

СИМОНЯН АРМЕН ОГАНЕСОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В АЛЬФА- И БЕТА-ТРОПОМИОЗИНЕ НА
РЕГУЛЯЦИЮ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ЦИКЛЕ ГИДРОЛИЗА
АТФ**

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Крутецкая Зоя Иринарховна

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Актин: структура и функции	13
<i>1.1.1 Историческая справка по изучению актина</i>	13
<i>1.1.2 Структурно-функциональные характеристики актина</i>	14
1.2 Миозин: структура и функции	23
1.3 Тропомиозин: структура, функции, патология	31
<i>1.3.1 Изоформы тропомиозина</i>	31
<i>1.3.2 Структура тропомиозина</i>	34
<i>1.3.3 Модель стерического блокирования</i>	43
<i>1.3.4 Патологии, ассоциированные с мутациями в генах, кодирующих изоформы тропомиозина</i>	46
1.3.4.1 Немалиновая миопатия.....	46
1.3.4.2 Кэп-миопатия.....	49
1.3.4.3 Врождённая диспропорция типов волокон.....	52
1.3.4.4 Дистальный артрогрипоз.....	54
1.3.4.5 Мутации в тропомиозине, вызывающие разные патологии и их перекрытвании.....	55
1.4 Заключение по обзору литературы и постановка задач исследования	58
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	59
2.1 Получение глицеринизированных мышечных волокон	59
2.2 Приготовление «теневых» мышечных волокон	59
2.3 Получение и модификация актина	59
2.4 Выделение миозина из скелетных мышц кролика	61
2.5 Получение и модификация субфрагмента 1 миозина	61
2.6 Получение и модификация рекомбинантных α- и β-тропомиозина	63
2.7 Определение концентраций исследуемых белков	63
2.8 ДСН-ПААГ-электрофорез	64
2.9. Метод поляризационной флуориметрии	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1 Исследование β-тропомиозина с мутацией Arg91Gly	67
<i>3.1.1 Влияние мутации Arg91Gly в β-тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле</i>	67

3.1.2 Влияние мутации <i>Arg91Gly</i> в β -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле	71
3.1.3 Обсуждение результатов по исследованию β -тропомиозина с мутацией <i>Arg91Gly</i>	77
3.2 Исследование β-тропомиозина с мутацией <i>Gln147Pro</i>.....	80
3.2.1 Влияние мутации <i>Gln147Pro</i> в β -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле	80
3.2.2 Влияние мутации <i>Gln147Pro</i> в β -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле	84
3.2.3 Обсуждение результатов по исследованию β -тропомиозина с мутацией <i>Gln147Pro</i>	90
3.3 Исследование α-тропомиозина с мутацией <i>Glu240Lys</i>	92
3.3.1 Влияние мутации <i>Glu240Lys</i> в α -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле	92
3.3.2 Влияние мутации <i>Glu240Lys</i> в α -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле	96
3.3.3 Обсуждение результатов по исследованию α -тропомиозина с мутацией <i>Glu240Lys</i> ...	102
3.4 Исследование α-тропомиозина с мутацией <i>Arg244Gly</i>	105
3.4.1 Влияние мутации <i>Arg244Gly</i> в α -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле	105
3.4.2 Влияние мутации <i>Arg244Gly</i> в α -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле	108
3.4.3 Обсуждение результатов по исследованию α -тропомиозина с мутацией <i>Arg244Gly</i> ...	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
БЛАГОДАРНОСТИ.....	145

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ**AM – актомиозин****АДФ (ADP) – аденозиндифосфат****АТФ (ATP) – аденозинтрифосфат****AMP-PNP – аденозин 5'-[β'γ-
имида]трифосфат****ДСН – додецилсульфат натрия****ПААГ – полиакриламидный гель****ПЦР – полимеразно-цепная реакция****ТМ – тропомиозин****ТН – тропонин****ДА – дистальный артрогрипоз****НМ – немалиновая миопатия****ВДТВ (CFTD) – врождённая****диспропорция типов****волокон****КМ – кэп-миопатия****ДТТ – дитиотреитол****ЭДТА – этилендиаминтетраацетат****F-актин – фибриллярный актин****ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат****G-актин – глобулярный актин****1,5-IAEDANS – N-йодоацетил-N'-(5-
сульфо-1-нафтило)этилендиамин****5-IAF – 5-йодоацетамидофлуоресцеин****ФМСФ – фенилметилсульфонил****флуорид****S1 – субфрагмент-1 миозина****Трис – три(оксиметил)аминометан**

