённых мономеров актина в волокнах. Замена Gly126 на Arg в  $\alpha$ -скелетном ТМ сдвигает нити ТМ дальше в сторону открытой позиции и переключает субъединицы актина во «включенное» состояние в волокнах. В случае с  $\beta$ -гладкомышечным ТМ мутация Gly126Arg также сдвигает ТМ нити ближе к открытой позиции, при этом не вызывая изменений в количестве «включенных» мономеров актина. Эти различия могут указывать на отсутствие полного сходства конформационных состояний  $\alpha$ -скелетного и  $\beta$ -гладкомышечного ТМ, вызванных данной мутацией.

Связывание S1 с F-актином уменьшает жесткость на изгиб F-актина и увеличивает её для ТМ. Таким образом, жесткость ТМ увеличивается на 19% для  $\alpha$ -скелетного ТМ дикого типа на 4% для мутантного  $\alpha$ -ТМ, и на 27% и 8% ( $P < 0,05$ ) для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и мутантного, соответственно, показывая, что S1 обездвиживает тяжи ТМ на поверхности нити. Эта иммобилизация может быть результатом связывания ТМ нитей с S1 [Behrmann et al., 2012]. Замена Gly126 на Arg в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном ТМ изменяет этот эффект. В соответствии с рис. 15Б, эта замена снижает иммобилизацию обоих ТМ тяжей под действием S1, что может указывать на изменения в электростатических взаимодействиях между ТМ, актином и S1. Трудно исключить определенную роль связывания S1 с ТМ в молекулярном механизме мышечного сокращения [Behrmann et al., 2012].

Включение S1 в теневые волокна уменьшает жесткость F-актина на изгиб на 20% и 15% в присутствии  $\alpha$ -скелетных ТМ дикого типа и мутантного, соответственно, и на 12% и 11% ( $P < 0,05$ ) в присутствии  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и мутантного, соответственно. Это согласуется с тем, что S1 формирует сильную форму связывания с F-актином в АМ состоянии цикла гидролиза АТФ, что приводит к увеличению его подвижности [Borovikov et al., 2009]. Замена Gly126 на Arg в ТМ не влияет на значения  $\epsilon$  (рис. 15Б), показывая, что конформационные изменения в ТМ, вызванные Gly126Arg мутацией вызывают лишь небольшие изменения в сродстве S1 к F-актину в соответствии с более ранними наблюдениями [Nevzorov et al., 2011].

При переходе от АМ состояния к  $AM^{**} \cdot ADP \cdot Pi$  состоянию, наблюдались многоступенчатые изменения значений  $\Phi_E$  и  $\epsilon$  для FITC-актина (рис. 14). Считается, что при сильном связывании F-актина с миозином (АМ и  $AM^{\wedge} \cdot ADP$  состояния), субъединицы актина находятся во включенном конформационном состоянии, которое может активировать АТФазу миозина, а при слабом связывании ( $AM^* \cdot ADP$  и  $AM^{**} \cdot ADP \cdot Pi$  состояния) - в выключенном состоянии, в котором они не могут активировать АТФазу [Borovikov et al., 2009]. Следует отметить, что в цикле гидролиза АТФ каждое промежуточное состояние головки миозина вызывает определенное конформационное состояние и положение субъединиц актина в нити [Borovikov et al., 2009]. Как следует из данных представленных на рис. 14. в нитях, содержащих ТМ дикого типа в присутствии MgADP значения  $\Phi_E$ , были выше, чем в отсутствие нуклеотидов (рис. 14А). Это означает, что количество субъединиц актина во включенном состоянии в комплексе актин-S1-ТМ-MgADP выше, чем в комплексе актин-S1-ТМ. В присутствии MgAMP-PNP ( $AM^* \cdot ADP$  состояние), значения  $\Phi_E$  снижаются (рис. 14А), показывая, что субъединицы актина поворачиваются к центру нити, что

свидетельствует о слабом связывании миозина и актина [Avrova et al., 2012]. Поскольку при имитации  $AM^{**}\cdot ADP\cdot Pi$  состояния значения  $\Phi_E$  были небольшими, то значит, что на этой стадии цикла АТФазы подавляющее большинство мономеров актина были, скорее всего, в выключенном состоянии [Borovikov et al., 2009].

Замена Gly126 на Arg в  $\alpha$ -скелетном и  $\beta$ -гладкомышечном ТМ увеличивает значения  $\Phi_E$  в  $AM^{**}\cdot ADP\cdot Pi$  и  $AM^*\cdot ADP$  состояниях (состояния слабого связывания) (рис. 14А), что показывает увеличение относительного количества включённых мономеров актина. В то же время, эта мутация не влечет за собой почти никаких изменений в значениях  $\Phi_E$  при имитации состояний АМ и  $AM^*\cdot ADP$  для  $\beta$ -гладкомышечного ТМ и  $AM^*\cdot ADP$  состояния для  $\alpha$ -скелетного ТМ, показывая, что мутация Gly126Arg не меняет количество включенных мономеров на этих стадиях цикла гидролиза АТФ.

Наши данные указывают на то, что S1 также изменяет положение ТМ нуклеотид-зависимым образом (рис. 15А). Так при переходе от АМ состояния к  $AM^{**}\cdot ADP\cdot Pi$  состоянию наблюдалось многоступенчатое уменьшение значений  $\Phi_E$ . Так как при переходе от АМ состояния к  $AM^{**}\cdot ADP\cdot Pi$  состоянию мономеры актина поворачиваются к центру нити, то значения  $\Phi_E$  для ТМ-АФ могут быть занижены на  $1,5^\circ$  и  $0,7^\circ$  для  $\alpha$ -скелетных ТМ-АФ дикого типа и ТМ-АФ с мутацией, и на  $0,3^\circ$  и  $0,2^\circ$  для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и мутантного, соответственно (рис. 15А). После поправки на вращение актина (рис. 14А) значения  $\Phi_E$  для ТМ-АФ в присутствии MgATP составили  $54,6^\circ$  и  $54,3^\circ$  для  $\alpha$ -скелетных ТМ дикого типа и ТМ с мутацией Gly126Arg, и  $54,8^\circ$  и  $54,4^\circ$  для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и ТМ с мутацией, соответственно (рис. 16), демонстрируя, что при моделировании  $AM^{**}\cdot ADP\cdot Pi$  состояния (состояние слабого связывания) мутантные  $\alpha$ -скелетный и  $\beta$ -

гладкомышечный ТМ были расположены дальше от периферии тонкой нити, чем ТМ дикого типа.

Значения  $\Phi_E$  уменьшались в присутствии MgADP (рис. 16). Так для  $\alpha$ -скелетных ТМ дикого типа и мутантного эти значения составляли  $52,7^\circ$  и  $53,2^\circ$ , и  $52,4^\circ$  и  $52,2^\circ$  ( $P < 0,05$ ) для  $\beta$ -гладкомышечных ТМ дикого типа и мутантного, соответственно (рис. 16), показывая, что при моделировании  $AM^* \cdot ADP$  состояния мутация Gly126Arg сдвигает тяжи  $\alpha$ -скелетного и  $\beta$ -гладкомышечного ТМ, соответственно, дальше на периферию и к центру нити, по сравнению с ТМ дикого типа. При имитации состояния  $AM^* \cdot ADP$  (в присутствии MgAMP-PNP) мутация Gly126Arg в  $\alpha$ -скелетном ТМ сдвигает тяжи ТМ дальше к периферии тонкой нити и не изменяет положение  $\beta$ -гладкомышечного ТМ (рис. 16). В присутствии MgATP эта мутация в обоих ТМ сдвигает его тяжи к центру тонкой нити. Таким образом, другой режим движения в ходе цикла АТФазы наблюдался у мутантных  $\alpha$ -скелетного и  $\beta$ -гладкомышечного ТМ. Это несходство данных, в первую очередь является результатом различия электростатических связей, которые F-актин образует с  $\alpha$ -скелетным и  $\beta$ -гладкомышечным ТМ.

Наши данные показывают, что во всех промежуточных состояниях цикла гидролиза АТФ положение ТМ коррелирует с его гибкостью (рис. 15Б и 16). Так в отсутствие нуклеотидов и в присутствии S1, ТМ обладает высокой гибкостью и его положение ближе к центру нити. Нуклеотиды инвертируют этот эффект: в присутствии каждого нуклеотида (за исключением  $\alpha$ -скелетного ТМ в присутствии MgATP) положение ТМ ближе к центру и коррелирует с увеличением жесткости. Так как сами нуклеотиды не оказывают влияния на положение ТМ в отсутствие S1, то вполне возможно, что изменения жесткости ТМ могут быть результатом, прежде всего, изменений его конформации, которые происходят после связывания миозина с F-актином и изменения



электростатического взаимодействия между F-актином, миозином и ТМ [Lehman et al., 2013; Behrmann et al., 2012]. Различные значения жесткости, полученные при различных промежуточных состояниях для мутантных  $\alpha$ -скелетного и  $\beta$ -гладкомышечного ТМ по сравнению с ТМ дикого типа можно объяснить существенными изменениями в характере электростатического взаимодействия между мутантным ТМ и комплексом актин-S1-нуклеотид. Например, более высокие значения жёсткости, полученные в присутствии MgATP для мутантного  $\beta$ -гладкомышечного ТМ можно объяснить ростом числа (или изменением характера) электростатических связей между F-актином, S1 и ТМ).

Данные, представленные в этой работе предполагают, что мутация Gly126Arg разобщает корреляцию между позицией ТМ и количеством включенных мономеров актина (рис. 14 и 16). Полученные ранее данные [Borovikov et al., 2009], а также результаты, представленные в данной работе, указывают на то, что режим движения ТМ дикого типа по поверхности F-актина коррелирует со среднестатистическим количеством включенных мономеров актина. Многоступенчатый сдвиг ТМ дикого типа от периферии к центру нити наблюдается при переходе от состояний слабого связывания к состояниям сильного связывания S1 с актином в цикле гидролиза АТФ. Каждое положение ТМ соответствует определённому количеству включенных мономеров актина [Borovikov et al., 2009] (рис. 14 и 16). Мутация Gly126Arg нарушает эту закономерность в некоторых промежуточных стадиях АТФазного цикла в случае с  $\alpha$ -скелетным ТМ или на всех стадиях этого цикла в случае с  $\beta$ -гладкомышечным ТМ.

Таким образом, для мутантного  $\alpha$ -скелетного ТМ в присутствии MgADP или MgAMP-PNP сдвиг тяжей ТМ к периферии тонкой нити сопровождается увеличением, а не уменьшением количества включенных мономеров актина. Для мутантного  $\beta$ -гладкомышечного ТМ,

вышеупомянутая взаимозависимость, по-видимому, нарушается на всех стадиях цикла. В частности, когда ТМ смещается к центру тонкой нити в состояниях АМ и АМ<sup>^</sup>·ADP, относительное количество включенных мономеров актина уменьшается или остается неизменным, а не растет. По-видимому, мутация Gly126Arg может нарушить характер и порядок согласованных конформационных перестроек, происходящих в комплексе F-актин-ТМ-S1 в АТФазном цикле, как это было обнаружено ранее в экспериментах с ТМ с мутацией Glu54Lys [Borovikov et al., 2011].

Считается, что молекула тропомиозина оборачивается суперспиралью вокруг нитей актина и образует 14 псевдо-повторов из 19-20 остатков, разделенных на 7 пар  $\alpha$ - и  $\beta$ -зон. Эти зоны могут выступать в качестве альтернативных 7-кратных участков для сайтов специфического связывания актина в различных конформационных состояниях регулируемой тонкой нити. Так как участок ~20-остатков между  $\alpha$ - и  $\beta$ -зон соответствует повороту на  $\sim 90^\circ$  биспиральной суперспирали, то было предположено, что может возникать сдвиг ТМ вызванный связыванием  $\text{Ca}^{2+}$  и головок миозина с регулируемой тонкой нитью [Gordon et al., 2000]. Недавно, с помощью электронной микроскопии и метода компьютерного моделирования было предположено, что между тропомиозином и актином в волокнах без тропонина могут возникать около 30 солевых мостиков, которые, как считается, приводят к сравнительно сильным взаимодействиям между этими белками [Lehman et al., 2013]. В отличие от этого, в присутствии миозина образуются лишь 11 солевых мостиков. Кроме того, ТМ электростатически связывается с миозином, в результате чего появляется 16 других потенциальных солевых мостиков [Behrmann et al., 2012]. Важность этих взаимодействий подтверждается тем, что некоторые замены аминокислотных остатков в ТМ, участвующих в электростатических взаимодействиях с актином связаны с рядом

заболеваний человека [Marston et al., 2012; D.F. Wieczorek et al., 2008]. Было установлено, что эти точечные мутации могут изменить положение ТМ на тонкой нити, а также конформационные и функциональные состояния актина и миозина [Rysev et al., 2012; Borovikov et al., 2011; Borovikov et al., 2009]. Основываясь на этих фактах, мы предполагаем, что позиция ТМ нитей на поверхности тонкой нити определяет функциональное состояние F-актина в мышечных волокнах (рис. 14 и 16) через электростатические взаимодействия ТМ с актина и миозином. Таким образом, в волокнах без миозина и тропонина цепи ТМ расположены между блокирующей и закрытой позициями [Lehman et al., 2013], поэтому включается лишь часть мономеров актина (рис. 16). В отличие от этого, связывание S1 с F-актином сдвигает ТМ нити к центру нити (в открытое положение), и это изменяет характер электростатического взаимодействия между ТМ и актином и индуцирует появление электростатических взаимодействий ТМ с миозином [Behrmann et al., 2012], которое сопровождается увеличением относительного количества включенных мономеров актина.

Вполне вероятно, что точечные мутации в молекуле ТМ изменяют сайты, ответственные за связывание ТМ с актином и за структурные изменения миозина и актином в АТФазном цикле. При этом характер электростатического взаимодействия ТМ с F-актином и миозином может зависеть не только от позиции тяжей ТМ на поверхности тонкой нити и от направления их движения, но и от последовательности конформационных изменений в актомиозине во время АТФазного цикла [Borovikov et al., 2011]. Если это предположение верно, то модификация структуры ТМ может привести к изменению характера электростатических взаимодействий между ТМ и F-актином и миозином в процессе сдвига, которые могут повлиять на позицию ТМ и амплитуду его движения и изменить эффективность работы поперечных мостиков

миозина [Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2009; 2011]. Действительно, наши данные показывают, что мутация Gly126Arg меняет картину движения ТМ нитей во время АТФазного цикла (рис. 15).

Как известно в  $\alpha$ -спиральной цепи ТМ есть периодичные повторы через каждые семь аминокислотных остатков (аминокислоты обозначаются a-g), необходимых для создания характерной структуры "knobs into holes" («холмы во впадинах») на границе двух примыкающих  $\alpha$ -спиралей [Crick, 1953; McLachlan, 1975]. e и g аминокислотные остатки часто противоположно заряжены и стабилизируют суперспиральную структуру через межцепочечные электростатические взаимодействия. Неканонический Gly126 остаток находится в положении g; тем не менее, он не заряжен и, следовательно, может вызвать локальную дестабилизацию суперспирали [Nevzorov et al., 2011]. Замещение Gly126 на Arg может приводить к образованию нового солевого мостика через противоположные заряды аминокислотных остатков, вызванные мутацией (незаряженный остаток замещен на положительно заряженный). Эта замена может вызвать локальное изменение в конформации ТМ (например, это может вызвать локальную деформацию ТМ молекулы), которое может быть причиной структурных изменений регуляции ТМ.

Таким образом, применение реконструированных мышечных волокон позволило нам исследовать влияние мутации Gly126Arg на положение  $\alpha$ -скелетного и  $\beta$ -гладкомышечного тропомиозинов и мономеров актина, и на гибкость ТМ и F-актина в цикле гидролиза АТФ. Было показано, что нуклеотиды, действующие через миозиновый мотор, изменяют структурное состояние актина и ТМ, и могут нарушить равновесное состояние комплекса F-актин-ТМ-S1, стимулируя переход всех компонентов этого ансамбля (актина, миозина и ТМ) к другому состоянию и таким образом, сдвинуть состояние ансамбля в целом к

другому равновесному состоянию. Обе группы представленных здесь данных (рис. 14 и 16), и ранее полученные нами данные [Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2009; Borovikov et al., 2011; Borovikov et al., 2009], показывают, что мутация Gly126Arg оказывает влияние на позицию ТМ и структурное состояние актина в АТФазном цикле. Характер этого влияния был противоположен тому, который вызывали мутации Glu54Lys, Glu40Lys и Glu117Lys. Таким образом, мутации, которые нарушают солевой мостик (мутации Glu54Lys, Glu40Lys и Glu117Lys) сдвигают ТМ в сторону закрытого положения и уменьшают число включенных мономеров актина во время АТФазного цикла, тогда как мутация Gly126Arg сдвигает ТМ к центру тонкой нити (в открытое положение), и увеличивает количество включенных мономеров актина (на рис. 14 и 16). Вполне вероятно, что изменения электростатического поля ТМ, вызванные этими мутациями может изменить позицию ТМ на актиновых нитях и таким способом оказать влияние на характер взаимодействия тропомиозина с актином и миозином в АТФазном цикле.

Таким образом замена Gly126 на Arg в  $\alpha$ -тропомиозине скелетных мышц и в  $\beta$  тропомиозине гладких мышц заметно увеличивает жесткость С-концевого участка тропомиозина. При смещении тропомиозина к центру нити в присутствии головок миозина значительно усиливается кооперативное включение мономеров актина.

### **3.2. Влияние мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в $\alpha$ -ТМ на структурное состояние актина, $\alpha$ -тропомиозина и субфрагмента-1 миозина при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне.**

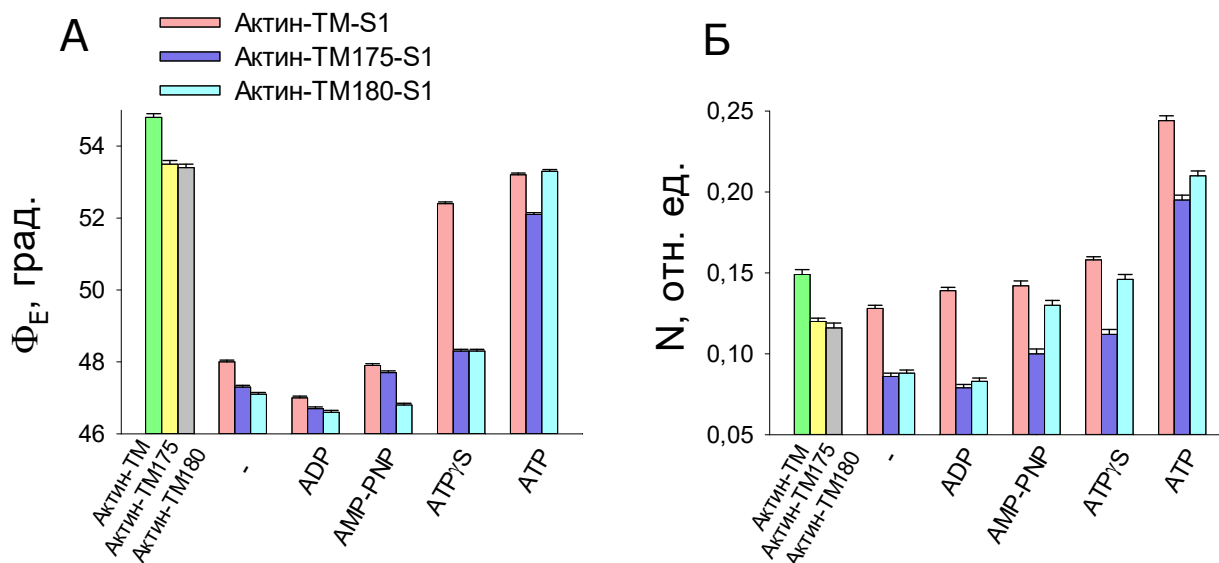
С целью исследования влияния мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном  $\alpha$ -ТМ человека на ориентацию ТМ на актиновых нитях рекомбинантные  $\alpha$ -ТМ дикого типа и мутантных форм были

специфически модифицированы флуоресцентной меткой 5-IAF по Cys190 и связаны с актином мышечного волокна. В более ранних работах было установлено, что модификация не оказывает существенного влияния на структуру и функцию тропомиозина [Borovikov et al., 2009a]. В соответствии с данными, опубликованными ранее [Borovikov et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b], включение 5-IAF-меченого рекомбинантного Ala-Ser- $\alpha$ -тропомиозина (TM-AF) в теневые волокна вызывает появление анизотропии поляризованной флуоресценции. Значения  $P_{||}$  ниже соответствующих значений  $P_{\perp}$ , и, следовательно, диполи 5-IAF ориентированы преимущественно перпендикулярно оси волокна (табл. 5). Мутации Asp175Asn и Glu180Gly уменьшают разницу между  $P_{\perp}$  и  $P_{||}$  (табл. 1), что указывает на то, что конформационные состояния тропомиозинов дикого типа и мутантных форм различны. Установлено, что угол излучения WT-TM-AF  $\Phi_E$  близок к  $55^\circ$  (рис. 17А), а количество хаотически расположенных зондов  $N$  не превышает 0,15 (рис. 17Б).