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Молекулярный механизм мышечного сокращения основан на циклическом взаимодействии двух белков – актина и миозина, сопровождающемся гидролизом аденозинтрифосфата (АТФ). Этот принципиальный механизм был концептуализирован в «модель скользящих филаментов» Э. Хаксли (Huxley, 1957) на основании двух классических работ (Huxley, Niedergerke, 1954; Huxley, Hanson, 1954). Модель скользящих филаментов послужила серьёзным толчком для изучения парадигмы мышечного сокращения на микроскопическом уровне. В свете этих представлений, ключевой вопрос, поставленный перед исследователями мышц сменился с «как мышца укорачивается?» на «как генерируется сила скольжения между двумя группами филаментов?». В поисках ответа на новый вопрос было выяснено, что процесс взаимодействия миозина с актином регулируется тропомиозин-тропониновым комплексом и ионами кальция (Ca^{2+}) (Ebashi, Endo, 1968). Дальнейшие исследования позволили определить аминокислотные последовательности белков сократительного аппарата, установить трёхмерные структуры некоторых белков и выявить основные функции, выполняемые ими в мышце.

Несмотря на достигнутый прогресс в исследовании молекулярных механизмов функционирования сократительного аппарата скелетной и сердечной мускулатуры, существует целый ряд нерешенных проблем. Среди таких можно выделить сложности в получении трёхмерных структур комплексов актин-миозин-тропомиозин-тропонин в отсутствие или в присутствии нуклеотида. Известные структуры комплексов актин-субфрагмент-1 (Rayment et al., 1993a; Holmes et al., 2003), актин-тропомиозин (Li et al., 2011; von der Ecken et al., 2015), актин-тропомиозин-тропонин (Yang et al., 2014) и актин-тропомиозин-субфрагмент1 (Behrmann et al., 2012) были получены компьютерной подгонкой структур, методами молекулярного моделирования и криоэлектронной микроскопии.

В последние годы возрос интерес к исследованию функционирования регуляторного белка тропомиозина, в связи с обнаружением в последнем множества мутаций у пациентов с патологиями скелетных мышц. Оказалось, что одиночные мутации в тропомиозине могут приводить к скоплению в миофибриллах белкового материала в виде немалиновых телец или шапкообразных структур, к нарушениям структуры саркомера и к диспропорции типов мышечных волокон. Исследование структурно-функциональных особенностей мутантных тропомиозинов показало, что большинство мутаций меняют сродство тропомиозина к актину, влияют на спиральную структуру тропомиозина, а также на Ca^{2+} -чувствительность сократительной системы в присутствии этих мутантов и способность тропомиозина ингибировать АТФазную активность актомиозинового комплекса. Эти наблюдения позволили

классифицировать молекулярные фенотипы миопатий по одному из исследованных показателей – по Ca^{2+} -чувствительности сокращения. Согласно этой классификации выделяют два молекулярных фенотипа при мышечной слабости: с усилением функциональной активности сокращения (гиперсократимость, высокая Ca^{2+} -чувствительность) или потерей функциональной активности сокращения (гипосократимость, низкая Ca^{2+} -чувствительность)¹ (см. напр. Marttila et al., 2014). При этом подавляющее большинство мутаций в α - (продукт гена *TPM3*) и β -тропомиозине (продукт гена *TPM2*) скелетных мышц человека приводят к потере функциональной активности сокращения. Попытки объяснить, каким образом мутация в той или иной позиции аминокислотной последовательности тропомиозина приводит к определённому молекулярному фенотипу, увенчались определёнными соображениями для группы мутаций (Marston et al., 2013; Memo, Marston, 2013; Donkervoort et al., 2015). В этих работах было показано, что одиночные мутации с делецией аминокислотных остатков или возникающие в позициях аминокислотных остатков в тропомиозине, расположенных непосредственно после остатков, предположительно взаимодействующих с актином, приводят к гиперсократительному молекулярному фенотипу. Всё же остаётся непонятным, какие структурно-функциональные изменения в тропомиозине приводят к такому эффекту. Также не ясны причины проявления гипосократительного молекулярного фенотипа, вызываемого большинством мутаций в тропомиозине.

Недавние исследования методом поляризационной флуориметрии, целью которых явилось выяснение механизмов нарушения функционирования актомиозиновой системы в присутствии мутантных форм тропомиозина сердечной и скелетной мышц человека, показывают, что проявление аномального молекулярного фенотипа при некоторых мутациях, скорее всего, связано с дефектным позиционированием мутантов на актине и ненормальному ответу актлина и головок миозина (Borovikov et al., 2009b,c, 2011a,b; Rysev et al., 2012; Боровиков и др., 2013; Karpicheva et al., 2013, 2014). Так, одиночные мутации Asp175Asn и Glu180Gly в α -тропомиозине сердечной мышцы человека (продукт гена *TPM1*), обнаруженные у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией, и одиночные мутации Glu40Lys и Glu54Lys в α -тропомиозине сердечной мышцы человека, обнаруженные у пациентов с дилатационной кардиомиопатией, в течение АТФазного цикла приводят к сдвигу тропомиозиновых тяжей в направлении к открытой позиции на актине, открывая больше по сравнению с нормой сайтов связывания миозина на актине и переключая больше мономеров актлина во включённое состояние (Borovikov et al., 2009b; Borovikov et al., 2011a; Rysev et al., 2012). Эти структурно-функциональные изменения, по мнению авторов, могут являться причиной проявления высокой

¹ От англ. *gain of function* и *loss of function*, соответственно

Ca²⁺-чувствительности сокращения, описанной в присутствии этих мутантов (Bing et al., 2000; Mirza et al., 2005), и развития патологий. Две другие мутации – Glu41Lys и Glu117Lys в β -тропомиозине скелетных мышц человека (продукт гена *TPM2*), обнаруженные у пациентов с немалиновой миопатией или кэп-миопатией (Donner et al., 2002; Tajsharghi et al., 2007), в течение АТФазного цикла приводят к расположению тропомиозина ближе к внешнему домену актина, закрывая тем самым больше, чем в норме, миозин-связывающих сайтов на актине, и ингибируют переход миозиновых головок из слабой в сильную форму связывания (Karpicheva et al., 2013, 2014; Bogovikov et al., 2015). По мнению авторов, такой эффект может объяснить более низкую, чем в норме, Ca²⁺-чувствительность сокращения скелетной мышцы, наблюдаемую в присутствии тропомиозинов с мутациями Glu41Lys и Glu117Lys (Marttila et al., 2012). Эти результаты показывают, что метод поляризационной флуориметрии является информативным и адекватным методом в исследовании молекулярных механизмов нарушения актин-миозинового взаимодействия, вызванного мутациями в тропомиозине.

В настоящей работе методом поляризационной флуориметрии исследовали влияние мутаций Arg91Gly и Gln147Pro в β -тропомиозине (*TPM2*) и Glu240Lys и Arg244Gly в α -тропомиозине (*TPM1*) на пространственную организацию, локализацию и гибкость актина и тропомиозина, а также на подвижность головок миозина в теневом мышечном волокне на моделируемых этапах цикла гидролиза АТФ. Мутация Arg91Gly в β -тропомиозине была идентифицирована у пациента с дистальным артрогрипозом (Sung et al., 2003). Исследования показали, что АТФазная активность актомиозина в присутствии тропомиозина с мутацией Arg91Gly выше при всех исследованных концентрациях кальция по сравнению с тропомиозином дикого типа (Robinson et al., 2007). Это означает, что в присутствии этого мутанта проявляется гиперсократительный молекулярный фенотип. Методом тепловой денатурации было установлено, что мутация Arg91Gly дестабилизирует молекулу тропомиозина: при этом дестабилизирующее действие мутации не является локальным, а, как предполагается, распространяется вдоль всей длины молекулы β -тропомиозина (Невзоров и др., 2008). Другая мутация – Gln147Pro, в β -тропомиозине была обнаружена у пациента с немалиновой миопатией (Donner et al., 2002) или с кэп-миопатией (Brandis et al., 2008). Оказалось, что тропомиозин с мутацией Gln147Pro практически не связывается с нитями актина в растворе, имеет отличное от дикого типа α -спиральное содержание при 37⁰C (Marttila et al., 2012), видимо из-за нарушения непрерывной спиральной структуры остатком пролина (Donner et al., 2002; Lehtokari et al., 2007). Ca²⁺-чувствительность сокращения в присутствии тропомиозина с мутацией Gln147Pro ниже, чем в присутствии тропомиозина дикого типа (Marttila et al., 2014). Мутации Glu240Lys и Arg244Gly в α -тропомиозине быстрых скелетных мышц (продукт гена *TPM1*) мы ввели по аналогии с мутациями Glu240Lys и Arg244Gly в α -тропомиозине медленных скелетных мышц