**Таблица 5.** Влияние мутаций, связанных с ГКМ на параметры  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  поляризованной флуоресценции TM-AF в отсутствие и присутствии нуклеотидов (нукл.) и S1. n – количество волокон в эксперименте. SEM – стандартная ошибка среднего значения.

| S1 | Нукл.   | WT-TM |                                |                            | Asp175Asn |                                |                            | Glu180Gly |                                |                            |
|----|---------|-------|--------------------------------|----------------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
|    |         | n     | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ | n         | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ | n         | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
| -  | -       | 9     | 0.074±0.001                    | 0.182±0.002                | 10        | 0.080±0.001                    | 0.149±0.002                | 11        | 0.093±0.001                    | 0.133±0.002                |
| +  | -       | 7     | 0.064±0.002                    | 0.174±0.002                | 10        | 0.050±0.002                    | 0.156±0.002                | 11        | 0.053±0.002                    | 0.157±0.002                |
| +  | ADP     | 7     | 0.075±0.003                    | 0.175±0.001                | 9         | 0.054±0.003                    | 0.147±0.001                | 10        | 0.060±0.003                    | 0.145±0.001                |
| +  | AMP-PNP | 7     | 0.075±0.003                    | 0.158±0.002                | 9         | 0.063±0.003                    | 0.142±0.001                | 10        | 0.119±0.003                    | 0.163±0.001                |
| +  | ATPγS   | 6     | 0.092±0.003                    | 0.158±0.002                | 9         | 0.091±0.003                    | 0.137±0.002                | 9         | 0.124±0.003                    | 0.145±0.002                |
| +  | ATP     | 6     | 0.143±0.003                    | 0.183±0.002                | 7         | 0.128±0.003                    | 0.158±0.002                | 7         | 0.158±0.003                    | 0.143±0.002                |

## TM-AF



**Рисунок 17.** Значения параметров поляризованной флуоресценции ( $\Phi_E$  (А) и  $N$  (Б)) 5-IAF, связанного с Cys190 ТМ дикого типа, Asp175Asn и Glu180Gly мутантных ТМ в теневых мышечных волокнах при имитации различных стадий цикла гидролиза АТФ. Угол  $\Phi_E$  дан с поправкой на вращение мономеров актина;  $N$  – относительное количество хаотически расположенных зондов. Столбики в каждой группе представляют данные для теневых волокон, содержащих ТМ дикого типа, ТМ с мутацией Asp175Asn или ТМ с мутацией Glu180Gly, соответственно. Значения  $\Phi_E$  и  $N$  существенно изменяются под действием нуклеотидов ( $p < 0,05$ ). Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения.

Молекулы ТМ присоединяются друг к другу, образуя непрерывные тяжи вдоль всей длины F-актина, и обладают способностью азимутально сдвигаться относительно актина [Galinska-Rakoczy et al., 2008]. Связанный флуоресцентный зонд будет также сдвигаться в комплексе с белком [Borovikov et al., 2009a]. Движение зонда к центру тонкой нити (уменьшение угла  $\Phi_E$ ) может быть интерпретировано как следствие сдвига ТМ в открытую позицию [Galinska-Rakoczy et al., 2008]. Движение зонда по направлению к периферии тонкой нити (увеличение угла  $\Phi_E$ ) (рис. 17А) отражает смещение тяжей ТМ в сторону блокирующей позиции [Borovikov et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b]. В соответствии с рис. 17А, в отсутствие S1, мутации Asp175Asn и



Glu180Gly вызывают снижение  $\Phi_E$  на  $1,3^\circ$  и  $1,4^\circ$ , соответственно, по сравнению с ТМ дикого типа ( $p < 0,05$ ). Таким образом, обе мутации сдвигают тяжи ТМ по направлению к центру тонкой нити (к открытой позиции). В соответствии с рис. 17, переход от блокирующей позиции сопровождается изменением подвижности области ТМ, содержащей остаток Cys190. Для обеих мутаций значение  $N$  меньше в среднем на 20% (рис. 17Б). Поскольку  $N$  характеризует количество хаотически расположенных зондов, связанных с Cys190, уменьшение этого значения может указывать на увеличение жесткости ТМ области вокруг остатка Cys190 [Borovikov et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b]. Известно, что мутации Asp175Asn и Glu180Gly происходят в области взаимодействия ТМ с тропонином и связаны с изменением отрицательного заряда на нейтральный [Tobacman 1996]. Это локально дестабилизирует структуру суперспирали ТМ и слабо повышает её гибкость в области аминокислотных замен [Golitsina et al., 1997]. Однако, как следует из рисунка 17Б, обе эти мутации уменьшают гибкость С-концевой области ТМ.

Связывание S1 с F-актином-ТМ в мышечном волокне снижает значение  $\Phi_E$  на  $6,8^\circ$  ( $p < 0,05$ ) для ТМ дикого типа (на рис. 17А). Это значит, что S1 сдвигает нити ТМ дикого типа к открытой позиции. Такой вывод хорошо согласуется с данными по смещению нативного ТМ [Galinska-Rakoczy et al., 2008] и рекомбинантного ТМ дикого типа [Borovikov et al., 2009a]. Для ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly значение  $\Phi_E$  после связывания S1 уменьшалось на  $0,7^\circ$  и  $0,9^\circ$  ( $p < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с ТМ-WT что указывает на то, что обе мутации увеличивают вызванные миозином движения тяжа ТМ в направлении к открытой позиции, которые могли бы способствовать усилению связывания поперечных мостиков с актином.

Значение  $N$  для ТМ дикого типа уменьшается в присутствии S1 на 15%, с 0,149 отн. ед. до 0,128 отн. ед. ( $p < 0,05$ ) (рис. 17Б). Поскольку связывание поперечного мостика с актином делает связь ТМ с актином сильнее, [Chalovich 1992], возможно, что снижение значений  $N$  указывает на повышенное сродство области Cys190 с актином для ТМ дикого типа в присутствии S1 [Borovikov et al., 2009a]. Обе мутации усиливают этот эффект. Значения  $N$  меньше в среднем на 30% (рис. 17Б). Так как значения  $N$  для обоих мутантных ТМ меньше по сравнению с ТМ дикого типа, можно предположить, что мутации Asp175Asn и Glu180Gly усиливают связывание С-концевой области ТМ, содержащей Cys190, с актином, в результате увеличения стереоспецифического согласования между молекулами актина и миозина [Borovikov et al., 2009a]. Таким образом, мутации в ТМ, связанные с ГКМ, скорее всего, увеличивают стереоспецифическое и гидрофобное взаимодействия между молекулами актина и миозина и, тем самым, повышают положительный аллостерический эффект ТМ на актине.

Изменения параметров флуоресценции ТМ-AF указывают на то, что позиция ТМ на актине и его сродство изменяются нуклеотид-зависимым образом. В соответствии с рис. 17, переход от состояния  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  к состоянию  $AM$  сопровождается многоступенчатым уменьшением  $\Phi_E$  и уменьшением значений  $N$ , показывая постепенное смещение нитей ТМ к открытой позиции [Galinska-Rakoczy et al., 2008], и делает связывание области ТМ, содержащей Cys190, с актином сильнее, в то время как S1 переходит постепенно от слабых к сильным формам связывания.

При переходе от состояния  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  к состоянию  $AM$  значения  $\Phi_E$  уменьшаются с  $53,2^\circ$  до  $48,0^\circ$  для ТМ дикого типа, а для ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly с  $52,1^\circ$  до  $47,3^\circ$  и с  $53,3^\circ$  до  $47,1^\circ$ , соответственно (рис. 17А). Так как снижение значения  $\Phi_E$  коррелирует с

движением тяжей ТМ к центру тонкой нити [Borovikov et al., 2009a], наши данные указывают на то, что этот переход сдвигает нити ТМ к открытой позиции. Обе мутации Asp175Asn и Glu180Gly усиливают этот эффект. Максимальный эффект для обеих мутаций наблюдался при моделировании  $AM^{**}\cdot ATP$  состояния, а минимальный при моделировании  $AM^*\cdot ADP$  и  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$ , для мутаций Asp175Asn и Glu180Gly, соответственно (рис. 17А). Изменения значений  $\Phi_E$  для ТМ дикого типа, ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly при переходе от состояния  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$  к состоянию АМ составили  $5,2^\circ$ ,  $4,8^\circ$  и  $6,2^\circ$ , соответственно, демонстрируя увеличение амплитуды движения ТМ нитей для мутации Glu180Gly, что может указывать на увеличение эффективности работы поперечных мостиков.

Следует отметить, что значения  $\Phi_E$  для ТМ с мутацией Glu180Gly при имитации  $AM^*\cdot ADP$  и АМ близки к значению этой величины для ТМ дикого типа при имитации  $AM^\wedge\cdot ADP$ , а при имитации  $AM^{**}\cdot ATP$  это значение близко к  $\Phi_E$  для ТМ дикого типа при имитации  $AM^*\cdot ADP$ . Для ТМ с мутацией Asp175Asn при имитации  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$  и  $AM^{**}\cdot ATP$  значения  $\Phi_E$  были близки к таковым для ТМ дикого типа при имитации  $AM^{**}\cdot ATP$  и  $AM^*\cdot ADP$  состояний, соответственно. Это указывает на то, что мутации сдвигают ТМ в положение, типичное для состояний сильного связывания при имитации большинства промежуточных состояний цикла гидролиза АТФ. Для мутации Asp175Asn этот эффект был меньше (рис. 17А). Согласно рисунку 17Б сродство С-конца ТМ с актином в течение всего АТФазного цикла, по-видимому, увеличивается для обоих мутантных ТМ по сравнению с ТМ дикого типа. В частности, при имитации состояний АМ и  $AM^\wedge\cdot ADP$  стадий значение N уменьшается в среднем на 30-35% для обеих мутаций. Тогда как при имитации состояний  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$  и  $AM^*\cdot АТФ$ , изменение этого параметра меньше для мутации Glu180Gly, чем для Asp175Asn (рис. 17Б). Это означает, что

мутации Asp175Asn и Glu180Gly оказывают различное влияние на взаимодействие ТМ с актином в течение АТФазного цикла. Мутация Asp175Asn в ТМ оказывает более слабое влияние на сильное взаимодействие нитей ТМ с актином, чем мутация Glu180Gly (рис. 17Б). Известно, что ТМ увеличивает АТФазную активность актомиозина через миозин-индуцированное движение ТМ в открытое положение [Galinska-Rakoczy et al., 2008]; это увеличивает стереоспецифическое и гидрофобное взаимодействие между молекулами актина и миозина, и, таким образом, повышает способность актина активировать АТФазу миозина (положительное аллостерическое действие ТМ-на актине [Kawai, Ishiwata 2006]). Так как сильное связывание ТМ с актином может быть результатом увеличения области стереоспецифического и гидрофобного взаимодействия между молекулами актина и миозина [Borovikov et al., 2009a], которое может усилить способность актина активировать АТФазу миозина, можно предположить, что положительное аллостерическое действие ТМ с мутацией Glu180Gly на актин-активируемую АТФазу S1 выше, чем у ТМ с мутацией Asp175Asn [Mirza et al., 2005].

Замена Asp175Asn происходит в позиции *g*, а мутация Glu180Gly – в позиции *e* гептоповторов, участвующих в межцепочечном и внутриспиральном электростатическом взаимодействии в молекуле ТМ. Нарушение солевых мостиков вследствие изменения заряда аминокислотных остатков, вызванное мутацией, может вызывать локальное изменение в конформации тропомиозина и являться причиной изменения переключения между различными состояниями тонких нитей.

Известно, что молекула ТМ имеет 14 псевдо-повторов по 19-20 остатков, разделенных на семь пар  $\alpha$ - и  $\beta$ -зон. Эти зоны могут участвовать попеременно в специфическом взаимодействии с семью

мономерами актина в различных конформационных состояниях тонкого филамента.  $\alpha$ - и  $\beta$ -зоны чередуются через ~20-остатков, что соответствует повороту суперспирали ТМ на  $\sim 90^\circ$ , что даёт возможность молекуле ТМ смещаться на актине при связывании  $\text{Ca}^{2+}$  и головок миозина с тонкой нитью [Mak, Smillie 1981].

Характер связывания  $\alpha$ - и  $\beta$ -зон с F-актином, определяемый смещением ТМ может изменить не только положение ТМ тяжей и направление их движения, но и последовательность конформационных изменений в актомиозине в АТФазном цикле. Если это предположение верно, модификация структуры ТМ может исказить картину связывания  $\alpha$ - и  $\beta$ -зон с F-актином в процессе сдвига ТМ, что может повлиять на амплитуду движения ТМ и изменять эффективность работы поперечных мостиков миозина. Ранее было показано, что в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  ТН увеличивает амплитуду движения ТМ в сторону центра тонкой нити и усиливает образование сильных форм связывания головки миозина с актином [Borovikov et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b]. Аналогичное увеличение амплитуды движения ТМ в направлении открытой позиции наблюдалось для Тм с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly (рис. 14А). В противоположность этому, в результате мутаций  $\alpha$ -тропомиозина Glu40Lys и Glu54Lys, связанных с ДКМ ингибируются стереоспецифические и гидрофобные взаимодействия между актином и миозином и образование сильных форм связывания за счёт сдвига ТМ тяжа в направлении периферии тонкой нити (отрицательное аллостерическое влияние ТМ); в процессе АТФазного цикла амплитуда движения тропомиозина снижается и на некоторых стадиях цикла ТМ может даже смещаться в противоположную сторону [Borovikov et al., 2009b]. Это означает, что определенная последовательность конформационных изменений в актомиозине во время АТФазного цикла

зависит от способности ТМ тяжей к перемещению на тонкой нити, демонстрируя определенный характер взаимодействия с актином.

Представленные данные (рис. 17) и результаты, полученные ранее [Borovikov et al., 2009a; Y.S. Borovikov et al., 2009b] представляют убедительные доказательства предположения о том, что регуляция тропомиозином актомиозинового взаимодействия реализуется не только простым смещением ТМ тяжей из блокирующей позиции в открытую, но и аллостерически, изменением конформационного состояния актомиозина. Вполне возможно, что в цикле гидролиза АТФ, смещение тяжей нативного ТМ или ТМ дикого типа от периферии к центру на тонкой нити вызванное миозином усиливает взаимодействие между актином и миозином [Borovikov et al., 2009a]. Мутации Asp175Asn и Glu180Gly, связанные с ГКМ, усиливают этот эффект путем смещения тяжа ТМ ближе к центру тонкой нити в течение АТФазного цикла (рис. 17А) и делают связывание ТМ с актином сильнее (на рис. 17Б), тем самым повышая производительность работы поперечных мостиков. Вполне вероятно, что увеличение  $\text{Ca}^{2+}$  чувствительности миофиламентов, вызванное этими мутациями, не только связано с нарушением взаимодействия ТnТ с ТМ, но и с перемещением тяжей ТМ в сторону открытой позиции, что влечет за собой повышение популяции поперечных мостиков, сильно связанных с актином в течение цикла гидролиза АТФ.

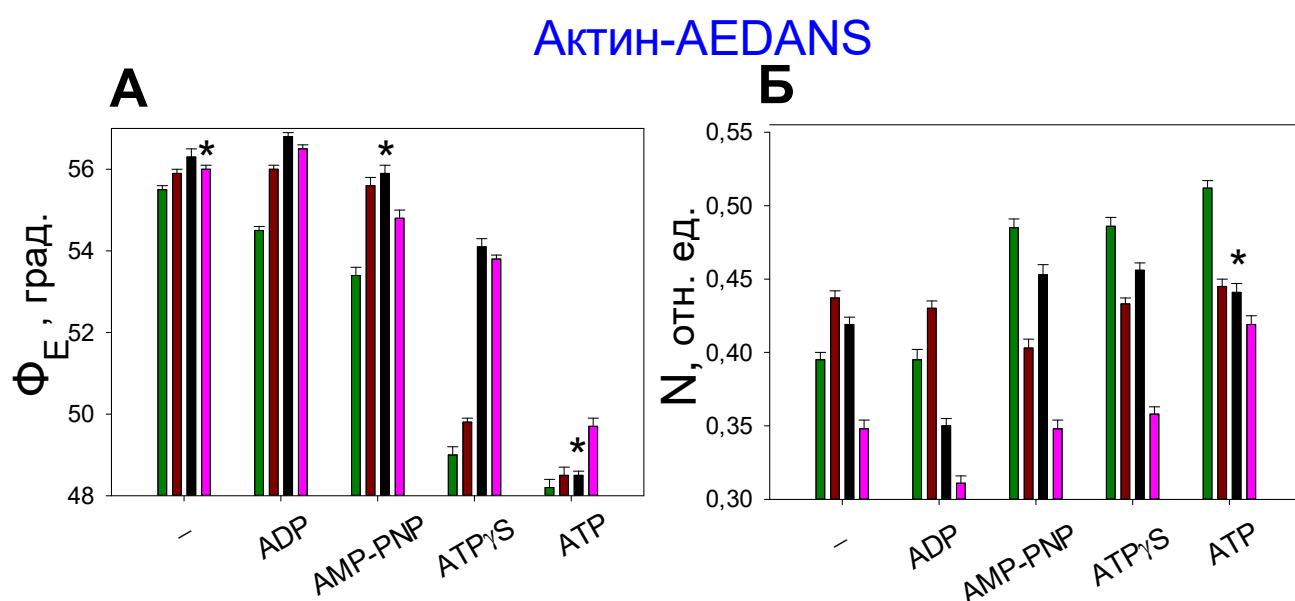
Теперь рассмотрим влияние мутаций Asp175Asn и Glu180Gly в ТМ на структурное состояние актина. Для этого актин был модифицирован по Cys374 флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS. В соответствии с ранее опубликованными данными [Borovikov et al., 2009a, Borovikov et al., 2009b], включение актин-AEDANS в волокна вызывают появление поляризованной флуоресценции. Значения  $P_{\parallel}$  были ниже, чем  $P_{\perp}$ , для

AEDANS-актина (табл. 6), что свидетельствует о преимущественной ориентации флуорофоров перпендикулярно мышечному волокну.