(продукт гена *TPM3*), обнаруженными у пациентов с врождённой диспропорцией типов волокон (Clarke et al., 2008; Lawlor et al., 2010). Обе мутации в тропомиозине приводят к более низкой, чем в норме, Ca^{2+} -чувствительности сокращения (Ottenhejm et al., 2011; Marston et al., 2013). Причины проявления гиперсократительного молекулярного фенотипа в случае с мутацией Arg91Gly в β -тропомиозине и гипосократительного молекулярного фенотипа в случае с мутациями Gln147Pro в β -тропомиозине, Glu240Lys и Arg244Gly в α -тропомиозине не выяснены.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследовать методом поляризационной флуориметрии влияние точечных мутаций Arg91Gly, Gln147Pro, Glu240Lys и Arg244Gly в α - и β -тропомиозинах на характер актин-миозинового взаимодействия и на позицию и гибкость тропомиозинов на актине в при моделировании разных стадий цикла гидролиза АТФ:

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Оценить пространственную организацию и гибкость актлина в присутствии рекомбинантных тропомиозинов дикого типа и с мутациями Arg91Gly, Gln147Pro, Glu240Lys и Arg244Gly в теневых мышечных волокнах на разных стадиях цикла гидролиза АТФ.
2. Оценить пространственную организацию и подвижность головок миозина на актине в присутствии рекомбинантных тропомиозинов дикого типа и с мутациями Arg91Gly, Gln147Pro, Glu240Lys и Arg244Gly в теневых мышечных волокнах на разных стадиях цикла гидролиза АТФ.
3. Оценить позицию и гибкость рекомбинантных тропомиозинов дикого типа и с мутациями Arg91Gly, Gln147Pro, Glu240Lys и Arg244Gly на актине в теневых мышечных волокнах на разных стадиях цикла гидролиза АТФ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Мутация Arg91Gly в β -тропомиозине существенно влияет на поведение тяжёлой тропомиозина на актине в течение различных стадий АТФазного цикла. Сдвигаясь от закрытой к открытой позиции на нитях актлина, мутантный тропомиозин демонстрирует более высокую амплитуду азимутального сдвига на актине, нежели тропомиозин дикого типа. Последнее, по-видимому, приводит к связыванию большего числа головок миозина с актином и включению большего числа актиновых мономеров в F-актине. Эти изменения в поведении актин-тропомиозин-миозиновой системы могут являться причиной усиления сократительной активности и развития дистального артрогрипоза.

2. β -Тропомиозин с мутацией Gln147Pro, обнаруженной у пациента с немалиновой миопатией или кэп-миопатией, при моделировании сильной формы актин-миозинового

связывания локализуется ближе к центру актиновой нити – в открытой позиции, способствуя сильному связыванию миозиновых головок с актином и включению большего, чем в контроле, числа мономеров актина. Однако, при моделировании слабого связывания, мутантный тропомиозин не выявил способности сдвигаться в закрытую позицию на актине, тем самым не закрывая сайты сильного связывания миозина на актине и нарушая процесс образования слабой формы связывания. Эти эффекты могут объяснить выявленное ранее уменьшение сократительной активности и, по-видимому, лежат в основе патогенеза немалиновой миопатии или кэп-миопатии.

3. Мутации Glu240Lys и Arg244Gly, несмотря на то, что были сделаны в разных функциональных участках последовательности рекомбинантного α -тропомиозина (продукт гена *TPM1*), выявили схожее влияние на характер актин-миозинового взаимодействия и на позицию тяжей тропомиозина на актине в течение АТФазного цикла. Оба мутанта при моделировании перехода от слабой к сильной форме актин-миозинового связывания локализуются ближе к центру актиновой нити, способствуя сильному связыванию головок миозина на актине и препятствуя образованию слабой формы связывания миозина с актином. По-видимому такие эффекты могут наблюдаться при мутациях Glu240Lys и Arg244Gly в α -тропомиозине медленных скелетных мышц человека (продукт гена *TPM3*), ассоциированных с врождённой диспропорцией типов волокон, и являться причинами развития патологии.

Научная новизна исследования. В настоящей работе впервые показано, как мутации Arg91Gly, Gln147Pro, Glu240Lys и Arg244Gly влияют на характер актин-миозинового взаимодействия и на позицию самих мутантных форм тропомиозина в цикле гидролиза АТФ. Полученные данные проясняют некоторые механизмы функционирования актомиозиновой системы в присутствии мутантов тропомиозина и являются полезными при разработке методов диагностирования врождённых миопатий и подходов к лечению слабости мышц, вызываемой конкретной мутацией в тропомиозине, в будущем.

Теоретическое и практическое значение работы. Представленные в настоящей работе результаты углубляют понимание молекулярных механизмов развития врождённых миопатий, вызванных мутациями Arg91Gly и Gln147Pro в β -тропомиозине и Glu240Lys и Arg244Gly в α -тропомиозине, а также способствуют идентификации физиологической роли аминокислотных остатков Arg91, Gln147, Glu240 и Arg244 в функционировании тропомиозина. Полученные данные по исследованным мутациями в тропомиозине могут быть использованы при разработке методов диагностирования миопатий и выработке подходов для их лечения. Материалы исследования используются в курсе лекций «Биофизика мышечного сокращения»,

разработанного А.О. Симоняном и в настоящее время реализуемого для студентов кафедры биофизики биологического факультета СПбГУ.

Степень достоверности полученных результатов. Основные результаты работы были получены с использованием адекватного поставленным задачам метода поляризационной флуориметрии. Все реагенты, описанные в разделе «Материалы и методы», были получены от компаний (*Sigma Aldrich; Molecular Probes*), зарекомендовавших себя в качестве надёжных производителей химреактивов. Чистота всех реагентов составляла более 99%. Все методы и подходы, применённые в ходе выполнения работы, воспроизводились ранее.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены на 38-ом конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (2013 г., г. Санкт-Петербург, Российская Федерация), на 42-ой Европейской мышечной конференции (2013 г., г. Амстердам, Нидерланды), на международном симпозиуме «Биологическая подвижность: новые факты и гипотезы» (2014 г., г. Москва, Российская Федерация), на 43-ей Европейской мышечной конференции (2014 г., г. Зальцбург, Австрийская Республика), на 40-ом конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (2015 г., г. Берлин, Федеративная Республика Германия), а также на научных семинарах кафедры биофизики биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Основные результаты диссертационного исследования были опубликованы в виде 2 статей в журналах, включённых в перечень рецензируемых научных изданий Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации.

Личный вклад автора. Все эксперименты, за исключением экспериментов по экспрессированию и очистке рекомбинантных тропомиозинов, были выполнены диссертантом лично. Исследование мутации Arg91Gly в β -тропомиозине методом поляризационной флуориметрии были выполнены совместно с Н.А. Рысевым. Все материалы, представленные в тексте диссертации, обсуждались с научным руководителем и соавторами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Общие положения

Способность к движению – характерное свойство всего живого: от простейших до высших организмов (Squire, 1981). Мышцы представляют собой машины, преобразующие полученную от пищи химическую энергию в механическую силу. Молекулярный механизм, посредством которого этот процесс преобразования происходит, является предметом интенсивных исследований в молекулярной биофизике мышц и остается одной из нерешённых проблем в биологии.

Скелетная мышца позвоночных состоит из многочисленных клеток или волокон, примерно 20-100 μm в поперечном разрезе, каждая из которых включает в себя пучок цилиндрических миофибрилл 1-2 μm в диаметре. Волокна в мышце собраны вместе соединительной тканью из коллагена, образующего по концам волокон сухожилия между мышцами и скелетом, на котором мышцы работают. Внутри каждой миофибриллы «сократительный материал» организован внутри повторяющихся единиц, названных саркомерами. Саркомеры можно различить на световых микрофотографиях миофибрилл в виде чередующейся последовательности светлых и тёмных полос. Тёмная полоса называется А-диск (анизотропная зона), а светлая – I-диск (изотропная зона) (рис. 1). Поскольку эти полосы располагаются вдоль всей оси миофибриллы, то они придают волокнам, да и всей мышце, характерный поперечнополосатый вид.

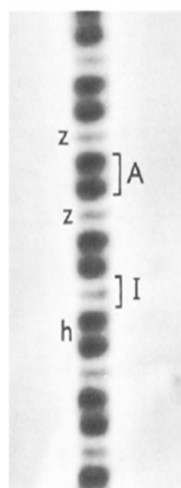


Рисунок 1. Изображение глицеринизированного скелетного мышечного волокна под световым микроскопом (из кн. Squire, 1981).