**Таблица 6.** Влияние нуклеотидов (нукл.) на параметры поляризованной флуоресценции ( $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ ) актин-AEDANS в теневых волокнах в отсутствие и в присутствии WT-TM, Asp175Asn и Glu180Gly TM. Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Asp175Asn или Glu180Gly. В экспериментах использовалось по 5-8 волокон. SEM – стандартная ошибка среднего значения.

| Нукл.          | S1 | WT-TM | Asp175Asn | Glu180Gly | Актин-AEDANS                   |                            |
|----------------|----|-------|-----------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
|                |    |       |           |           | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
| -              | +  | -     | -         | -         | 0.144±0.003                    | 0.297±0.002                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.150±0.004                    | 0.272±0.003                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.111±0.003                    | 0.251±0.002                |
|                | +  | -     | -         | +         | *0.141±0.004                   | *0.273±0.003               |
| ADP            | +  | -     | -         | -         | 0.150±0.004                    | 0.277±0.003                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.160±0.004                    | 0.266±0.003                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.130±0.004                    | *0.264±0.003               |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.093±0.004                    | 0.251±0.003                |
| ANP-PNP        | +  | -     | -         | -         | 0.211±0.005                    | 0.275±0.003                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.151±0.004                    | 0.252±0.003                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.120±0.004                    | 0.228±0.003                |
|                | +  | -     | -         | +         | *0.159±0.004                   | 0.272±0.003                |
| ATP $\gamma$ S | +  | -     | -         | -         | 0.299±0.003                    | 0.190±0.002                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.263±0.004                    | 0.144±0.003                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.161±0.004                    | 0.200±0.003                |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.187±0.004                    | 0.243±0.003                |
| ATP            | +  | -     | -         | -         | 0.315±0.005                    | 0.214±0.006                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.289±0.003                    | 0.126±0.002                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.271±0.003                    | *0.126±0.002               |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.295±0.003                    | 0.117±0.002                |

Для количественной оценки изменений в ориентации зонда 1,5-IAEDANS мы использовали модель-зависимый метод анализа (см. Материалы и методы). Оказалось, что в отсутствие нуклеотида и тропомиозина теневые мышечные волокна содержат 40-45% (рис. 18Б) неориентированных флуорофоров и 55-60% ориентированных зондов (рис. 18А).



**Рисунок 18.** Влияние ТМ дикого типа (WT-TM), и ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly на параметры поляризованной флуоресценции ( $\Phi_E$  (А) и N (Б)) актин-AEDANS в теневых мышечных волокнах при имитации различных стадий цикла гидролиза АТФ.  $\Phi_E$  угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей; N количество хаотически ориентированных зондов. Столбики в каждой группе представляют (слева направо) данные для теневых волокон в отсутствие ТМ, и в присутствии WT-TM, ТМ с мутациями Glu180Gly или Asp175Asn, соответственно. Значения  $\Phi_E$  и N изменяются в присутствии нуклеотидов ( $p < 0.05$ ). Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Asp175Asn или Glu180Gly.

Нуклеотиды в отсутствие или в присутствии ТМ дикого типа, или ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly оказывали существенное влияние на параметры ( $P_{||}$ ,  $P_{\perp}$ ,  $\Phi_E$  и N) поляризованной флуоресценции актин-AEDANS (табл. 6 и рис. 18), демонстрируя конформационные изменения субдомена-1 актина [Borovikov et al., 1999, Borejdo et al., 2006].



В соответствии с рис. 18, моделирование перехода мышечного волокна из состояния  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  в состояние  $AM$ , в отсутствие  $TM$ , вызывает увеличение значения  $\Phi_E$  с  $48,2^\circ$  до  $55,5^\circ$ , а также уменьшение значений  $N$  с 0,512 до 0,395, соответственно.

Теневые волокна содержат около 50% экзогенного актина [Khoroshev et al., 1991; Khoroshev et al., 2000]. Актиновые нити, реконструированные из G-актина, не отличаются от нативных нитей. Длина актиновых нитей существенно не изменяется после включения G-актина в теневые волокна [Khoroshev et al., 1991, Khoroshev et al., 2000]. Кроме того, поляризованная флуоресценция FITC-phalloidin и эндогенных тонких нитей меченых 1,5-IAEDANS, была близкой к той, что характерна для нативных нитей и реконструированных путем включения экзогенного G-актина меченого 1,5-IAEDANS [Borovikov et al., 2000]. Следовательно, в мышечных волокнах отсутствовала заметная дезорганизация актиновых нитей после введения G-актина и реконструкции их в теневых мышечных волокнах. Полимеризация G-актина, меченого 1,5-IAEDANS, в теневых мышечных волокнах вызывает формирование новых и/или удлинения существующих актиновых филаментов [Borovikov et al., 2000; Khoroshev et al., 1991; Khoroshev et al., 2000; Fujita et al., 1996].

Так как флуоресцентные зонды жестко связаны с молекулами белка [Borovikov et al., 1999, Borejdo et al., 2006], увеличение угла  $\Phi_E$  (вращение зонда по направлению к периферии тонкой нити) можно интерпретировать как вращение всего субдомена-1 актина к периферии тонкой нити. Аналогично уменьшение  $\Phi_E$ , (движение зонда по направлению к центру тонкой нити) – движение субдомена-1 в противоположном направлении (к центру нити) [Borovikov et al., 2000; Khoroshev et al., 2000].

Уменьшение значений  $N$  для актин-AEDANS можно интерпретировать как уменьшение подвижности субдомена-1 актина. Таким же образом, увеличение  $N$  можно рассматривать как свидетельство увеличения мобильности субдомена-1 актина [Borovikov et al., 2009a, Borovikov et al., 2009b]. Следовательно, можно предположить, что конформационные изменения актина, происходящие при переходе из  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  в  $AM$  стадию (рис. 18), индуцируют уменьшение подвижности актинового субдомена-1 и его вращение в направлении периферии тонкой нити и увеличение относительного количества включенных мономеров актина.

В соответствии с данными опубликованными ранее [Borovikov et al., 2009c], связывание рекомбинантного Ala-Ser  $\alpha$ -тропомиозина дикого типа (WT-TM) с актином в теневом мышечном волокне оказывает заметное влияние на структурное состояние субдомена-1 актина (рис. 18), при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ. Так, в присутствии  $MgADP$  и  $MgAMP$ -PNP, подвижность и пространственное расположение субдомена-1 актина оказались близкими к наблюдаемым в состояниях  $AM$  и  $AM^{\wedge} \cdot ADP$  в отсутствие ТМ, т.е. при формировании состояния сильного связывания актомиозина. В отличие от этого,  $MgATP\gamma S$  индуцирует переход к более слабым взаимодействиям, близким к состоянию  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ .

При переходе от состояния  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  к состоянию  $AM$ , WT-TM вызывал увеличение угла  $\Phi_E$  с  $48,5^\circ$  до  $55,9^\circ$ , показывая, что в присутствии WT-TM амплитуды вращения субдомена-1 актина увеличивается (на 2%).

Тропомиозины с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly индуцировали дальнейшее увеличение значений  $\Phi_E$  и уменьшение значений  $N$  для зонда, связанного с субдоменом-1 актина при переходе из  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  в

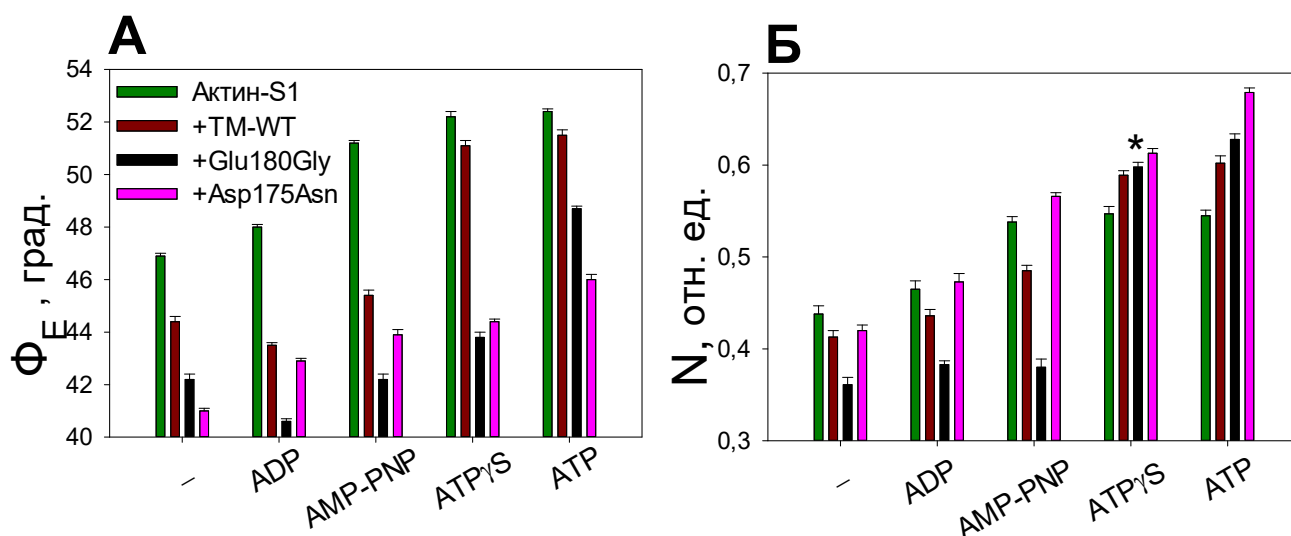
АМ состояние, причём эффект мутации Glu180Gly был выражен сильнее, чем для Asp175Asn (рис. 18).

Рассмотрим влияние мутаций ТМ, связанных с ГКМ на структурное состояние головок миозина и на характер изменений работы актомиозинового мотора. Как и в предыдущих экспериментах [Borovikov et al., 2009a, Borovikov et al., 2009b], связывание S1-AEDANS с F-актином в теневых волокнах вызывают появление поляризованной флуоресценции. Значения  $P_{||}$  были выше соответствующих значений  $P_{\perp}$ , для S1-AEDANS (табл. 7), что свидетельствует о высокой упорядоченности зондов. По нашим данным (рис. 19) в отсутствие нуклеотида и тропомиозина теневые мышечные волокна содержат 40-45% (рис. 19Б) неориентированных зондов и 55-60% ориентированных зондов (рис. 19А).

**Таблица 7.** Влияние нуклеотидов (нукл.) на параметры поляризованной флуоресценции S1-AEDANS  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  теневых волокон в отсутствие и в присутствии WT-TM, Asp175Asn и Glu180Gly TM. Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Asp175Asn или Glu180Gly. В экспериментах использовалось по 5-8 волокон. SEM – стандартная ошибка среднего значения.

| Нукл.          | S1 | WT-TM | Asp175Asn | Glu180Gly | S1-AEDANS                      |                            |
|----------------|----|-------|-----------|-----------|--------------------------------|----------------------------|
|                |    |       |           |           | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
| -              | +  | -     | -         | -         | 0.333±0.003                    | 0.104±0.004                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.376±0.001                    | 0.088±0.001                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.459±0.001                    | 0.022±0.001                |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.419±0.001                    | 0.009±0.001                |
| ADP            | +  | -     | -         | -         | 0.322±0.001                    | 0.154±0.003                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.395±0.001                    | 0.073±0.003                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.404±0.001                    | 0.009±0.003                |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.451±0.001                    | 0.001±0.003                |
| ANP-PNP        | +  | -     | -         | -         | 0.291±0.001                    | 0.248±0.003                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.359±0.001                    | 0.148±0.004                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.411±0.001                    | 0.180±0.003                |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.418±0.001                    | 0.019±0.004                |
| ATP $\gamma$ S | +  | -     | -         | -         | 0.244±0.003                    | 0.219±0.004                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.297±0.003                    | 0.264±0.003                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.390±0.003                    | 0.197±0.003                |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.356±0.003                    | *0.269±0.003               |
| ATP            | +  | -     | -         | -         | 0.277±0.002                    | 0.259±0.003                |
|                | +  | +     | -         | -         | 0.311±0.001                    | 0.267±0.001                |
|                | +  | -     | +         | -         | 0.376±0.001                    | 0.251±0.001                |
|                | +  | -     | -         | +         | 0.345±0.001                    | 0.244±0.001                |
|                | +  | -     | -         | -         |                                |                            |

## S1-AEDANS



**Рисунок 19.** Влияние ТМ дикого типа (WT-TM), мутантных Asp175Asn и Glu180Gly ТМ на параметры  $\Phi_E$  (А) и  $N$  (Б) поляризованной флуоресценции AEDANS-S1 в теневых мышечных волокнах при имитации различных стадий цикла гидролиза АТФ.  $\Phi_E$  угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей;  $N$  количество хаотически ориентированных зондов. Столбики в каждой группе представляют (слева направо) данные для теневых волокон в отсутствие ТМ, и в присутствии WT-TM, ТМ с мутациями Glu180Gly или Asp175Asn, соответственно. Значения  $\Phi_E$  и  $N$  изменяются в присутствии нуклеотидов ( $p < 0.05$ ). Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения. Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Asp175Asn или Glu180Gly.

Нуклеотиды в отсутствие или в присутствии ТМ дикого типа, или ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly оказывали существенное влияние на параметры ( $P_{||}$ ,  $P_{\perp}$ ,  $\Phi_E$  и  $N$ ) поляризованной флуоресценции S1-AEDANS (Табл. 7 и рис. 19), демонстрируя конформационные изменения моторного домена миозина [Borovikov et al., 1999, Borejdo et al., 2006].

В соответствии с рис. 19, моделирование перехода мышечного волокна из состояния  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  в состояние  $AM$ , в отсутствие ТМ, вызывает снижение значения  $\Phi_E$  с  $52,4^\circ$  до  $46,9^\circ$ , а также уменьшение значений  $N$  с 0,545 до 0,413.

Мышечные волокна, содержащие миозиновые головки, модифицированные флуоресцентными зондами, способны генерировать силу [Nihei et al., 1974; Berger et al., 1996]. Интересно отметить, что

циклическая работа поперечных мостиков в ходе мышечного сокращения была впервые обнаружена с помощью метода поляризационной флуориметрии [Nihei et al., 1974, Berger et al., 1996]. Модификация Cys707 флуоресцентным зондом может ингибировать активность АТФазы миозина или S1 [Berger et al., 1996]. Влияние модификации S1 флуоресцентными метками на функциональные свойства головки миозина существенно зависит от типа зонда, метода модификации, используемого красителя, и производителя, синтезировавшего краситель. Мы использовали 1,5-IAEDANS, полученный компанией Molecular Probes и применяли метод, разработанный Борејдо и Путнам [Borejdo, Putnam et al., 1977]. В этом случае, актин-активируемая АТФазная активность S1-AEDANS уменьшилась не более, чем на 30-40% [Borovikov et al., 1991], а окрашенные головки миозина сохраняют способность формировать с актином сильные и слабые формы связывания [Borovikov et al., 2015].

Нуклеотиды и аналоги АТФ могут способствовать диссоциации S1 от актина. В наших экспериментах использовалась проточная камера, которая позволила удалить из мышечного волокна диссоциированный S1. Растворы, содержащие AMP-PNP, ATP $\gamma$ S и ATP вызывали уменьшение интенсивности флуоресценции S1-AEDANS, указывая на удаление несвязанных головок миозина из мышечных волокон. Было показано, что интенсивность флуоресценции уменьшалась и выходила на плато через 5-15 мин. В присутствии АДР или в отсутствие нуклеотидов, интенсивность флуоресценции мышечных волокон не изменялась, показывая, что S1 практически не диссоциирует от актина при этих условиях. Изучение содержания белка в ДСН-ПААГ показало, что в отсутствие нуклеотидов и в присутствии ADP, AMP-PNP, ATP $\gamma$ S и ATP молярное соотношение S1, связанного с актином в мышечных волокнах,

составляло 1:5 ( $\pm 2$ ), 1:5 ( $\pm 2$ ), 1:8 ( $\pm 2$ ), 1:12 ( $\pm 2$ ), и 1:14 ( $\pm 2$ ), соответственно.

Ранее было показано, что поляризованная флуоресценция S1-AEDANS не зависит от концентрации S1 в волокне в широком диапазоне соотношений миозина к актину от 1:3 до 1:20 [Andreev et al., 1995]. Результаты, представленные в работе, были получены при молярных соотношениях S1 и актина от 1:3 до 1:16 (см. Материалы и методы). Следовательно, в работе практически отсутствует погрешность измерения поляризованной флуоресценции, обусловленная не специфическим связыванием S1 с актином в мышечном волокне.

Так же, как и в предыдущих экспериментах, увеличение угла  $\Phi_E$  (вращение зонда по направлению к периферии тонкой нити) мы интерпретируем как наклон миозиновой головки (или SH1 спирали) к периферии тонкой нити. Аналогично уменьшение  $\Phi_E$ , (движение зонда по направлению к центру тонкой нити) отражает поворот головки миозина (или спирали SH1) в противоположном направлении (к центру нити).

Уменьшение значений  $N$  для S1-AEDANS отражают увеличение сродства S1 к актину. Таким же образом, увеличение  $N$  можно рассматривать как свидетельство снижения сродства S1 к актину [Borovikov et al., 2009a, Borovikov et al., 2009b]. На основе такой интерпретации, можно предположить, что конформационные изменения миозина, происходящие при переходе из  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  в  $AM$  состояние (рис. 19), индуцируют заметный наклон SH1 спирали миозина к тонкой нити и увеличение сродства S1 к актину (образование сильной формы связывания между S1 и актином).

В общепринятой модели актин-миозинового взаимодействия, описываемой Гивсом и Холмсом [Geeves, Holmes et al., 2005], основным структурным изменением при генерации усилия миозиновым

поперечным мостиком является закрытие большой щели между верхним 50 кДа доменом, содержащим АТФ-связывающий сайт и нижним 50 кДа доменом, содержащим актин-связывающий сайт, что приводит к изменению ориентации трех внешних  $\beta$ -складчатых слоёв ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ ) верхнего 50 кДа домена. Кроме того, движение этих  $\beta$ -слоёв тесно связано с движением спиралей SH1/SH2 и последующей передаче этих изменений к миозиновому "рычагу" [Rayment et al., 1993; Holmes 1997] и мономерам актина [Borovikov et al., 2004a; Borejdo et al., 2004; Prochniewicz et al., 2004].

Наши данные свидетельствуют о том, что закрытие большой щели между верхним и нижним 50 кДа доменами, индуцировано многоступенчатыми изменениями в конформациях S1 и актина, что приводит к постепенному наклону головок миозина (или SH1 спирали) по направлению к тонкой нити, увеличению количества сильных форм связывания S1 с актином, и иммобилизации субдомена-1 актина (или С-конца актина) из-за его сильного связывания с S1. Иммобилизация субдомена-1 актина при его сильном связывании с миозиновой головкой согласуется с данными Прочневича и соавторов [Prochniewicz et al., 2004], которые показали что переход от слабой к сильной форме связывания уменьшает динамический беспорядок (подвижность) в молекуле актина. Подобные изменения были обнаружены в ориентации и подвижности различных флуоресцентных меток, связанных с актином [Borovikov 1999; Borovikov et al., 2004b] и S1 [Borejdo et al., 2006; Borovikov 1999; Berger et al., 1996].

Известно, что ТМ увеличивает АТФазную активность актомиозина [Bremel et al., 1972; Lehrer et al., 1997] и силу, развиваемую мышечным волокном [Bing et al., 2000; Fujita et al., 2004], а также влияет на элементарные стадии АТФазного цикла поперечных мостиков [Fujita et al., 2004].



В соответствии с данными опубликованными ранее [Borovikov et al., 2009c], включение рекомбинантного Ala-Ser  $\alpha$ -тропомиозина дикого типа (WT-TM) в теневые мышечные волокна также оказывает заметное влияние на формирование сильных и слабых форм связывания S1 с актином, демонстрируя изменения в структурном состоянии моторного домена миозина (рис. 19), при моделировании различных промежуточных стадий цикла АТФазы. Так, в присутствии MgADP и MgAMP-PNP, подвижность S1 и пространственное расположение SH1 спирали миозина оказались близкими к наблюдаемым в состояниях AM и  $AM^{\wedge} \cdot ADP$  в отсутствие TM, т.е. при формировании состояния сильного связывания. В отличие от этого, MgATP $\gamma$ S индуцирует переход к более слабым взаимодействиям, близким к состоянию  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ . Максимальное влияние WT-TM оказывает на параметры  $\Phi_E$  и N при имитации  $AM^{\wedge} \cdot ADP$  и  $AM^* \cdot ATP$  состояний (рис. 18, 19), то есть, при имитации тех промежуточных состояний цикла АТФазы, при которых производится генерация силы актомиозином [Geeves, Holmes et al., 2005].

Важно отметить, что при имитации промежуточных состояний миозина с использованием нуклеотидов и АТФ-аналогов, каждое состояние, скорее всего, не является однородным, а состоит из нескольких различных субсостояний (промежуточных состояний) [Nesmelov et al., 2008]. Возможно, WT-TM увеличивает долю субсостояний сильного связывания в популяции актомиозина в отсутствие нуклеотидов и в присутствии MgADP и MgAMPPNP, и, наоборот, уменьшает эту долю в присутствии MgATP $\gamma$ S и MgATP [Borovikov et al., 2009a; Borovikov et al., 2009c] (рис. 19).