Под световым микроскопом можно также выделить тёмную полосу в центре I-диска. Изначально она была названа Z-линией (от имени *Zwischensheibe*), но в настоящее время чаще предпочитают термины Z-диск или Z-пластина (из-за ее толщины).

Саркомер определяется как повторяющаяся единица между двумя соседствующими Z-пластинами вдоль миофибриллы. В мышцах позвоночных расстояние между прилегающими Z-пластинами (длина саркомера) обычно составляет около 2-3 μm . Когда мышца укорачивается во время сокращения, длина саркомера пропорционально уменьшается, что свидетельствует о том, что саркомер представляет единицу в мышце, где производится активное укорачивание. Другая важная особенность миофибриллы заключается в том, что половина пути вдоль A-диска представляет собой менее тёмный участок, известный как H-зона. Показано, что I-диск представлен преимущественно тонкими нитями, тогда как A-диск представлен толстыми нитями, и толстые и тонкие нити перекрываются на конце A-диска (Hasselbach, 1953; Hanson, Huxley, 1953; Huxley, 1956).

В выяснении молекулярных механизмов мышечного сокращения до 60-ых годов 20 века доминировала модель, согласно которой актомиозин подобно пружине представлен между двумя Z-пластинами, и укорочение мышцы происходит за счёт конформационных изменений этого белка. Однако, рентгеноструктурный анализ, выполненный на мышцах позвоночных, показал, что дифракционная картина сокращенной мышцы практически не отличается от дифракционной картины расслабленной мышцы (Astbury, 1947). Это означало, что конформационных изменений подобно «сжатию пружины» в актомиозине не происходит. Основываясь на этих исследованиях, была предложена модель "скользящих филаментов", согласно которой тонкие нити, представленные преимущественно F-актином, и толстые нити, представленные главным образом миозином, смещаются друг относительно друга, в результате чего происходит сокращение мышечного волокна (Huxley, Hanson, 1954; Huxley, Niedergerke, 1954).

Годами позже было показано, что процесс актин-миозинового взаимодействия регулируется тропонин-тропомиозиновым комплексом и ионами кальция (Ebashi, 1963; Ebashi, Ebashi, 1964; Ebashi, Endo, 1968). В этой главе рассмотрены структурно-функциональные особенности основных белков саркомера – актина, миозина и тропомиозина, а также некоторые патологические состояния, при которых обнаруживаются мутации в генах *TPM2* и *TPM3*, кодирующих β - и α^2 -тропомиозин, соответственно.

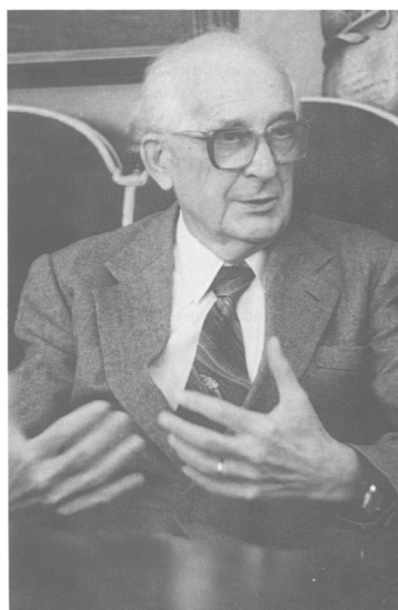
² Ген *TPM3* кодирует γ -тропомиозин. В настоящее время чаще используется название « α -тропомиозин медленных скелетных мышц».

1.1 Актин: структура и функции

1.1.1 Историческая справка по изучению актина

Актин является вездесущим белком. Он был обнаружен во всех исследованных клетках эукариот, но впервые его выделили из мышечной ткани. Оказалось, что известный к этому времени “миозин” состоит из двух компонентов: истинный миозин и белок, *активирующий* миозин, который назвали *актин*. Открытие актина было сделано в разгаре Второй мировой войны в лаборатории Альберта Сент-Дьёрди (лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине, 1937 г.) биохимиком австро-венгерского происхождения Бруно Ференцом Штраубом (Straub, 1942; рис. 2).

Рисунок 2. Профессор Бруно Ференц Штрауб – первооткрыватель актина (из Straub, 1989).



Стимулом для этих исследований послужила фундаментальная работа В.А. Энгельгардта и М.Н. Любимовой по ферментативной активности миозина, способного расщеплять АТФ (Engelhardt, Ljubimowa, 1939). В последующие годы были выявлены и охарактеризованы большинство изоформ и гомологий актина в клетках и тканях различных типов; самый недавний – в прокариотах (Van den Ent et al., 2001).

На знаменитом симпозиуме «Колд Спринг Харбор» (Cold Spring Harbor Symposium, 1972), посвященном механизмам мышечного сокращения, Маршалом Эльзингой и Джоном Коллинзом была представлена расшифровка первичной структуры актина мышц (позднее опубликованная в работе Elzinga et al., 1973). В 90-ые годы последовало несколько работ по рентгеноструктурному анализу актина, результатом которых явилась модель Холмса-Лоренца трёхмерной структуры актина (Kabsch et al., 1990; Holmes et al., 1990; Lorenz et al., 1993). Декадой позднее в эту модель

Холмс ввел некоторые поправки (Holmes et al., 2003), которые пересмотрели Ода с сотрудниками (Oda et al., 2009).

1.1.2 Структурно-функциональные характеристики актина

Актин может существовать в глобулярной (G-актин) форме, а также образовывать длинные нити (F-актин). Определение аминокислотных последовательностей и генов, кодирующих молекулу актина из разных объектов, классифицировали этот белок в три разных класса:

1) α -актин, кодируемый генами *ACTA1*, *ACTA2* и *ACTC1* (скелетная, гладкомышечная и сердечная изоформы, соответственно) (Hamada et al., 1982; Gunning et al., 1983; Ueyama et al., 1984);

2) β -актин, кодируемый геном *ACTB* (цитоплазматическая изоформа) (Vandekerckhove, Weber, 1978);

3) γ -актин, кодируемый генами *ACTG1* и *ACTG2* (цитоплазматическая и гладкомышечная изоформы, соответственно) (Gunning et al., 1983; Miwa et al., 1991).

Необходимо отметить, что мышечные изоформы актина преобладают в поперечнополосатой, скелетной и сердечной мышцах, в то время как два цитоплазматических немышечных актина – β - и γ -актины, обнаружены во всех исследованных клетках.

Актин обладает уникальной эволюционной консервативностью: консервативность среди изоформ белка составляет свыше 80% (Doolittle, 1995). Классический актин (мышечная изоформа) представлен последовательностью из 375 аминокислотных остатков (Elzinga et al., 1973) с молекулярной массой ~42 кДа. Изоформы актина различаются, в основном, по аминокислотным остаткам, расположенным преимущественно на поверхности белка (Egelman, 2001). Видимо, это и позволяет актину взаимодействовать с миозином и многообразием актин-связывающих белков. С молекулой G-актина связана молекула АТФ, которая гидролизует до АДФ при полимеризации. Также обнаружено, что в экспериментах *in vivo*, все участки содержат связанный Mg^{2+} (Weber et al., 1969), замещающийся на Ca^{2+} в экспериментах *in vitro* (Kasai, Oosawa, 1968).

Первая атомная модель мономерного актина была предложена на основании его рентгеноструктурного анализа в комплексе с дезоксирибонуклеазой I с разрешением 2.8 Å (Kabsch et al., 1990; рис. 3). Согласно описываемой модели актин соответствует квадрату с боком 55 Å и шириной 35 Å; состоит из двух доменов – большого и малого (по историческим причинам названных такими, хотя домены практически не отличаются), с нуклеотидом (АТФ или АДФ) и связанным ионом кальция в расщелине, находящейся между этими доменами. Каждый из

доменов содержит два субдомена – 1 и 2, 3 и 4. По определению субдомена 1, представленный аминокислотными остатками 1-32, 70-114 и 338-372, и субдомена 2 (остатки 33-69) соответствуют малому домену, тогда как субдомены 3 (остатки 145-180 и 270-337) и 4 (остатки 181-269) представляют большой домен.