При переходе от  $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$  к AM состоянию, WT-TM вызывал уменьшение величины  $\Phi_E$  для AEDANS-S1 с 51,5° до 44,4°, показывая увеличение амплитуды наклона SH1 спирали миозина по направлению к

тонкой нити на 29%. Поскольку изменение в положении SH1 спирали, по-видимому, передаются миозиновому "рычагу", поворот которого играет ключевую роль в развитии силы [Geeves, Holmes et al., 2005], можно предположить, что одной из причин увеличения АТФазной активности актомиозина в присутствии ТМ, является увеличение размаха движения спирали SH1 миозина в ходе цикла АТФазы [Borovikov et al., 2009a]

Согласно современным представлениям участки сильного связывания с миозином расположены в малом домене актина [Milligan et al., 1996; Holmes et al., 2004]. Этот домен также участвует в связывании ТМ и в активации АТФазы S1 миозина [Pirani et al., 2006]. Поскольку WT-ТМ индуцирует дополнительный поворот субдомена-1 актина от центра к периферии тонкой нити (рис. 19), можно предположить, что усиление актин-активируемой АТФазы WT-ТМ-ом является результатом увеличения области стереоспецифических и гидрофобных взаимодействий (положительный аллостерический эффект ТМ на актин [Kawai, Ishiwata 2006]).

Считается, что регуляция ТМ актин-миозинового взаимодействия в цикле гидролиза АТФ, осуществляется смещением [Li et al., 2011] или «перекачиванием» [Holthauzen et al., 2004] тропомиозиновых нитей по поверхности тонкой нити. В соответствии с моделью трех состояний, регуляция актин-миозинового взаимодействия происходит посредством согласованных движений ТМ между тремя статистически предпочтительных (выгодных) позиций: блокирующей, закрытой и открытой [Maytum et al., 1999; McKillop, Geeves 1993]. Эти три структурных состояния находятся в быстром (мгновенном) равновесии друг с другом [Brenner, Chalovich 1999; Ishii, Lehrer 1987; Swartz et al., 1996], так что в каждом состоянии существует определенное распределение этих состояний [Pirani et al., 2005]. Вполне возможно, что

ТМ дикого типа может увеличить долю субсостояний сильных связываний в популяции S1, перемещаясь в открытую позицию [Borovikov et al., 2009b; Borovikov et al., 2011a].

При переходе из состояния  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$  в состояние AM, ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly индуцировали дальнейшее снижение значений N и  $\Phi_E$  для зондов, связанных с SH1 спиралью миозина, причём эффект мутации Glu180Gly был выражен сильнее, чем Asp175Asn (рис. 19), как и в случае с актином. Следует отметить, что значения  $\Phi_E$  и N для ТМ с мутациями Glu180Gly и Asp175Asn при имитации состояний  $AM^{\wedge}\cdot ADP$ ,  $AM^*\cdot ADP$ ,  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$  и  $AM^*\cdot ATP$  были близки к таковым для WT-ТМ в отсутствие нуклеотидов и в присутствии MgADP, MgANP-PNP и MgATP $\gamma$ S, соответственно. Это означает, что по сравнению с WT-ТМ, тропомиозины, содержащие мутации, связанные с ГKM (рис. 19) индуцируют конформационные состояния более сильных форм связывания S1 и актина при имитации всех промежуточных состояний цикла АТФазы.

Максимальный эффект мутантных ТМ был обнаружен при имитации AM,  $AM^{\wedge}\cdot ADP$  и  $AM^*\cdot ADP$  состояний (рис. 19A), участвующих в генерации силы актомиозиновым двигателем [Geeves, Holmes et al., 2005]. Так при имитации состояния  $AM^{\wedge}\cdot ADP$ , ТМ с мутациями Glu180Gly и Asp175Asn уменьшал значения угла  $\Phi_E$  для зондов, связанных с SH1 миозина на 2,9° и 0,6°, соответственно (рис. 19), указывая на то, что увеличение относительного количества головок миозина сильно связанных с актином в популяции актин-S1-ADP в присутствии ТМ с мутацией Glu180Gly больше, чем в присутствии ТМ с мутацией Asp175Asn.

Интересно, что даже при имитации  $AM^*\cdot ATP$  и  $AM^{**}\cdot ADP\cdot P_i$  состояний, мутации Glu180Gly и Asp175Asn увеличивают долю сильных форм связывания головки миозина с актином. Аналогичное увеличение

субсостояний сильного связывания в популяции поперечных мостиков было предположено для мышечных волокон сердца [F. Bai et al., 2010].

Увеличение количества сильно связанных поперечных мостиков также может увеличить скорость АТФазы актомиозина по сравнению с тропомиозином дикого типа [Wieczorek et al., 2008; Robinson et al., 2007; Mathur et al., 2011]. Кроме того, мышечные волокна, содержащие тропомиозин с мутацией Glu180Gly, показывают большее изометрическое натяжение, чем волокна с тропомиозином дикого типа [Sheehan et al., 2011; Bai et al., 2010; Prabhakar et al., 2001].

Как было отмечено выше, замены Glu180 на Gly и Asp175 на Asn разрушают солевой мостик, что может вызвать локальное изменение в конформации тропомиозина, что может вызвать изменения области связывания  $\alpha$ - и  $\beta$ -зон с F-актином. Вполне возможно, что движение мутантного ТМ дальше к центру тонкой нити является причиной изменений последовательности определённых конформационных изменений в актомиозине, в результате чего происходит увеличение относительного количества поперечных мостиков способных генерировать силу. Поскольку состояние сильного связывания головки миозина с актином может быть результатом увеличения области стереоспецифического и гидрофобного взаимодействий актиновых и миозиновых молекул [Fujita et al., 2004], которое может усиливать способность актина активировать миозиновую АТФазу, можно предположить, что положительный аллостерический эффект ТМ, с мутациями, связанными с ГKM, на актин-активируемую АТФазную активность S1 выше, чем для WT-ТМ. Поэтому АТФазная активность S1 сильнее активируется Glu180Gly ТМ, чем WT-ТМ [Chang et al., 2005; Lakdawala et al., 2010; Hilario et al., 2004; Redwood et al., 1999; Morimoto, 2008].

Таким образом, применение реконструированных мышечных волокон позволило нам исследовать влияние Glu180Gly и Asp175Asn мутаций в тропомиозине на конформационные изменения субдомена-1 актина и миозина в цикле гидролиза АТФазы. Было показано, что нуклеотиды, изменяя структурное состояние миозина и актина, могут нарушить равновесное состояние ансамбля, таким образом стимулируя переход всех компонентов ансамбля и, следовательно, состояние всего ансамбля в целом, к другому равновесному состоянию.

### **3.3. Влияние мутаций Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в $\beta$ -TM на структурное состояние актина, $\beta$ -скелетного TM и S1 в цикле гидролиза АТФ**

В этой части работы скелетномышечный  $\beta$ -TM модифицировали по остатку Cys36 флуоресцентным зондом 5-IAF, S1 – по остатку Cys707 зондом 1,5-IAEDANS. F-актин был специфически связан с FITC-фаллоидином в районе бороздки актиновой нити. Как описывалось выше, включение в волокна белков, модифицированных флуоресцентными красителями, вызывает появление поляризованной флуоресценции. Значения флуоресценции  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  приведены в таблицах 8-10.

**Таблица 8.** Влияние S1 и нуклеотидов (нукл.) на значения  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  поляризованной флуоресценции актин-FITC-фаллоидина в отсутствие и присутствии ТМ дикого типа и ТМ с мутациями Glu41Lys (E41K), Arg91Gly (R91G) и Glu139del (E139del). Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del. В экспериментах использовалось по 8-10 волокон. SEM – стандартная ошибка среднего значения

| Нукл.   | S1 | WT-TM | R91G | E41K | E139del | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|------|------|---------|--------------------------------|----------------------------|
| -       | -  | -     | -    | -    | -       | $0.336 \pm 0.003$              | $0.155 \pm 0.003$          |
| -       | -  | -     | -    | +    | -       | $0.363 \pm 0.003$              | $0.197 \pm 0.002$          |
| -       | -  | -     | -    | -    | +       | $0.325 \pm 0.003$              | $0.136 \pm 0.002$          |
| -       | -  | +     | -    | -    | -       | $0.353 \pm 0.003$              | $0.173 \pm 0.002$          |
| -       | -  | -     | +    | -    | -       | $0.323 \pm 0.003$              | $0.170^* \pm 0.002$        |
| -       | +  | -     | -    | -    | +       | $0.285 \pm 0.002$              | $0.167 \pm 0.002$          |
| -       | +  | +     | -    | -    | -       | $0.305 \pm 0.003$              | $0.197 \pm 0.002$          |
| -       | +  | -     | +    | -    | -       | $0.285 \pm 0.002$              | $0.206 \pm 0.003$          |
| -       | +  | -     | -    | +    | -       | $0.310^* \pm 0.001$            | $0.243 \pm 0.002$          |
| ADP     | +  | +     | -    | -    | -       | $0.287 \pm 0.003$              | $0.231 \pm 0.004$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.303 \pm 0.003$              | $0.150 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.313 \pm 0.002$              | $0.199 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.341 \pm 0.003$              | $0.001 \pm 0.002$          |
| AMP-PNP | +  | +     | -    | -    | -       | $0.331 \pm 0.003$              | $0.037 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.334^* \pm 0.002$            | $0.018 \pm 0.003$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.342 \pm 0.001$              | $0.193 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.352 \pm 0.002$              | $-0.008 \pm 0.003$         |
| ATP     | +  | +     | -    | -    | -       | $0.321 \pm 0.003$              | $0.137 \pm 0.003$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.329 \pm 0.002$              | $0.067 \pm 0.003$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.347 \pm 0.001$              | $0.193 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.351 \pm 0.002$              | $-0.018 \pm 0.003$         |

**Таблица 9.** Влияние S1 и нуклеотидов на значения  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  поляризованной флуоресценции  $\beta$ -TM-AF. Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Glu41Lys (E41K), Arg91Gly (R91G) и Glu139del (E139del). В экспериментах использовалось по 8-10 волокон. SEM – стандартная ошибка среднего значения

| Нукл.   | S1 | WT-TM | R91G | E41K | E139del | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|------|------|---------|--------------------------------|----------------------------|
| -       | -  | -     | -    | +    | -       | $0.038 \pm 0.001$              | $0.240^{*} \pm 0.002$      |
| -       | -  | -     | -    | -    | +       | $0.060 \pm 0.002$              | $0.125 \pm 0.002$          |
| -       | -  | +     | -    | -    | -       | $-0.012 \pm 0.002$             | $0.241 \pm 0.002$          |
| -       | -  | -     | +    | -    | -       | $0.042 \pm 0.002$              | $0.227 \pm 0.002$          |
| -       | +  | -     | -    | -    | +       | $0.060 \pm 0.002$              | $0.125 \pm 0.002$          |
| -       | +  | +     | -    | -    | -       | $-0.026 \pm 0.003$             | $0.222 \pm 0.001$          |
| -       | +  | -     | +    | -    | -       | $0.025 \pm 0.002$              | $0.232 \pm 0.003$          |
| -       | +  | -     | -    | +    | -       | $-0.018 \pm 0.001$             | $0.235^{*} \pm 0.001$      |
| ADP     | +  | +     | -    | -    | -       | $-0.028 \pm 0.002$             | $0.227 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.019 \pm 0.002$              | $0.193 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $-0.008 \pm 0.001$             | $0.240 \pm 0.001$          |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.033 \pm 0.002$              | $0.148 \pm 0.003$          |
| AMP-PNP | +  | +     | -    | -    | -       | $0.014 \pm 0.002$              | $0.165 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $-0.016 \pm 0.002$             | $0.219 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.045 \pm 0.002$              | $0.176 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.126 \pm 0.002$              | $0.122 \pm 0.002$          |
| ATP     | +  | +     | -    | -    | -       | $0.030 \pm 0.002$              | $0.182 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.026^{*} \pm 0.002$          | $0.129 \pm 0.002$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.037 \pm 0.001$              | $0.181^{*} \pm 0.002$      |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.126 \pm 0.002$              | $0.119 \pm 0.002$          |

**Таблица 10.** Влияние ТМ дикого типа и ТМ, с Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del, а также нуклеотидов на значения  $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$  поляризованной флуоресценции AEDANS-S1.

Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Glu41Lys (E41K), Arg91Gly (R91G) и Glu139del (E139del). В экспериментах использовалось по 8-10 волокон.

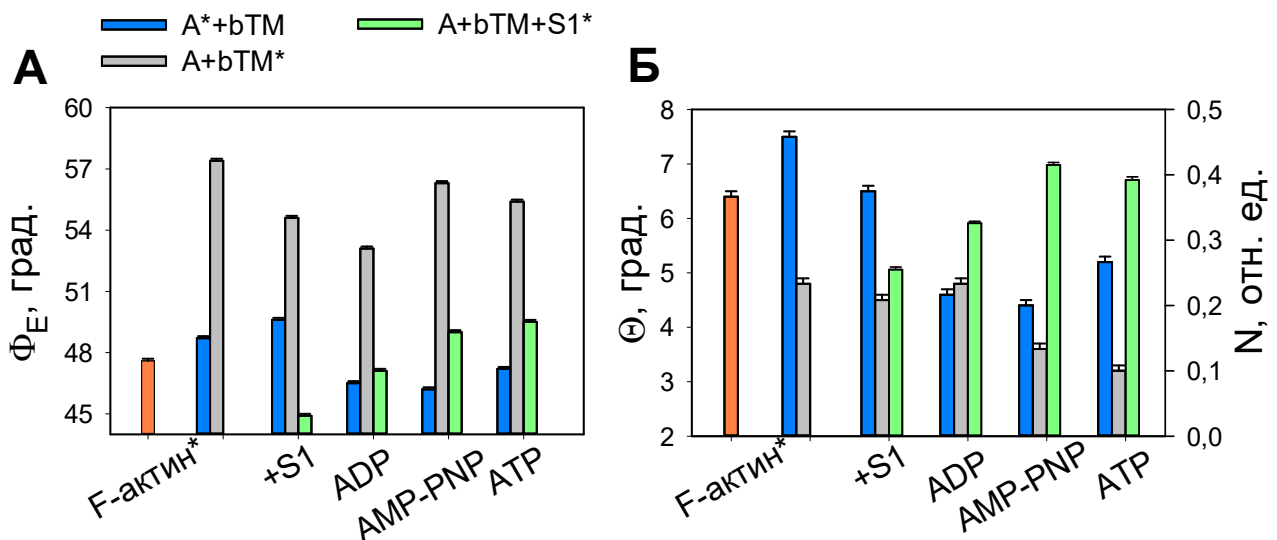
SEM – стандартная ошибка среднего значения

| Нукл.   | S1 | WT-TM | R91G | E41K | E139del | $P_{\parallel} \pm \text{SEM}$ | $P_{\perp} \pm \text{SEM}$ |
|---------|----|-------|------|------|---------|--------------------------------|----------------------------|
| -       | +  | +     | -    | -    | -       | $0.359 \pm 0.002$              | $-0.074 \pm 0.004$         |
| -       | +  | -     | +    | -    | -       | $0.366 \pm 0.003$              | $-0.090 \pm 0.002$         |
| -       | +  | -     | -    | +    | -       | $0.367 \pm 0.003$              | $-0.083 \pm 0.002$         |
| -       | +  | -     | -    | -    | +       | $0.337 \pm 0.003$              | $-0.029 \pm 0.002$         |
| ADP     | +  | +     | -    | -    | -       | $0.389 \pm 0.002$              | $-0.065 \pm 0.004$         |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.395 \pm 0.002$              | $-0.082 \pm 0.004$         |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.396 \pm 0.002$              | $-0.085 \pm 0.004$         |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.308 \pm 0.002$              | $0.079 \pm 0.004$          |
| AMP-PNP | +  | +     | -    | -    | -       | $0.333 \pm 0.004$              | $0.069 \pm 0.005$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.349 \pm 0.002$              | $-0.030 \pm 0.004$         |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.382 \pm 0.002$              | $-0.071 \pm 0.004$         |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.269 \pm 0.002$              | $0.180 \pm 0.003$          |
| ATP     | +  | +     | -    | -    | -       | $0.295 \pm 0.003$              | $0.219 \pm 0.005$          |
|         | +  | -     | +    | -    | -       | $0.298 \pm 0.003$              | $0.211 \pm 0.006$          |
|         | +  | -     | -    | +    | -       | $0.308 \pm 0.005$              | $0.196 \pm 0.006$          |
|         | +  | -     | -    | -    | +       | $0.247 \pm 0.003$              | $0.197 \pm 0.006$          |

Как следует из данных, представленных на рисунке 20, каждой моделируемой стадии цикла гидролиза АТФ соответствует определенная ориентация осцилляторов излучения зонда, связанного с каждым из белков. При моделировании перехода актомиозина из слабой (в присутствии АТФ) в сильную (в отсутствие нуклеотида) форму связывания наблюдается постепенное уменьшение величины угла  $\Phi_E$  для S1-AEDANS (зеленые колонки), что отражает многоступенчатый



поворот головки миозина к оси актиновой нити при возрастании относительного количества головок миозина, находящихся в сильной форме связывания с актином (см. обзоры [Borovikov, 1999; Borejdo et al. 2006]). Одновременно происходит увеличение угла  $\Phi_E$  для комплекса актин-FITC-фаллоидин (рис. 20, синие колонки), что свидетельствует о вращении мономера актина от оси тонкой нити на периферию. Такие изменения ориентации актина можно рассматривать как увеличение относительного количества включенных мономеров актина в тонких нитях (см. обзоры: [Borovikov, 1999; Borejdo et al. 2006]). Описанным изменениям значений  $\Phi_E$  для S1 и F-актина соответствуют изменения этого параметра для  $\beta$ -TM-AF (рис. 20).



**Рисунок 20.** Значения  $\Phi_E$  (А),  $\theta_{1/2}$  (Б) для актин-FITC-фаллоидин,  $\beta$ -TM-AF и  $\Phi_E$  (А), N (Б) для S1-AEDANS при моделировании промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в теновом мышечном волокне (80 измерений для каждого белка).  $\Phi_E$  угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. Угол  $\Phi_E$  для TM-AF дан с поправкой на вращение мономеров актина.  $\theta_{1/2}$  — угол отклонения тонких филаментов или тяжей ТМ, характеризующий гибкость молекулы. N количество хаотически ориентированных зондов. Все изменения достоверны ( $p < 0,05$ ). Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения.

При моделировании перехода актомиозина из слабой в сильную форму связывания происходит многоступенчатое уменьшение значения угла  $\Phi_E$  для  $\beta$ -TM-AF (рис. 20, серые колонки). Следовательно, в цикле гидролиза АТФ каждому конформационному состоянию головки миозина соответствует определенная пространственная организация актина и тропомиозина. Поскольку наименьшие значения угла  $\Phi_E$  для  $\beta$ -TM-AF обнаружены в экспериментах с S1, находящимся в сильной форме связывания с актином, был сделан вывод о том, что уменьшение значения  $\Phi_E$  для  $\beta$ -TM-AF отражает движение тропомиозина по поверхности тонкой нити к внутреннему домену актина (по направлению к открытой позиции) [Rysev et al., 2014]. При переходе актомиозина из слабой в сильную форму связывания тропомиозиновый тяж смещается к внутреннему домену актина, при этом увеличивается относительное количество включенных мономеров актина и головок миозина, образующих с актином сильную форму связывания. Таким образом, для  $\beta$ -TM, так же как для  $\alpha$ -TM [Borovikov et al., 2009a], позиция TM коррелирует с определенными структурными состояниями актомиозина. Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что мутации в  $\beta$ -тропомиозине могут оказать влияние на позицию TM и конформационное состояние актомиозина в цикле гидролиза АТФ.

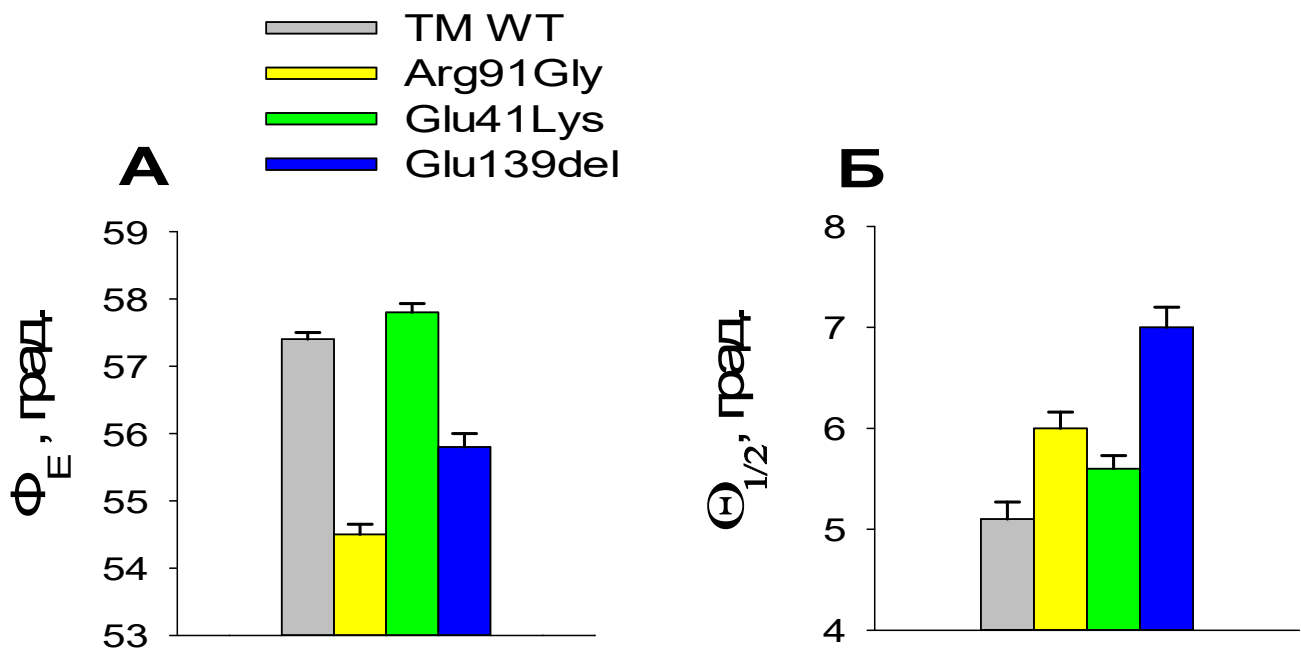
В этой части работы мы изучили влияние мутаций Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в  $\beta$ -скелетном TM человека, вызывающих, соответственно, немалиновую миопатию, дистальный артрогрипоз, «кэп»-миопатию, на характер изменений позиции  $\beta$ -TM, пространственной организации мономеров F-актина и субфрагмента-1 миозина в цикле гидролиза АТФ.

Несмотря на то, что клинические симптомы, описанные у пациентов с мутациями Arg91Gly и Glu139del отличаются (контрактуры в

случае с мутациями Arg91Gly [Sung et al., 2003] и гипотония и мышечная слабость в случае с мутацией Glu139del), на молекулярном уровне обе мутации демонстрируют гиперсократимость. Основным эффектом мутаций в позициях 91 и 139 аминокислотной последовательности  $\beta$ -ТМ заключается в повышении чувствительности тонких филаментов к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  в тесте *in vitro motility assay* [Robinson et al., 2007; Marttila et al., 2012; Marston et al., 2013]. Мутация Glu41Lys характеризуется гипотонией и мышечной слабостью у пациентов, [Martilla et al., 2012] и сниженной  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительностью тонких нитей [Ochala et al., 2008; Marttila et al., 2012].

Мутация Arg91Gly располагается в позиции “g” гептадного повтора и может влиять на димеризацию. Данная мутация может нарушать солевой мостик через замену положительно заряженного аминокислотного остатка на нейтральный. Мутации Glu139del и Glu41Lys располагаются в позиции “f” и могут влиять на связывание ТМ с актином и другими белками тонких филаментов [Martilla et al., 2012]. Эти замены могут изменять конформацию ТМ, приводя к деформации молекулы ТМ, которая может лежать в основе изменения позиции и гибкости тяжей ТМ.

Наши данные позволяют предположить, что изменение чувствительности тонких филаментов к  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванное этими мутациями, коррелирует с изменением позиции тропомиозиновых тяжей на актиновых нитях (рис. 21).



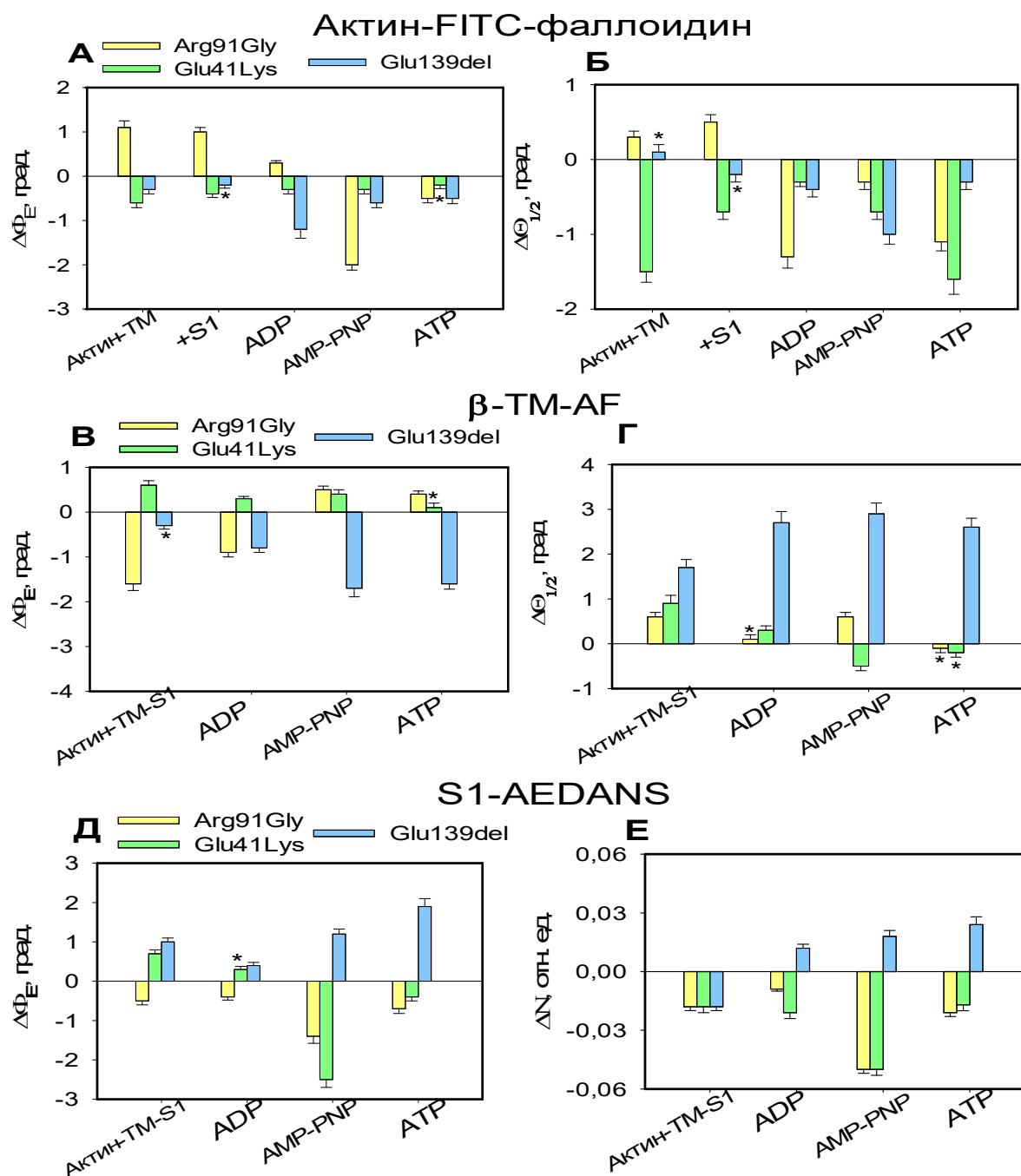
**Рисунок 21.** Значения  $\Phi_E$  (А) и  $\theta_{1/2}$  (Б) для  $\beta$ -TM-AF дикого типа и с мутациями Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del в отсутствие S1 в теневом мышечном волокне.  $\Phi_E$  угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей, дан с поправкой на вращение мономеров актина.  $\theta_{1/2}$  – угол отклонения тонких филаментов или тяжей ТМ, характеризующий гибкость молекулы. Все изменения  $\Phi_E$  и  $\theta_{1/2}$  для  $\beta$ -TM с мутациями Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del относительно  $\beta$ -TM дикого типа достоверны ( $p < 0,05$ ). Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения.

Мутации Arg91Gly, Glu139del и Glu41Lys приводят к статистически достоверным ( $p < 0,05$ ) изменениям значений  $\Phi_E$  и  $\theta_{1/2}$  для AF-TM, что свидетельствует об изменениях в позиции и гибкости ТМ, вызванных этими мутациями (рис. 21). Так, для мутаций Arg91Gly и Glu139del в отсутствие S1 значения  $\Phi_E$  для AF-TM были меньше, по сравнению с WT-TM, на  $2,9^\circ$  и  $1,6^\circ$ , соответственно (рис 21). Это значит, что эти замены в молекуле ТМ вызывают смещение тяжа ТМ к центру тонкой нити, к открытой позиции. Для мутации Glu41Lys значение  $\Phi_E$  было выше, чем для WT-TM, на  $0,3^\circ$  ( $P < 0,05$ ) (рис. 21), что указывает на смещение тяжа ТМ к периферии тонкой нити, в направлении блокирующей позиции. Такой характер расположения ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu139del, по-видимому, способствует формированию сильного связывания S1 с актином, тогда как расположение Glu41Lys

ТМ, наоборот, может препятствовать такому связыванию. Эти мутации располагаются в областях, не вовлечённых напрямую в связывание с тропонином [White et al., 1987; Miki et al., 2012]. Следовательно, можно предположить, что именно смещение тяжа ТМ ответственно за описанное в литературе увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности тонких нитей в присутствии ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu139del [Marston et al., 2013] и уменьшение  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности в присутствии ТМ с мутацией Glu41Lys [Ochala et al., 2008; Martilla et al., 2012].

Мутации ТМ изменяют значение  $\theta_{1/2}$  (рис. 21Б), что указывает на изменение гибкости тяжа ТМ. Так, в отсутствие S1 значение  $\theta_{1/2}$  было выше на  $0,9^\circ$ ,  $1,9^\circ$  и  $0,5^\circ$  для Arg91Gly, Glu139del и Glu41Lys, соответственно, по сравнению с тропомиозином дикого типа, что свидетельствует об увеличении гибкости тяжа ТМ. Ранее было обнаружено, что ТМ с мутацией Glu139del содержит меньше  $\alpha$ -спиральных участков, чем WT-ТМ [Martilla et al., 2012]. Замена Arg91Gly приводит к существенной дестабилизации значительной части молекулы ТМ [Nevzorov et al., 2008]. Возможно, уменьшение содержания  $\alpha$ -спиральных структур и дестабилизация молекулы ТМ может лежать в основе обнаруженного нами увеличения гибкости ТМ вследствие мутаций Arg91Gly и Glu139del.

Изменения в позиции ТМ и его гибкости существенно меняют конформационное состояние F-актина (рис. 22 А, Б).



**Рисунок 22.** Влияние мутаций Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del в скелетном  $\beta$ -TM на значения  $\Phi_E$  (А, В, Д),  $\theta_{1/2}$  (Б, Г) и  $N$  (Е) флуоресцентных зондов, локализованных в  $\beta$ -TM (В, Г), F-актине (А, Б) или S1 (Д, Е) относительно  $\Phi_E$ ,  $\theta_{1/2}$  и  $N$ , вычисленного в присутствии тропомиозина дикого типа (см. рис. 19) при моделировании различных промежуточных стадий АТФазного цикла.  $\Phi_E$  угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. Для TM-AF угол  $\Phi_E$  дан с поправкой на вращение мономеров актина.  $\theta_{1/2}$  – угол отклонения тонких филаментов или тяжей TM, характеризующий гибкость молекулы.  $N$  количество хаотически ориентированных зондов. Стрелки указывают направление тенденций, указанных для изменений каждого компонента белкового комплекса. Все изменения относительно  $\beta$ -TM дикого типа достоверны, за исключением изменений, отмеченных звездочкой ( $p < 0,05$ ). Погрешности показывают стандартную ошибку среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Gly126Arg.

В отсутствие S1 значения  $\Phi_E$  для FITC-актина в присутствии ТМ с мутацией Arg91Gly выше на  $1,1^\circ$ , в присутствии ТМ с мутациями Glu41Lys и Glu139del ниже на  $0,6^\circ$  и  $0,3^\circ$  ( $P < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с ТМ дикого типа (рис. 22А).  $\theta_{1/2}$  больше на  $0,3^\circ$  в присутствии ТМ с мутацией Arg91Gly и ниже на  $1,5^\circ$  ( $P < 0,05$ ) в присутствии ТМ с мутацией Glu41Lys, по сравнению с ТМ дикого типа (рис. 22Б). Эти величины для F-актина в присутствии ТМ дикого типа и ТМ с мутацией Glu139del, были одинаковыми. Увеличение и уменьшение значений  $\Phi_E$  и  $\theta_{1/2}$  интерпретируется как увеличение и уменьшение, соответственно, относительного количества мономеров актина во включенном состоянии [Rysev et al., 2014].

Таким образом, в отсутствие S1 мутация Arg91Gly увеличивает количество включенных мономеров актина, а мутация Glu41Lys – уменьшает.

В случае с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys изменения позиции тяжей ТМ, вызванные этими мутациями в отсутствие S1 коррелирует с нормальными изменениями в количестве включенных мономеров актина (рис. 22А): мутация Arg91Gly сдвигает тяж ТМ к внутреннему домену актина, и это сопровождается увеличением количества включенных мономеров актина; и, напротив, мутация Glu41Lys смещает тяжи к внешнему домену актина, что сопровождается уменьшением количества включенных мономеров актина. Эта корреляция нарушается в случае с мутацией Glu139del: смещение тяжей ТМ к внутреннему домену актина сопровождалось уменьшением относительного количества включенных мономеров актина. Наблюдаемое разобщение корреляции между положением ТМ и конформацией актина можно объяснить тем, что ТМ с мутацией Glu139del обладает существенно меньшим сродством к F-актину, чем ТМ дикого типа [Martilla et al., 2012].

Мутации Arg91Gly, Glu139del и Glu41Lys в тропомиозине оказывают существенное влияние на позицию ТМ и структурное состояние актомиозина в цикле гидролиза АТФ.

Так, в отсутствие нуклеотидов, или в присутствии MgADP (состояния AM и  $AM^{\wedge}ADP$ , соответственно), значение  $\Phi_E$  для AF-ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu139del, меньше на  $1,6^\circ$  и  $0,3^\circ$  при имитации состояния AM, и на  $0,9^\circ$  и  $0,8^\circ$  при имитации состояния  $AM^{\wedge}ADP$  (рис. 22А), соответственно. В случае же с мутацией Glu41Lys угол меньше на

0,8° и 0,3°, соответственно (рис. 22В). Это значит, что при моделировании состояний сильного связывания актомиозина, мутации Arg91Gly и Glu139del сдвигают тяж ТМ к внутреннему домену актина, в то время как, мутация Glu41Lys, напротив, сдвигает его к внешнему домену.

Интересно, что нормальный ответ актиновых мономеров (рис. 22А,Б) и головок миозина (рис. 22Д,Е) на движение ТМ в этих экспериментальных условиях (в отсутствие нуклеотида, или в присутствии MgADP) наблюдается только для мутаций Arg91Gly и Glu41Lys: сдвиг ТМ с мутацией Arg91Gly в сторону внутреннего домена актина (рис. 22А) сопровождается увеличением количества головок миозина в состоянии сильного связывания с актином (значения  $\Phi_E$  и N для AEDANS-S1 снижаются на 0,5° и 0,4°, и на 0,018 относительных единиц и 0,009 относительных единиц ( $P < 0,05$ ) в отсутствие нуклеотида и в присутствии MgADP, соответственно) (рис. 22Д,Е) и увеличением количества включенных мономеров актина (в состоянии АМ значения  $\Phi_E$  и  $\theta_{1/2}$  для FITC-актина увеличиваются на 1,0° и 0,5°, соответственно) (рис. 22А,Б). Сдвиг ТМ с мутацией Glu41Lys к внешнему домену актина (рис. 22А) снижает количество головок миозина в состоянии сильного связывания (значения  $\Phi_E$  и N для AEDANS-S1 увеличиваются на 0,7° и 0,3°, и на 0,018 и 0,021 относительных единиц в отсутствие нуклеотида и в присутствии MgADP, соответственно) (рис. 22Д,Е) и количество включенных мономеров актина (для AEDANS-актин значения  $\Phi_E$  снижается на 0,4° и 0,3°, а  $\theta_{1/2}$  снижается на 0,7° и 0,3° ( $P < 0,05$ ), при имитации состояний АМ и АМ<sup>^</sup>·ADP, соответственно) (рис. 22А,Б).

В противоположность мутациям Arg91Gly и Glu41Lys, в отсутствие нуклеотидов и в присутствии MgADP мутация Glu139del демонстрирует аномальный ответ мономеров актина и головок миозина на движение ТМ. Смещение ТМ с мутацией Glu139del к внутреннему домену актина (рис. 22А), вместо увеличения количества головок в состоянии сильного связывания с актином и мономеров актина во включенном состоянии, сопровождается снижением количества сильно связанных головок миозина (значения  $\Phi_E$  выше на 1,0° и 0,4°, и N меньше на 0,018 и 0,012 относительных единиц ( $P < 0,05$ ), соответственно) (рис. 22Д,Е) и количества включенных мономеров актина (значение  $\Phi_E$  не изменяется или уменьшается на 1,2°, а значение  $\theta_{1/2}$  не изменяется или снижается на 0,4° ( $P < 0,05$ ), соответственно) (рис. 22А,Б).



При имитации состояний слабого связывания актомиозина (в присутствии MgAMP-PNP и MgATP) наблюдается аномальный ответ головок миозина на движение ТМ для всех трёх мутаций (рис. 22 Д, Е). Движение ТМ дикого типа в сторону внешнего домена актина сопровождается уменьшением количества головок миозина в состоянии сильного связывания, тогда как, для ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys наблюдается сохранение некоторого количества головок в состоянии сильного связывания (в присутствии MgAMP-PNP,  $\Phi_E$  и N для AEDANS-S1 снижается на  $1,4^\circ$  и  $2,5^\circ$ , и на 0,050 и 0,050 относительных единиц для мутаций Arg91Gly и Glu41Lys, соответственно; в присутствии MgATP снижение значений  $\Phi_E$  и N составляет  $0,7^\circ$  и  $0,4^\circ$ , и 0,021 и 0,017 относительных единиц ( $P < 0.05$ ) для ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys, соответственно).

В присутствии MgAMP-PNP и MgATP, движение ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys и ТМ дикого типа в сторону внешнего домена актина (рис. 22В) сопровождается увеличением количества выключенных мономеров актина (рис. 22А,Б) (в присутствии MgAMP-PNP,  $\Phi_E$  и  $\theta_{1/2}$  меньше на  $2,0^\circ$  и  $0,3^\circ$  для мутации Arg91Gly и на  $0,3^\circ$  и  $0,7^\circ$  для мутации Glu41Lys; в присутствии MgATP, эти величины также снижаются на  $0,5^\circ$  и  $1,1^\circ$  для мутации Arg91Gly, и не меняется или снижается на  $1,6^\circ$  для мутации Glu41Lys ( $P < 0,05$ ), соответственно, по сравнению с ТМ дикого типа).

Таким образом, несмотря на то, что в присутствии MgAMP-PNP и MgATP большая часть мономеров актина находится в выключенном состоянии, некоторое количество головок миозина сохраняют способность к сильному связыванию с актином, т.е. к формированию связывания, похожего на то, что наблюдаются в присутствии MgADP. Для ТМ дикого типа в присутствии MgAMP-PNP и MgATP переключение мономеров актина в выключенное состояние коррелирует с образованием слабых форм связывания актомиозина. Следовательно, мутации Arg91Gly и Glu41Lys в ТМ сдвигают равновесие в сторону образования сильных форм связывания головок миозина даже в присутствии АТР. Как известно, миозин способен связываться электростатически с ТМ [Behrmann et al., 2012]. Таким образом, способность головок к сильным взаимодействиям с актином в присутствии АТР может быть результатом изменения характера

взаимодействия между головками миозина и ТМ, вызванного мутациями в последнем.

Следует отметить, что в присутствии АТФ похожий эффект сохранения некоторых головок в состоянии близком к состоянию сильного связывания, был обнаружен нами ранее. Например, для мутации Lys169Arg в  $\alpha$ -ТМ скелетных мышц [неопубликованные данные] и для мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном  $\alpha$ -ТМ [Rysev et al., 2012]. Однако не было обнаружено таких эффектов для других мутаций: Например, для Glu40Lys в сердечном  $\alpha$ -ТМ [Borovikov et al., 2011], Gly126Arg в скелетном  $\alpha$ -ТМ и гладкомышечном  $\beta$ -ТМ [Rysev et al., 2014] и Glu117Lys в скелетном  $\beta$ -ТМ [Karpicheva et al., 2014].

Так как значения  $\theta_{1/2}$  для FITC-актина снижаются во всех экспериментах с ТМ, содержащим эти три мутации, мы предполагаем, что все эти мутации снижают сродство головок миозина к F-актину в течение цикла гидролиза АТФ.

Таким образом, все исследованные точечные мутации вызывают аномальное поведение тропомиозина в АТФазном цикле и приводят к дефектному ответу актина и миозина, что может быть одной из причин нарушения сократительной функции, описанной в литературе для мышечной ткани, содержащей эти мутантные формы тропомиозина [Ochala et al., 2008; Sung et al., 2003; Marston et al., 2013; Muthuchamy et al., 1999; Kremneva et al., 2004]. Так, мутация Arg91Gly сдвигает тяжи ТМ к внутреннему и внешнему доменам актина при имитации сильных и слабых форм связывания, соответственно. Это движение сопровождается увеличением количества головок миозина в сильной форме связывания на всех стадиях цикла гидролиза АТФ, что может быть одной из причин образования контрактур и мышечной слабости при дистальном артрогрипозе [Sung et al., 2003]. Мутация Glu139del стабилизирует тяжи ТМ около внутреннего домена актина на протяжении всего цикла гидролиза АТФ. Видимо, мутация Glu139del ингибирует формирование сильного связывания миозина с актином в АТФазном цикле. Мутация Glu41Lys, связанная с гипосократимостью, стабилизирует тяжи ТМ около внешнего домена актина в течение цикла гидролиза АТФ, приводя к уменьшению количества головок миозина в состоянии сильного связывания при моделировании сильной формы связывания, и к увеличению количества таких головок миозина при моделировании слабого связывания. Такой ответ сократительной

системы может быть причиной мышечной слабости при немалиновой миопатии [Donner et al., 2002].

## Выводы

1. При моделировании АТФазного цикла в мышечном волокне переход от слабой формы связывания миозина с актином к сильной форме их связывания сопровождается постепенным смещением тропомиозина от периферии актиновой нити к ее центру и конформационными изменениями сократительных белков, которые приводят к увеличению относительного количества включенных мономеров актина и головок миозина, сильно связанных с актином.
2. Точечные мутации Glu180Gly и Asp175Asn в  $\alpha$ -тропомиозине сердечных мышц, Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в  $\beta$ -тропомиозине скелетных мышц и Gly126Arg в  $\alpha$ -тропомиозине скелетных и  $\beta$ -тропомиозине гладких мышц изменяют характер движения тропомиозина в цикле гидролиза АТФ, что нарушает согласованность конформационных изменений актина и головок миозина.
3. Мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном  $\alpha$ -тропомиозине и мутация Arg91Gly в  $\beta$ -тропомиозине приводят к смещению тропомиозиновых тяжей к центру нити, увеличению относительного количества включенных мономеров актина при моделировании сильных форм связывания головок миозина с актином, уменьшению доли таких мономеров при моделировании слабых форм связывания. Относительное количество головок миозина, способных к сильному связыванию с актином, возрастает при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ.
4. Замена Glu41Lys в  $\beta$ -тропомиозине смещает тропомиозин к периферии тонкой нити, что приводит к смещению равновесия в сторону

выключения мономеров актина на всех стадиях цикла гидролиза АТФ; при этом относительное количество головок миозина, сильно связанных с актином, уменьшается при моделировании сильных форм связывания миозина с актином и возрастает при моделировании слабых форм связывания.

5. Мутация Glu139del приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити, что вызывает выключение мономеров актина и уменьшение относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ.

6. Замена Gly126Arg в  $\alpha$ -тропомиозине скелетных мышц и  $\beta$ -тропомиозине гладких мышц обуславливает смещение тропомиозина к центру нити, существенно увеличивает жесткость тропомиозина, что вызывает возрастание относительного количества включенных мономеров актина.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи в рецензируемых журналах

1. Borovikov Y.S., Avrova S.V., Rysev N.A., Sirenko V.V., Simonyan A.O., Chernev A.A., Karpicheva O.E., Piers A., Redwood C.S. (2015) Aberrant movement of  $\beta$ -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. Arch. Biochem. Biophys. 577-578:11-23.
2. Rysev N. A., Nevzorov I. A., Avrova S. V., Karpicheva O. E., Redwood C. S., Levitsky D. I., Borovikov Y. S. (2014) Gly126Arg substitution causes anomalous behaviour of  $\alpha$ -skeletal and  $\beta$ -smooth tropomyosins during the ATPase cycle. Arch. Biochem. Biophys. 543: 57-66.

3. Боровиков Ю. С., Карпичева О. Е., Рысев Н. А., Рэдвуд Ч. С. (2013) Аномальное поведение тропомиозина в АТФазном цикле при дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии. Росс. физиол. ж. им. И.М. Сеченова 99(1): 73-80.
4. Rysev N. A., Karpicheva O. E., Redwood C. S., Borovikov Y. S. (2012) The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle. Biochim. Biophys. Acta. 1824(2): 366-373.
5. Borovikov Y. S., Rysev N. A., Karpicheva O. E., Redwood C. S. (2011) Hypertrophic cardiomyopathy-causing Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations shift tropomyosin strands further towards the open position during the ATPase cycle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 407(1): 197-201.

#### **Тезисы докладов.**

1. Rysev NA, Avrova SV, Karpicheva OE, Piers A, Redwood CS, Borovikov YS. (2015) The effect of the E139del mutation in TPM2 gene on movement of  $\beta$ -tropomyosin strands and the response of actin in the thin filaments during the ATPase cycle. In Abstracts of 44rd European muscle conference, Warsaw, Poland, p.9.
2. Rysev NA, Karpicheva OE, Avrova SV, Robaszkiewicz K, Borys D, Borovikov YS, Moraczewska J. (2015) The Arg167His and Lys168Glu mutations in  $\alpha$ -tropomyosin (Tpm1.1) disrupt the regulation of actin-myosin interaction during the ATPase cycle. In Abstracts of 44rd European muscle conference, Warsaw, Poland, p.10.
3. Avrova SV, Rysev NA, Karpicheva OE, Simonyan AO, Chernev AA, Piers A, Redwood CS, Borovikov YS (2014). Abnormal movement of mutant  $\beta$ -tropomyosin associated with congenital myopathy causes aberrant response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. In Abstracts of 43rd European muscle conference, Salzburg, Austria, J. Muscle Res. Cell Motil., 36: 78, 10.1007/s10974-015-9407-3.
4. Rysev NA, Matyushenko AM, Artemova NV, Levitsky DI, Borovikov YS (2014). D137L and G126R mutations affect the changes in position of

$\alpha$ -tropomyosin during the ATPase cycle. In Abstracts of 43rd European muscle conference, Salzburg, Austria, J. Muscle Res. Cell Motil., 36: 105, 10.1007/s10974-015-9407-3.

5. Karpicheva OE, Rysev NA, Avrova SV, Simonyan AO, Redwood CS, Borovikov YS (2014). The role of tropomyosin position in the molecular mechanism of the regulation of actin-myosin interaction during the ATPase cycle. In Abstracts of International Symposium «Biological Motility: New facts and hypotheses», Pushchino, Russia, 108.

6. Rysev NA, Simonyan AO, Piers A, Redwood CS, Borovikov YS (2013). The effect of the Glu41Lys mutation in  $\beta$ -skeletal tropomyosin on its position on the thin filament and flexibility during the ATPase cycle. In Abstracts of 42nd European Muscle Conference, Amsterdam, Netherlands J. Muscle Res. Cell Motil (2012) 35(1):65-142 doi10.1007/s10974-014-9384-y

7. Simonyan AO, Rysev NA, Chernev AA, Piers A, Redwood CS, Borovikov YS (2013). The effect of the arthrogryposis-causing Arg91Gly mutation in beta-skeletal tropomyosin on its position on the thin filament and flexibility during the ATPase cycle Abstracts of 42nd European Muscle Conference, Amsterdam, Netherlands J. Muscle Res. Cell Motil (2012) 35(1):65-142 doi10.1007/s10974-014-9384-y

8. Simonyan AO, Rysev NA, Chernev AA, Krutetskaya ZI, Piers A, Redwood CS, Borovikov YS (2013). The effect of the arthrogryposis-causing Arg91Gly mutation in beta-skeletal tropomyosin on its position on the thin filament and flexibility during the ATPase cycle. Abstracts of 38th Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013, Saint-Petersburg, Russia FEBS JOURNAL Volume 280, Issue s1, July 2013, Pages: 639–661, doi: 10.1111/febs.12396

9. Rysev NA, Nevzorov IA, Redwood CS, Levitsky DI, Borovikov YS (2012). The Gly126Arg mutation of  $\alpha$ -tropomyosin increases the population of the strong-binding sub-states during the ATPase cycle. In Abstracts of 41st European Muscle Conference, Rhodes, Greece, J Muscle Res Cell Motil (2012) 33:248, doi 10.1007/s10974-012-9313-x

10. Rysev NA, Karpicheva OE, Redwood CS, Borovikov YS. (2011) The Asp175Asn and Glu180Gly mutations of  $\alpha$ -tropomyosin decrease the

population of the weak-binding sub-states during the ATPase cycle. In Abstracts of 40th European Muscle Conference, Berlin, Germany, J. Muscle Res. Cell Motil., 32(4-5): 363, DOI 10.1007/s10974-011-9265-6

11. Karpicheva OE, Rysev NA, Borovikov YuS, Redwood CS. (2010) The effect of the Glu40Lys mutation of  $\alpha$ -tropomyosin on actin-myosin interaction during ATPase cycle. In Abstracts of 39th European Muscle Conference, Padua, Italy, 32(2): 127, DOI 10.1007/s10974-011-9257-6.

12. Rysev NA, Karpicheva OE, Sirenko VV, Borovikov YuS, Redwood CS. (2010) The effect of D175N and E180G mutations of  $\alpha$ -tropomyosin on actin-myosin interaction during ATPase cycle. In Abstracts of 39th European Muscle Conference, Padua, Italy, J. Muscle Res. Cell Motil. 32(2): 146, DOI 10.1007/s10974-011-9257-6.

13. Rysev NA, Avrova SV, Solov'eva LA, Shelud'ko NS, Borovikov YuS. (2008) The effect of twitchin on intermediate actomyosin states in glycerol-skinned skeletal muscle fibers. In Abstracts of 39th European Muscle Conference, Oxford, United Kingdom, J. Muscle Res. Cell Motil. 29(6-8):290 doi: 10.1007/s10974-008-9161-x.

Данное исследование проводилось при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты 14-04-31527а, 14-04-00454а, 11-04-00244а, 08-04-00960а) и программой Президиума РАН (тема № 7).

## Список цитированной литературы

1. Барский И.Я., Розанов Ю.М., Черногрядская Н. А., Шифферс Л. А., Шудель М. С. (1968) Поляризованная флуоресценция микроструктур биологических объектов. *Известия АН СССР* **32**:1546-7.
2. Боровиков Ю.С., Шудель М.С., Черногрядская Н.А., Розанов Ю.М., Барский И.Я. (1971) Об изменении азимутальных характеристик поляризованной ультрафиолетовой флуоресценции одиночных мышечных волокон при растяжении и сокращении. *Доклады АН СССР* **196**:962-4.
3. Боровиков Ю.С., Розанов Ю.М., Барский И.Я., Шудель М.С., Черногрядская Н.А. (1972) Исследование поляризованной ультрафиолетовой флуоресценции гигантских мышечных волокон *Balanus Rostratus*. *Цитология* **14**:953-60.
4. Боровиков Ю.С., Черногрядская Н.А., Розанов Ю.М. (1974) Изучение структурных изменений миозиновых и актиновых нитей в мышечном волокне поляризационным методом ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии. *Цитология* **16**:977-82.
5. Боровиков Ю.С., Левицкий Д.И., Кириллина В.П., Поглазов Б.Ф. (1981) ДТНБ-легкая цепь миозина управляет конформационными перестройками F-актина, индуцированными субфрагментом-1 миозина. *Докл. АН СССР* **259**:732-5.
6. Боровиков Ю.С., Конколь И., Левицкий Д.И. (1986а) Сшивки SH-групп в головках миозина изменяет характер конформационных перестроек F-актина, индуцированных субфрагментом 1 миозина или тяжелым меромиозином. *Биохимия* **287**:216-9.
7. Боровиков Ю.С., Конколь И., Щесна Д., Кириллина В.П., Левицкий Д.И. (1986б) Фосфорилирование легких цепей миозина из скелетных мышц кролика влияет на характер конформационных изменений F-актина, индуцированных тяжелым меромиозином. *Биохимия* **51**:691-4.
8. Боровиков Ю.С., Добровольский З., Дабровска Р. (1988) Тропомиозин и субфрагмент-1 миозина индуцируют в тонких нитях мышечного волокна разные по характеру конформационные перестройки С-концевого участка полипептидной цепи актина. *Цитология* **30**:1014-7.



9. Боровиков Ю.С., Вротек М., Лебедева Н.Н., Конколь И. (1989) Влияние фосфорилирования легких цепей миозина и  $\text{Ca}^{2+}$  на конформацию F-актина при сокращении скелетных мышц. *Биохимия* **54**:161-6.
10. Боровиков Ю.С., Новак Е., Дабровска Р. (1990) Влияние кальдесмона и тропомиозина из гладких мышц на подвижность головки миозина в теневом мышечном волокне *Биохимия* **55**:1498-502.
11. Иванов И.И., Юрьев В.А. (1961) Биохимия и патобиохимия мышц. *Медгиз, Ленинград*.
12. Иоффе В.А., Боровиков Ю.С., Барский И.Я., Розанов Ю.М. (1974) Двухканальный поляризационный микрофлуориметр. *Цитология* **16**:112-6.
13. Каулин А.Б. (1968) Поляризованная флуоресценция акридинового оранжевого в мышечных волокнах в норме и при повреждении. *Цитология* **10**:123-5.
14. Каулин А.Б., Гольфанд К.А. (1970) Поляризованная флуоресценция окрашенных мышечных волокон. IV. Изменение ориентации акридинового оранжевого в глицеринизированных волокнах при действии АТФ. *Цитология* **12**:172-7.
15. Кроленко С.А. (1975) Т-система мышечных волокон: структура и функция. Ленинград, Наука.
16. Кремнева Е.В., Николаева О.П., Гусев Н.Б., Левицкий Д.И. (2003) *Биохимия* **68**:802-9.
17. Левицкий Д.И., Боровиков Ю.С., Николаева О.П., Голицына Н.Л., Поглазов Б.Ф. (1990) Влияние щелочных легких цепей миозина на взаимодействие субфрагмента 1 миозина с актином в растворе и в теневом мышечном волокне. *Биохимия* **55**:1690-9.
18. Левицкий Д.И., Голицына Н.Л., Николаева О.П., Боровиков Ю.С. (1991) Взаимодействие изоформ субфрагмента-1 миозина, содержащих флуоресцентно меченные щелочные легкие цепи, с актином мышечных волокон. *Биохимия* **56**:639-47.
19. Пинаев Г.П. (1987) Структура и функции белков сократительной системы. Ленинград, Наука.
20. Пронина (Карпичева) О.Е., Вржосек А., Дабровска Р., Боровиков Ю.С. (2005) Влияние нуклеотидов на ориентацию и

- подвижность субфрагмента-1 миозина в теневом мышечном волокне. *Биохимия (Москва)* **70**:1382-8.
21. Пронина (Карпичева) О.Е., Копеланд О., Марстон С., Боровиков Ю.С. (2006) С-концевые сайты кальдесмона управляют циклом гидролиза АТФ, сдвигая промежуточные состояния актомиозина к слабым формам взаимодействия миозина с актином. *Цитология* **48**:9-18.
  22. Розанов Ю.М., Черногрядская Н.А., Барский И.Я., Боровиков Ю.С., Шудель М.С. (1971) Поляризованная ультрафиолетовая флуоресценция мышечных волокон и некоторых других цитологических анизотропных объектов. *Цитология* **13**:190-200.
  23. Adams S., Reisler E. (1993) Role of sequence 18-29 on actin in actomyosin interactions. *Biochemistry* **32**:5051-6.
  24. Andreev O.A., Takashi R., Borejdo J. (1995) Fluorescence polarization study of the rigor complexes formed at different degrees of saturation of actin filaments with myosin subfragment-1. *J. Mus. Res. Cell Motil.* **16**:353-67.
  25. Aronson J.F., Morales M.F. (1969) Polarization of tryptophan fluorescence in muscle. *Biochemistry* **8**:4517-22.
  26. Bacchiocchi C., Lehrer S.S. (2002) Ca<sup>2+</sup>-induced movement of tropomyosin in skeletal muscle thin filaments observed by multi-site FRET. *Biophys. J.* **82**:1524–36.
  27. Bacchiocchi C., Graceffa P., Lehrer S.S. (2004) Myosin-induced movement of alpha-alpha, alpha-beta, and beta-beta smooth muscle tropomyosin on actin observed by multisite FRET. *Biophys. J.* **86**:2295-307.
  28. Bailey K. (1948) Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.* **43**:282-7.
  29. Bartegi A., Fattoum A., Derancourt J., Kassab R. (1990) Characterization of the carboxyl-terminal 10-kDa cyanogen bromide fragment of caldesmon as an actin-calmodulin-binding region. *J. Biol. Chem.* **265**:15231-8.
  30. Barua B., Winkelmann D.A., White H.D., Hitchcock-DeGregori S.E. (2012) Regulation of actin-myosin interaction by conserved periodic sites of tropomyosin. *PNAS* **109**: 18425-30
  31. Berger C.L., Thomas D.D. (1994) Rotational dynamics of actin-bound intermediates of the myosin adenosine triphosphatase cycle in myofibrils. *Biophys. J.* **67**:250-61.

32. Bing W., Knott A., Marston S.B. (2000) A simple method for measuring the relative force exerted by myosin on actin filaments in the in vitro motility assay: evidence that tropomyosin and troponin increase force in single thin filaments. *Biochem. J.* **350**:693-9.
33. Borejdo J., Putnam S. (1977) Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibres in rigor and relaxation. *Biochim. Biophys. Acta* **459**:578-95.
34. Borejdo J., Putnam S., Morales M.F. (1979) Fluctuations in polarized fluorescence: evidence that muscle cross-bridges rotate repetitively during contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:6346-50.
35. Borejdo J., Assulin O., Ando T., Putnam S. (1982) Cross-bridge orientation in skeletal muscle measured by linear dichroism of an extrinsic chromophore. *J. Molec. Biol.* **158**:391-414.
36. Borejdo J., Shepard A., Akopova I., Grudzinski W., Malicka J. (2004a) Rotation of the lever arm of myosin in contracting skeletal muscle fiber measured by two-photon anisotropy. *Biophys. J.* **87**:3912-21.
37. Borejdo J., Shepard A., Dumka D., Akopova I., Talent J., Malka A., Burghardt T.P. (2004b) Changes in orientation of actin during contraction of muscle. *Biophys. J.* **86**:2308-17.
38. Borejdo J., Talent J., Akopova I., Burghardt T.P. (2006) Rotations of a few cross-bridges in muscle by confocal total internal reflection microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**:137-40.
39. Borejdo J., Muthu P., Talent J., Akopova I., Burghardt T.P. (2007) Rotation of actin monomers during isometric contraction of skeletal muscle. *J. Biomed. Opt.* **12**:014013.
40. Borovikov Y.S., Chernogriadskaia N.A. (1979) Studies on conformational changes in F-actin of glycerinated muscle fibers during relaxation by means of polarized ultraviolet fluorescence microscopy. *Microsc. Acta* **81**:383-92.
41. Borovikov Y.S., Levitskii D.I., Kirillina V.P., Poglazov B.F. (1982) Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  binding to 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) light chains on conformational changes of F-actin caused by myosin subfragment-1. *Eur. J. Biochem.* **125**:343-7.
42. Borovikov Y.S., Gusev N.B. (1983) Effect of troponin-tropomyosin complex and  $\text{Ca}^{2+}$  on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment-1. *Eur. J. Biochem.* **136**:363-9.

43. Borovikov Y.S., Levitsky D.I. (1985) Fluorescence polarization study on  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of conformational changes in F-actin induced by the formation of F-actin-subfragment-1 complex. *Gen. Physiol. Biophys.* **4**:457-63.
44. Borovikov Y.S., Levitsky D.I. (1989) The effect of myosin light chain phosphorylation and  $\text{Mg}^{2+}$  on the conformation of myosin in thick filaments of glycerinated fibers of rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **183**(1):83-8.
45. Borovikov Y.S., Vdovina I.B., Khoroshev M.I., Kirillina V. (1991) The orientation of fluorescent probes attached to actin and myosin subfragment-1 at the strong and the weak binding of these proteins in ghost fiber. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **12**:104.
46. Borovikov Y.S., Kakol I. (1991) Conformational changes of contractile proteins accompanying modulation of skeletal muscle contraction. Polarized microfluorimetry investigations. *Gen. Physiol. Biophys.*, **10**:245-64.
47. Borovikov Y.S., Kirillina V. (1992) Effect of Mg-ADP on structure of actin in F-actin-myosin subfragment 1 complex. *Basic Appl. Myol.* **2**:169-74.
48. Borovikov Y.S., Nowak E., Khoroshev M.I., Dabrowska R. (1993) The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the conformation of tropomyosin and actin in regulated actin filaments with or without bound myosin subfragment 1. *Biochim. Biophys. Acta* **1163**:280-6.
49. Borovikov Y.S., Horiuchi K.Y., Avrova S.V., Chacko S. (1996a) Modulation of actin conformation and inhibition of actin filament velocity by calponin. *Biochemistry* **35**:13849-57.
50. Borovikov Y.S. (1999) Conformational changes of contractile proteins and their role in muscle contraction. *Int. Rev. Cytol.* **189**:267-301.
51. Borovikov Y.S., Moraczewska J., Khoroshev M.I., Strzelecka-Golaszewska H. (2000) Proteolytic cleavage of actin within the DNase-I-binding loop changes the conformation of F-actin and its sensitivity to myosin binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**:138-51.
52. Borovikov Y.S., Wrzosek A., Kulikova N., Vikhorev P., Vikhoreva N., Dabrowska R. (2004a) Behavior of caldesmon upon interaction of thin filaments with myosin subfragment 1 in ghost fibers. *Biochim. Biophys. Acta* **1699**:183-9.

53. Borovikov Y.S., Dedova I.V., dos Remedios C.G., Vikhoreva N.N., Vikhorev P.G., Avrova S.V., Hazlett T.L., Van Der Meer B.W. (2004b) Fluorescence depolarization of actin filaments in reconstructed myofibers: the effect of S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin. *Biophys. J.* **86**:3020-9.
54. Borovikov Y.S., Kulikova N., Pronina O.E., Khaimina S.S., Wrzosek A., Dabrowska R. (2006) Caldesmon freezes the structure of actin filaments during the actomyosin ATPase cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**:1054-62.
55. Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Redwood C.S. (2009a) Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochim. Biophys. Acta* **1794**:985-94.
56. Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Chudakova G.A., Robinson P., Redwood C.S. (2009b) Dilated cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin inhibit its movement during the ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**:403-6.
57. Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Robinson P., Redwood C.S. (2009b) The effect of the dilated cardiomyopathy-causing mutation Glu54Lys of alpha-tropomyosin on actin-myosin interactions during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* **489**:20-4.
58. Borovikov Y.S., Rysev N.A., Karpicheva O.E., Redwood C.S. (2011a) Hypertrophic cardiomyopathy-causing Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interactions during the ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **407**:197-201
59. Borovikov Y.S., Avrova S.V., Karpicheva O.E., Robinson C.S., Redwood C.S. (2011b) The effect of the dilated cardiomyopathy-causing Glu40Lys TPM1 mutation on actin-myosin interactions during ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **411**:496-500.
60. Borovikov Y.S., Avrova S.V., Rysev N.A., Sirenko V.V., Simonyan A.O., Chernev A.A., Karpicheva O.E., Piers A., Redwood C.S. (2015) Aberrant movement of  $\beta$ -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* **577-578**:11-23
61. Bremel R.D., Weber A. (1972) Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature* **238**:97-101.

62. Bretscher (1984) Smooth muscle caldesmon. Rapid purification of F-actin cross-linking properties. *J. Biol. Chem.* **259**:12873-80.
63. Brown J.H., Zhou Z., Reshetnikova L., Robinson H., Yammani R.D., Tobacman L.S., Cohen C. (2005) Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:18878-83.
64. Bukatina A.E., Fuchs F. (1994) Effect of phalloidin on the ATPase activity of striated muscle myofibrils. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**:29-36.
65. Burghardt T.P., Garamszegi S.P., Ajtai K. (1997) Probes bound to myosin Cys-707 rotate during length transients in contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:9631-6.
66. Burton D.J., Marston S.B. (1999) Control of shortening speed in single guinea-pig taenia coli smooth muscle cells by  $\text{Ca}^{2+}$ , phosphorylation and caldesmon. *Pflugers Arch.* **437**:267-75.
67. Chalovich J.M., Chock P.B., Eisenberg E. (1981) Mechanism of action of troponin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* **256**:575-8.
68. Chalovich J.M., Greene L.E., Eisenberg E. (1983) Crosslinked myosin subfragment-1: a stable analogue of the subfragment ATP complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:4909-13.
69. Chalovich J.M., Cornelius P., Benson C.E. (1987) Caldesmon inhibits skeletal actomyosin subfragment-1 ATPase activity and the binding of myosin subfragment-1 to actin. *J. Biol. Chem.* **262**:5711-6.
70. Chalovich J.M., Hemric M.E., Velaz L. (1990) Regulation of ATP hydrolysis by caldesmon. A novel change in the interaction of myosin with actin. *Ann. NY Acad. Sci.* **599**:85-99.
71. Chandy I.K., Lo J.C., Ludescher R.D. (1999) Differential mobility of skeletal and cardiac tropomyosin on the surface of F-actin. *Biochemistry* **38**:9286-94.
72. Chaussepied P., Morales M.F., Kassab R. (1988) The myosin SH-2 50-kilodalton fragment crosslink: location and consequences. *Biochemistry* **27**:1778-85.
73. Corbett M.A., Akkari P.A., Domazetovska A., Cooper S.T., North K.N., Laing N.G., Gunning P.W., Hardeman E.C. (2005) An alpha-tropomyosin mutation alters dimer preference in nemaline myopathy. *Ann Neurol.* **57**:42-9.
74. Cooke R. (1995) The actomyosin engine. *FASEB J.* **9**:636-42.

75. Cooke R. (1997) Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **77**:671-97.
76. Craig R., Lehman W. (2001) Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments. *J. Mol. Biol.* **311**:1027-36.
77. Crick F.H.C. (1953) The packing of  $\alpha$ -helices. Simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* **6**:689-97.
78. Dabrowska R., Goch A., Galazkiewicz B., Osinska H. (1985) The influence of caldesmon on ATPase activity of the skeletal muscle actomyosin and bundling of actin filaments. *Biochim. Biophys. Acta* **842**:70-5.
79. Dobrowolski Z., Borovikov Y. S., Nowak E., Gałazkiewicz B., Dabrowska R. (1988) Comparison of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent effects of caldesmon-tropomyosin-calmodulin and troponin-tropomyosin complexes on the structure of F-actin in ghost fibers and its interaction with myosin heads. *Biochim. Biophys. Acta* **956**:140-50.
80. Donner K., Ollikainen M., Ridanpää M., Christen H-J., Goebel H. H., de Visser M., Pelin K., Wallgren-Pettersson C. (2002) Mutations in the  $\beta$ -tropomyosin (TPM2) gene – a rare cause of nemaline myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **12**:151-8.
81. Dufour C., Weinberger R.P., Gunning P. (1998) Tropomyosin isoform diversity and neuronal morphogenesis. *Immunol. Cell Biol.* **76**:424-9.
82. Dyson H.J., Wright P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:197-208.
83. Ebashi S. (1963) Third component participating in the superprecipitation of «natural actomyosin». *Nature* **200**:1010.
84. Ebashi S., Kodama A., Ebashi F. (1968) Troponin. I. Preparation and physiological function. *J. Biochem.* **64**:465-77.
85. Egelman E. H., Francis N., DeRosier D.J. (1982) F-actin is a helix with a random variable twist. *Nature* **298**:131-5.
86. Egelman E.H., Orlova A. (2001) Two conformations of G-actin related to two conformations of F-actin. *Results Probl Cell Differ.* **32**:95-101.
87. Engelhardt V.A., Ljubimova M.N. (1939) Myosin and adenosine triphosphatase. *Nature* **144**:668-9.

88. Fiske C.H., Subbarow Y. (1925) Determination of inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* **66**:375-400.
89. Foster D.B., Huang R., Hatch V., Craig R., Graceffa P., Lehman W., Wang C.L. (2004) Modes of caldesmon binding to actin: sites of caldesmon contact and modulation of interactions by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**:53387-94.
90. Fraser I.D.C., Marston S.B. (1995) In vitro motility analysis of smooth muscle caldesmon control of actin-tropomyosin filament movement. *J. Biol. Chem.* **270**:19688-93.
91. Frisbie S.M., Xu S., Chalovich J.M., Yu L.C. (1998) Characterizations of cross-bridges in the presence of saturating concentrations of MgAMP-PNP in rabbit permeabilized psoas muscle. *Biophys. J.* **74**:3072-82.
92. Fujita H., Lu X., Suzuki M., Ishiwata S., Kawai M. (2004) The effect of tropomyosin on force and elementary steps of the cross-bridge cycle in reconstituted bovine myocardium. *J. Physiol.* **556**:637-49.
93. Gałazkiewicz B., Borovikov Y.S., Dabrowska R. (1987) The effect of caldesmon on actin-myosin interaction in skeletal muscle fibers. *Biochim Biophys Acta.* **916**:368-75.
94. Galińska-Rakoczy A., Engel P., Xu C., Jung H., Craig R., Tobacman L. S., Lehman W. (2008) Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J. Mol. Biol.* **79**:929-35.
95. Geeves M.A. (1991) The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem. J.* **274**:1-14.
96. Geeves M.A., Holmes K.C. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv. Protein Chem.* **71**:161-93.
97. Goody R.S., Hofmann W. (1980) Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1**:101-15.
98. Gordon A.M., Homsher E., Regnier M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**:853–924.
99. Graceffa P. (1997) Arrangement of the COOH-terminal and NH<sub>2</sub>-terminal domains of caldesmon bound to actin. *Biochemistry* **36**:3792-801.



100. Graceffa P. (1999) Movement of smooth muscle tropomyosin by myosin heads. *Biochemistry* **38**:11984-92.
101. Greenfield N.J., Hitchcock-DeGregori S.E. (1995). The stability of tropomyosin, a two stranded coiled-coil protein, is primarily a function of the hydrophobicity of residues at the helix-helix interface. *Biochemistry* **34**:16797-805.
102. Greenfield N., Huang Y.J., Swapna G.V.T., Bhattacharya A., Rapp B., Singh A., Montelione G., Hitchcock-DeGregori S.H. (2006) Solution NMR structure of the junction between tropomyosin molecules: implications for actin binding and regulation. *J. Mol. Biol.* **364**:80-96.
103. Gunning P.W., Schevzov G., Kee A.J., Hardeman E.C. (2005) Tropomyosin isoforms: diving rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell. Biol.* **15**:333-41.
104. Hammell R.L., Hitchcock-DeGregori S.E. (1997) The sequence of the alternatively spliced sixth exon of alpha-tropomyosin is critical for cooperative actin binding but not for interaction with troponin. *J. Biol. Chem.* **272**:22409-16.
105. Harricane M.C., Fabbrizio E., Arpin C., Mornet D. (1992) Involvement of caldesmon at the actin-myosin interface. *Biochem. J.* **287**:633-7.
106. Haselgrove J. (1972) X-ray evidence for a conformational change in the actin containing filaments of vertebrate striated muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**:341-52.
107. Hayashi K., Yamada S., Kanda K., Kimizuka F., Kato I., Sobue K. (1989) 35 kDa fragment of caldesmon conserves two consensus sequences of the tropomyosin-binding domain in troponin T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**:38-45.
108. Hemric M.E., Chalovich J.M. (1990) Characterization of caldesmon binding to myosin. *J. Biol. Chem.* **265**:19672-78.
109. Hitchcock-DeGregori S.E., Song Y., Greenfield N.J. (2002) Functions of tropomyosin's periodic repeats. *Biochemistry* **41**:15036-44.
110. Holmes K.C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**:44-9.
111. Holmes K.C. (1995) The actomyosin interaction and its control by tropomyosin. *Biophys. J. Suppl.* **68**:2-7.
112. Holmes K.C. (1996) Muscle proteins: their actions and interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**:781-9.

113. Holmes K.C. (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction. *Curr. Biol.* **7**:R112-8.
114. Holmes K.C., Geeves M.A. (2000) The structural basis of muscle contraction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**:419-31.
115. Holmes K.C., Schröder R.R., Sweeney H.L., Houdusse A. (2004) The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **359**:1819-28.
116. Holthauzen L.M.F., Corrêa F., Farah C.S. (2004) Ca<sup>2+</sup>-induced rolling of tropomyosin in muscle thin filaments. *J. Biol. Chem.* **279**:15204-13.
117. Houdusse A., Sweeney H.L. (2001) Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr. Opin. Str. Biol.* **11**:182-94.
118. Huber P.A., Fraser I.D., Marston S.B. (1995) Location of smooth-muscle myosin and tropomyosin binding sites in the C-terminal 288 residues of human caldesmon. *Biochem. J.* **312**:617-25.
119. Huber P.A., El-Mezgueldi M., Grabarek Z., Slatter D.A., Levine B.A., Marston S.B. (1996) Multiple-sited interaction of caldesmon with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin. *Biochem. J.* **316**:413-20.
120. Huxley A.F., Niedergerke R. (1954) Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibers. *Nature* **173**:971-3.
121. Huxley H.E., Hanson J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**:973-6.
122. Huxley H.E. (1972) Structural changes in the actin and myosin containing filaments during contraction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**:361-76.
123. Ikebe M., Reardon S. (1988) Binding of caldesmon to smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **263**:3055-8.
124. Irving M. (1996) Steady-state polarization from cylindrically symmetric fluorophores undergoing rapid restricted motion. *Biophys. J.* **70**:1830-5.
125. Ishiwata S., Fujime S. (1972) Effect of calcium ions on the flexibility of reconstituted thin filaments of muscle studied by quasielastic scattering of laser light. *J. Mol. Biol.* **68**:511-22.
126. Jenkins F.A., White H.E. (1957) *In fundamentals of optics.* McGraw-Hill New York 524-31.

127. Jeong K.Y., Lee J., Lee I.Y., Ree H.I., Hong C.S., Yong T.S. (2004) Analysis of Amino Acid Sequence Variations and Immunoglobulin E-Binding Epitopes of German Cockroach Tropomyosin. *CVI* **22**: 874-878.
128. Johnson W.C.J. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**:145-66.
129. Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F., Holmes K.C. (1990) Atomic structure of the actin: DNase 1 complex. *Nature* **347**:37-44.
130. Kakol I., Borovikov Y.S., Szczesna D., Kirillina V.P., Levitsky D.I. (1987) Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost single fibre induced by either phosphorylated or dephosphorylated heavy meromyosin. *Biochim. Biophys. Acta* **913**:1-9.
131. Katayama E., Ikebe M. (1995) Mode of caldesmon binding to smooth muscle thin filament: possible projection of the amino-terminal of caldesmon from native thin filament. *Biophys. J.* **68**:2419-28.
132. Kishino A., Yanagida T. (1988) Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334**:74-6.
133. Kohn W.D., Kay C.M., Hodges R.S. (1997) Salt effects on protein stability: two-stranded alpha-helical coiled-coils containing inter- or intrahelical ion pairs. *J. Mol. Biol.* **267**:1039-52.
134. Kremneva E., Boussouf S., Nikolaeva O., Maytum R., Geeves M.A., Levitsky D.I. (2004) Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin. *Biophys. J.* **87**:3922-33.
135. Kulikova N., Dabrowska R. (1996) The influence of caldesmon on papain proteolysis of monomeric smooth muscle myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**:195-202.
136. Kulikova N., Pronina O.E., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2006) Caldesmon restricts the movement of both C- and N-termini of tropomyosin of F-actin in ghost fibers during the actomyosin ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**:280-6.
137. Kulikova N., Pronina O.E., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2007) Caldesmon inhibits the actin-myosin interaction by changing its spatial

- orientation and mobility during the ATPase activity cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**:461-6.
138. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
  139. Lamkin M., Tao T., Lehrer S.S. (1983) Tropomyosin-troponin and tropomyosin-actin interactions: a fluorescence quenching study. *Biochemistry* **22**:3053-8.
  140. Landis C., Back N., Homsher E., Tobacman L.S. (1999) Effects of tropomyosin internal deletions on thin filament function. *J. Biol. Chem.* **274**:31279–85.
  141. Lee Y.-H., Gallant C., Guo H.Q., Li Y., Wang A., Morgan K.G. (2000) Regulation of vascular smooth muscle tone by N-terminal region of caldesmon. *J. Biol. Chem.* **275**:3213-20.
  142. Lees-Miller J.P., Helfman D.M. (1991) The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *BioEssays* **13**:429-37.
  143. Lehman W., Craig R., Vibert P. (1994) Ca<sup>2+</sup>-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature* **368**:65-7.
  144. Lehman W., Hatch V., Korman V., Rosol M., Thomas L., Maytum R., Geeves M.A., Van Eyk J.E., Tobacman L.S., Craig R. (2000) Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J. Mol. Biol.* **302**:593-606.
  145. Lehrer S.S., Golitsina N.L., Geeves M.A. (1997) Actin-tropomyosin activation of myosin subfragment 1 ATPase and thin filament cooperativity. The role of tropomyosin flexibility and end-to-end interactions. *Biochem.* **36**:13449-54.
  146. Lehrer S.S., Geeves M.A. (1998) The muscle thin filament as a classical cooperative/allosteric regulatory system. *J. Mol. Biol.* **277**:1081-9.
  147. Li Y., Mui S., Brown J.H., Reshetnikova L., Tobacman L.S., Cohen C. (2002) The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7378-83.
  148. Lorenz M., Popp D., Holmes K. (1993) Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* **234**:826-36.

149. Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G., Baker H. (1969) Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* **42**:1-29.
150. Lu S.M., Hodges R.S. (2004) Defining the minimum size of a hydrophobic cluster in two-strand alpha-helical coiled-coils: effects on protein stability. *Protein Sci.* **13**:714-26.
151. Luo Y., Wu J.L., Gergely J., Tao T. (1997) Troponin T and  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of the distance between Cys48 and Cys133 of troponin I in the ternary troponin complex and reconstituted thin filaments. *Biochemistry* **36**:11027-35.
152. Lymn R.W., Taylor E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**:4617-24.
153. Marston S.B. (1982) The rates of formation and dissociation of actin-myosin complexes. *Biochem. J.* **230**:453-60.
154. Marston S.B., Smith C.W.J. (1985) The thin filaments of smooth muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **6**:669-708.
155. Marston S.B., Redwood C.S. (1991) The molecular anatomy of caldesmon. *Biochem. J.* **279**:1-16.
156. Marston S.B., Redwood C.S. (1992) Inhibition of actin-tropomyosin activation of myosin MgATPase activity by the smooth muscle regulatory protein caldesmon. *J. Biol. Chem.* **267**:16796-800.
157. Marston S.B., Redwood C.S. (1993) The essential role of tropomyosin in cooperative regulation of smooth muscle thin filament activity by caldesmon. *J. Biol. Chem.* **268**:12317-20.
158. Marston S.B., Fraser I.D.C., Huber P.A.J. (1994) Smooth muscle caldesmon controls the strong binding interactions between actin, tropomyosin and myosin. *J. Biol. Chem.* **269**:32104-9.
159. Maytum R., Lehrer S.S., Geeves M.A. (1999) Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* **38**:1102-10.
160. Maytum R., Geeves M., Konrad M. (2000) Actomyosin regulatory properties of yeast tropomyosin are dependent upon N-terminal modification. *Biochemistry* **39**:11913-20.
161. Memo M., Marston S. (2013) Skeletal muscle myopathy mutations at the actin tropomyosin interface that cause gain- or loss-of-function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **34**:165–169.

162. McKillop D.F., Geeves M.A. (1993) Regulation of the interaction between actin and myosin S1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* **65**:693-701.
163. McLachlan A.D., Stewart M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. *J. Mol. Biol.* **98**:293-304.
164. Miki M., dos Remedios C.G., Barden J.A. (1987) Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61, Cys-374 in actin, a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding. *Eur. J. Biochem.* **168**:339-45.
165. Miki M., Hai H., Saeki K., Shitaka Y., Sano K., Maeda Y., Wakabayashi T. (2004) Fluorescence resonance energy transfer between points on actin and the C-terminal region of tropomyosin in skeletal muscle thin filaments. *J. Biochem.* **136**:39-47.
166. Michele D.E., Albayya F.P., Metzger J.M. (1999) A nemaline myopathy mutation in alpha-tropomyosin causes defective regulation of striated muscle force production. *J. Clin. Invest.* **104**:1575-81.
167. Mirza M., Marston S., Willott R., Ashley C., Mogensen J., McKenna W., Robinson P., Redwood C., Watkins H. (2005) Dilated cardiomyopathy mutations in thin filament regulatory proteins result in a common functional phenotype. *J. Biol. Chem.* **280**:28498-506.
168. Mirza M., Robinson P., Kremneva E., Copeland O., Nikolaeva O., Watkins H., Levitsky D., Redwood C., El-Mezgueldi M., Marston S. (2007) The effect of mutations in alpha-tropomyosin (E40K and E54K) that cause familial dilated cardiomyopathy on the regulatory mechanism of cardiac muscle thin filaments. *J. Biol. Chem.* **282**:13487-97.
169. Monteiro P.B., Lataro C., Ferro, J.A, Reinach F.C. (1994) Functional a-tropomyosin produced in *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* **269**:10461-10466.
170. Moody C.J., Lehman W., Craig R. (1990) Caldesmon and the structure of smooth muscle thin filaments: electron microscopy of isolated thin filaments. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **11**:176-185.
171. Moraczewska J., Greenfield N.J., Liu Y., Hitchcock-DeGregori S.E. (2000) Alteration of tropomyosin function and folding by a nemaline myopathy-causing mutation. *Biophys. J.* **79**:3217-25.
172. Moraczewska J., Gruszczynska-Biegala J., Redowicz M., Khaitlina S.Y., Strzelecka-Golaszewska H. (2004) The DNase-I binding loop of actin

- may play a role in the regulation of actin-myosin interaction by tropomyosin/troponin. *Biol. Chem.* **279**:31197-204.
173. Morales M.F., Botts J. (1979) On the molecular basis for chemomechanical energy transduction in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:3857-9.
  174. Morales M.F. (1984) Calculation of the polarized fluorescence from a labeled fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:8145-56.
  175. Mueller H., Perry S.V. (1962) The degradation of heavy meromyosin by trypsin. *Biochem. J.* **85**:431-9.
  176. Narita A., Yasunaga T., Ishikawa T., Mayanagi K., Wakabayashi T. (2001) Ca<sup>2+</sup>-induced switching of troponin and tropomyosin on actin filaments as revealed by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **308**:241-61.
  177. Nesmelov Y.E., Agafonov R.V., Burr A.R., Weber R.T., Thomas D.D. (2008) Structure and dynamics of the force-generating domain of myosin probed by multifrequency electron paramagnetic resonance. *Biophys. J.* **95**:247-56.
  178. Nevzorov I.A., Nikolaeva O.P., Kainov Y.A., Redwood C.S., Levitsky D.I. (2011) Conserved noncanonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule. *J. Biol. Chem.* **286**:15766-72.
  179. Nevzorov I., Redwood C., Levitsky D. (2008) Stability of two beta-tropomyosin isoforms: effects of mutation Arg91Gly. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **29**:173-6.
  180. Nichei T., Mendelson R., Botts J. (1974) Use of fluorescence polarization to observe changes in attitude of S-1 motietes in muscle fibres. *Biophys. J.* **14**:236-42.
  181. Nitao L.K., Todd O. Yeates, Reisler E. (2002) Conformational dynamics of the SH1-SH2 helix in the transition states of myosin subfragment-1. *Biophys. J.* **83**:2733-41.
  182. Nowak E., Borovikov Y.S., Dabrowska R. (1989) Caldesmon weakens the bonding between myosin heads and actin in ghost fibers. *Biochim. Biophys. Acta* **999**:289-92.
  183. Nowak E., Borovikov Y.S., Khoroshev M.I., Dabrowska R. (1991) Troponin I and caldesmon restrict alterations in actin structure occurring on binding of myosin subfragment 1. *FEBS Lett.* **281**:51-4.

184. Oda T., Namba K., Maeda Y. (2005) Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophys. J.* **88**:2727-36.
185. Okamoto Y., Sekine T. (1985) A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biol. Chem.* **98**:1143-5.
186. Olson T.M., Kishimoto N.Y., Whitby F.G., Michels V.V. (2001) Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**:723-32.
187. Onishi H., Morales M.F. (2007) A closer look at energy transduction in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:12714-9.
188. Oosawa F. (1983) Macromolecular assembly of actin. Muscle and non-muscle motility. *New York: Academic Press* 151-216.
189. Orlova A., Egelman E.H. (1997) Cooperative rigor binding of myosin to actin is a function of F-actin structure. *J. Mol. Biol.* **265**:469-74.
190. Page R., Lindberg U., Schutt C.E. (1998) Domain Motions in Actin. *J. Mol. Biol.* **280**:463-74.
191. Payne M.R., Rudnick S.E. (1984) Tropomyosin as a modulator of microfilaments. *Trends Biochem. Sci.* 361-3.
192. Perry S.V. (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**:5-49.
193. Pirani A., Vinogradova M.V., Curmi P.M., King W.A., Fletterick R.J., Craig R., Tobacman L.S., Xu C., Hatch V., Lehman W. (2006) An atomic model of the thin filament in the relaxed and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated states. *J. Mol. Biol.* **357**:707-17.
194. Pittenger M.F., Kistler A., Helfman D.M. (1995) Alternatively spliced exons of the beta tropomyosin gene exhibit different affinities for F-actin, effects with nonmuscle caldesmon. *J. Cell Sci.* **108**:3253-65.
195. Popp D., Maeda Y., Stewart A.A., Holmes K.C. (1991) X-ray diffraction studies on muscle regulation. *Adv. Biophys.* **27**:89-103.
196. Potter J.D., Gergely J. (1974) Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of muscle contraction. *Biochemistry* **13**:2697-703.
197. Prochniewicz-Nakayama E., Yanagida T., Oosawa F. (1983) Studies on conformation of F-actin in muscle fibers in the relaxed state, rigor, and during contraction using fluorescent phalloidin. *J. Cell Biol.* **97**:1663-7.



198. Prochniewicz E., Walseth T.F., Thomas D.D. (2004) Structural dynamics of actin during active interaction with myosin: different effects of weakly and strongly bound myosin heads. *Biochemistry* **43**:10642-52.
199. Pronina O.E., Makuch R., Wrzosek A., Dąbrowska R., Borovikov Y.S. (2007a) Caldesmon inhibits both force development and transition of actin monomers from "OFF" to "ON" conformational state by changing its position in thin filaments. *Int. Cell. Biol.* **31**:394-404.
200. Pronina O.E., Robinson P., Borovikov Y.S., Redwood C.S. (2007b) Alteration of  $\beta$ -tropomyosin function by nemaline myopathy-causing mutations E117K and Q147P. In *Abstracts of 51th Annual Meeting of Biophysical Society*, Baltimore, USA, Biophys. J. B342.
201. Rajan S., Ahmed R.P.H., Jagatheesan G., Petrashevskaya N., Boivin G.P., Urboniene D., Arteaga G. M., Wolska B. M., Solaro R. J., Liggett S. B., Wieczorek D. F. (2007) Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity. *Circ. Res.* **101**:205-14.
202. Rayment I., Rypiewski W., Schmidt-Base K., Smith R., Tomchick D., Benning M., Winkelmann D., Wessenberg G., Holden H. (1993a) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**:50-8.
203. Rayment I., Holden H.M., Whittaker M., Yohn C.B., Holmes K.C., Milligan R.A. (1993b) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**:58-65.
204. Redwood C.S., Marston S.B. (1993) Binding and regulatory properties of expressed functional domains of chicken gizzard smooth muscle caldesmon. **268**:10969-76.
205. Robinson P., Lipscomb S., Preston L.C., Altin E., Watkins H., Ashley C.C., Redwood C.S. (2007) Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and beta-tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function. *FASEB J.* **21**:896-905.
206. Robinson P., Griffiths P.J., Watkins H., Redwood C.S. (2007) Dilated and hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin and alpha-tropomyosin have opposing effects on the calcium affinity of cardiac thin filaments. *Circ. Res.* **101**:1266-73.

207. Roopnarine O., Thomas D.D. (1996) Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* **70**:2795-806.
208. Roopnarine O., Szent-Györgyi A.G., Thomas D.D. (1998) Microsecond rotational dynamics of spin-labeled myosin regulatory light chain induced by relaxation and contraction of scallop muscle. *Biochemistry* **37**:14428-36.
209. Root D.D., Reisler E. (1992) Cooperativity of thiol-modified myosin filaments: ATPase and motility assays of myosin function. *Biophys. J.* **63**:730-40.
210. Rysev N.A., Karpicheva O.E., Redwood C.S., Borovikov Y.S. (2011) The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* **1824**: 366-373.
211. Sakamoto T., Amitani I., Yokota E., Ando T. (2000) Direct observation of processive movement by individual myosin V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**:586-90.
212. Sen A., Chalovich J.M. (1998) Caldesmon-actin-tropomyosin contains two types of binding sites for myosin S1. *Biochemistry* **37**:7526-31.
213. Singh A., Hitchcock-DeGregori S.E. (2006) Dual requirement for flexibility, specificity for binding of the coiled-coil tropomyosin to its target, actin. *Structure* **14**:43-50.
214. Shy G.M., Engel W.K., Somers J.E., Wanko T. (1963) Nemaline myopathy. A new congenital myopathy. *Brain* **86**:793-810.
215. Smith C.W., Pritchard K., Marston S.B. (1987) The mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of vascular smooth muscle thin filaments by caldesmon and calmodulin. *J. Biol. Chem.* **262**:116-22.
216. Sobue K., Muramoto Y., Fujita M., Kakiuchi S. (1981) Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:5652-5.
217. Sobue K., Morimoto K., Kanda K., Maruyama K., Kakiuchi S. (1982) Reconstitution of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive gelation of actin filaments with filamin, caldesmon and calmodulin. *FEBS Lett.* **138**:289-92.
218. Spudich J.A., Watt S. (1971) Regulation of rabbit skeletal muscle contraction. 1, Biochemical studies of interaction of tropomyosin-

- troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**:4866-71.
219. Stewart M., McLachlan A.D. (1975) Fourteen actin-binding sites on tropomyosin? *Nature* **257**:331-3.
  220. Straub F.B. (1942) Actin. *Stud. Med. Inst. Szeged.* **2**:3-15.
  221. Strzelecka-Golaszewska H., Moraczewska J., Khaitlina S. Y., Mossakowska M. (1993) Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in G-actin using limited proteolytic digestion. *Eur. J. Biochem.* **211**:731-42.
  222. Sumida J.P., Wu E., Lehrer S.S. (2008) Conserved Asp-137 imparts flexibility to tropomyosin and affects function. *J. Biol. Chem.* **283**:6728-34.
  223. Sung S.S., Brassington A.M., Grannatt K., Rutherford A., Whitby F.G., Krakowiak P.A., Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M. (2003) Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins cause distal arthrogryposis syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **72**:681-90.
  224. Sutoh K. (1983) Mapping of actin-binding sites on the heavy chain of myosin subfragment 1. *Biochemistry* **22**:1579-1585.
  225. Sutoh K., Ando M., Sutoh K., Toyoshima Y.Y. (1991) Site-directed mutations of Dictyostelium actin: disruption of a negative charge cluster at the N terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7711-4.
  226. Szent-Gyorgyi A.G. (1949) Free-energy relations, contraction of actomyosin. *Biol. Bull.* **96**:140-61.
  227. Szczesna D., Borovikov Y.S., Kakol I., Sobieszek A. (1989) Interaction of tropomyosin with F-actin-heavy meromyosin complex. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **370**:399-407.
  228. Szczesna D., Graceffa P., Wang C. L., Lehrer S.S. (1994) Myosin S1 changes the orientation of caldesmon on actin. *Biochemistry* **33**:6716-20.
  229. Szpacenko A., Dabrowska R. (1986) Functional domains of caldesmon. *FEBS Lett.* **202**:182-6.
  230. Squire J.M., Morris E.P. (1998) *FASEB J.* **12**:761-771.
  231. Tanaka H., Iwane A.H., Yanagida T. (2000) *Biophys. J.* **78**:234a.
  232. Tao T., Lamkin M., Lehrer S.S. (1983) Excitation energy transfer studies of the proximity between tropomyosin and actin in reconstituted skeletal muscle thin filaments. *Biochemistry* **22**:3059-66.

233. Thierfelder L., Watkins H., MacRae C. (1994) Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* **77**:701-12.
234. Thomas D.D., Seidel J.C., Gergely J. (1979) Rotational dynamics of spin-labeled F-actin in the sub-millisecond time range. *J. Mol. Biol.* **132**:257-73.
235. Thomas D.D., Cooke R. (1980) Orientation of spin-labeled myosin heads in glycerinated muscle fibers. *Biophys. J.* **32**:891-905.
236. Thomas D.D. (1994) Angular disorder of weak-binding actomyosin cross-bridges. *Biophys. J.* **66**:1272-3.
237. Thomas D.D., Ramachandran S., Roopnarine O., Hayden D.W., Ostap M.E. (1995) The mechanism of force generation in myosin: A disorder-to-order transition, coupled to internal structural changes. *Biophys. J.* **68**:135s-41s.
238. Tobacman L.S., Butters C.A. (2000) A new model of cooperative myosin-thin filament binding. *J. Biol. Chem.* **275**:27587-93.
239. Tokunaga M., Sutoh K., Wakabayashi T. (1991) Structure and structural change of the myosin head. *Advances in Biophysics* **27**:157-67.
240. Tong S.W., Elzinga M. (1990) Amino acid sequence of rabbit skeletal muscle myosin. 50-kDa fragment of the heavy chain. *J. Biol. Chem.* **265**:4893-901.
241. Toyoshima Y.Y., Kron S.J., McNally E.M., Niebling K.R., Toyoshima C., Spudich J.A. (1987) Myosin S1 is sufficient to move actin filaments in vitro. *Nature* **328**:536-9.
242. Tregear R.T., Mendelson R.A. (1975) Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle. *Biophys. J.* **15**:455-67.
243. Trybus K.M., Krementsova E., Freyzon Y. (1999) Kinetic characterization of a monomeric unconventional myosin V construct. *J. Biol. Chem.* **274**:27448-56.
244. Uyeda T.Q., Ruppel K.M., Spudich J.A. (1994) Enzymatic activities correlate with chimaeric substitutions at the actin-binding face of myosin. *Nature* **368**:567-9.
245. Velaz L., Ingraham R.H., Chalovich J.M. (1990) Dissociation of the effect of caldesmon on the ATPase activity and on the binding of

- smooth heavy meromyosin to actin by partial digestion of caldesmon. *J. Biol. Chem.* **265**:2929-34.
246. Vibert P., Craig R., Lehman W.J. (1993) Three dimensional reconstruction of caldesmon-containing smooth muscle thin filaments. *Cell Biol.* **123**:313-21.
  247. Vibert P., Craig R., Lehman W. (1997) Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* **266**:8-14.
  248. Vikhorev P.G., Vikhoreva N.N., Vorotnikov A.V., Krymsky M.A., Borovikov Y.S. (1999) N-terminal myosin-binding site of caldesmon inhibits the conformation changes in F-actin induced by heavy meromyosin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **20**:852.
  249. Vorotnikov A.V., Marston S.B., Huber P.A.J. (1997) Location and functional characterization of myosin contact sites in smooth muscle caldesmon. *Biochem. J.* **328**:211-8.
  250. Xie L., Schoenberg M. (1998) Binding of SH-1/SH-2-modified myosin subfragment-1 to actin. *Biochemistry* **37**:8048-53.
  251. Wang C.-L.A., Wang L.-W.C., Xu S., Lu R.C., Saavedra-Alanis V., Bryan J. (1991) Localization of the calmodulin- and the actin-binding sites of caldesmon. *J. Biol. Chem.* **266**:9166-72.
  252. Weeds A.G., Pope B. (1977) Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effects of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.* **111**:129-57.
  253. Wells J.A., Yount R.G. (1979) Active site trapping of nucleotides by crosslinking two sulfhydryls in myosin subfragment 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:4966-70.
  254. Wilson M.G.A., Mendelson R.A. (1983) A comparison of order and orientation of cross-bridges in rigor and relaxed muscle fibres using fluorescence polarization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**:671-93.
  255. White S.P., Cohen C., Phillips G.N. (1987) Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* **325**:826-8.
  256. Yanagida T., Oosawa F. (1978) Polarized fluorescence from e-ADP incorporated into F-actin in a myosin-free single fibre: Conformation of F-action and changes induced in it by heavy meromyosin. *J. Mol. Biol.* **126**:507-24.
  257. Yanagida T. (1984) Angles of fluorescently labelled myosin heads and actin monomers in contracting and rigor stained muscle fiber. *Contractile Mechanisms in Muscle. NY and London Plenum Press.*

258. Yanagida T., Kitamura K., Tanaka H., Hikikoshi Iwane A., Esaki S. (2000) Single molecule analysis of the actomyosin motor. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:20-5.
259. Yanagisawa M., Hamada Y., Katsuragawa Y., Imamura M., Mikawa T., Masaki T. (1987) Complete primary structure of vertebrate smooth muscle myosin heavy chain deduced from its complementary DNA sequence. Implications on topography and function of myosin. *J. Mol. Biol.* **198**:143-57.

## **Благодарности**

Я приношу глубокую благодарность моему научному руководителю д. б. н., профессору Юрию Сергеевичу Боровикову за предоставленную возможность заниматься данной темой, внимательное отношение и помощь в работе.

Искренне признателен старшим научным сотрудникам нашей лаборатории к. б. н. Станиславе Викторовне Авровой и к. б. н. Ольге Евгеньевне Карпичевой за помощь в освоении биохимических методов, постоянную поддержку и терпение.

Я сердечно благодарен всем сотрудникам лаборатории Молекулярных основ клеточной подвижности за создание творческой и доброжелательной атмосферы.