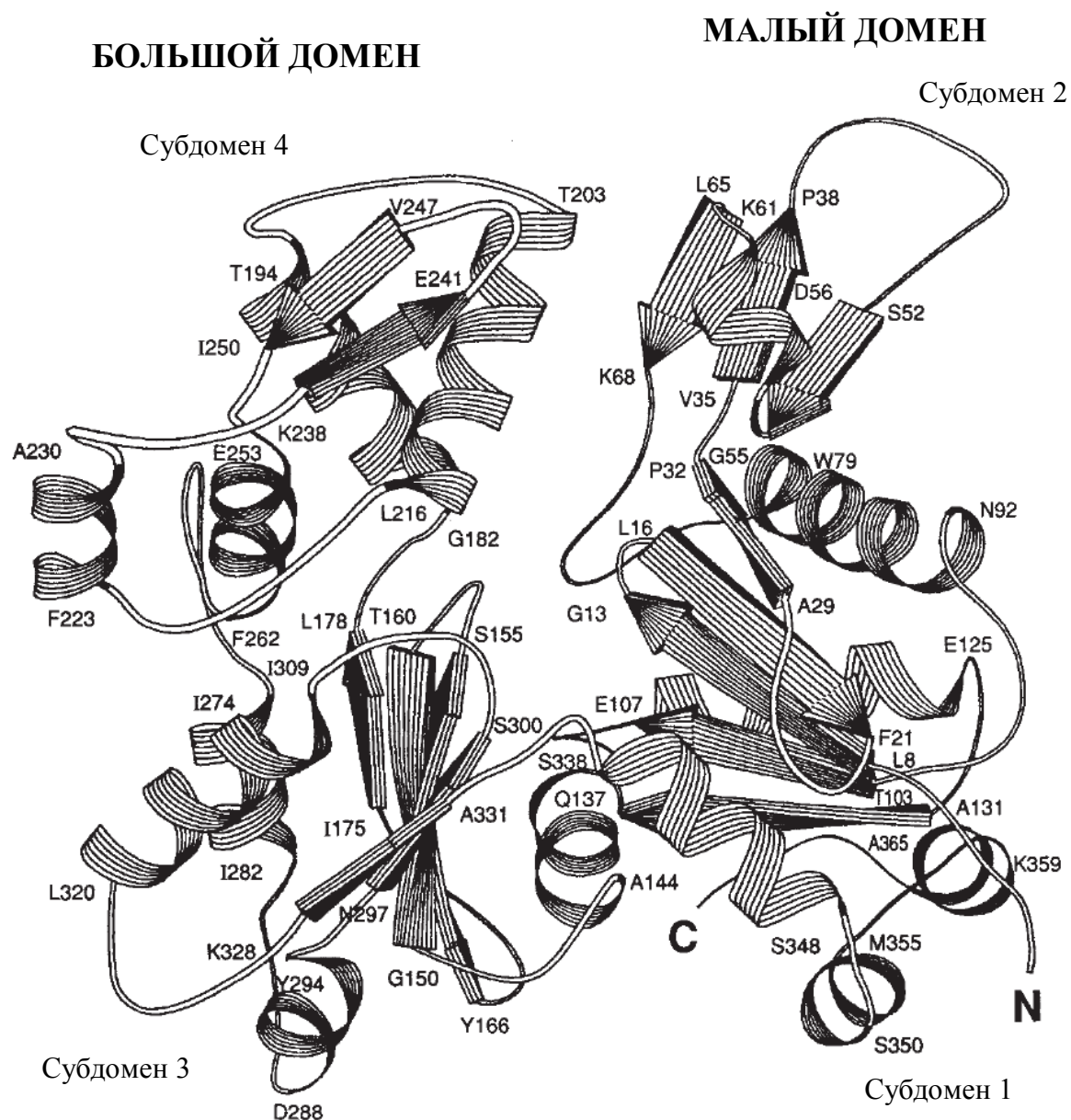


Рисунок 3. Схематическое изображение структуры G-актина (по Lorenz et al., 1993, с модификациями).

N- и C- концы локализованы в одном и том же субдомине – в субдомине 1. Последний представлен плоскостью из пяти β -складчатых структур, собранных из β изгибов, а также правосторонней $\beta\alpha\beta$ структурой. β -плоскость (или, как чаще называют, β -лист) окружена пятью спиральями. Одна из этих спиралей содержит два гидрофобных остатка – Ile345 и Leu346, которые доступны для растворителя. Предшествующий им гидрофильный Ser334 довольно глубоко

погружён от поверхности белка, и его боковая часть образует водородную связь с Asp24 соседней цепи. Кэбш с сотрудниками (Kabsch et al., 1990) предположили, что эта спираль может взаимодействовать с актин-связывающими белками – возможно, миозином или тропомиозином.

Субдомен 2 представлен тремя антипараллельными β -складчатыми нитями со спиралью, соединяющей две пограничные нити.

Субдомен 3 представлен β -листом из пяти нитей, окружённых тремя спиральями. Топология листа идентична той, что у субдомена 1.

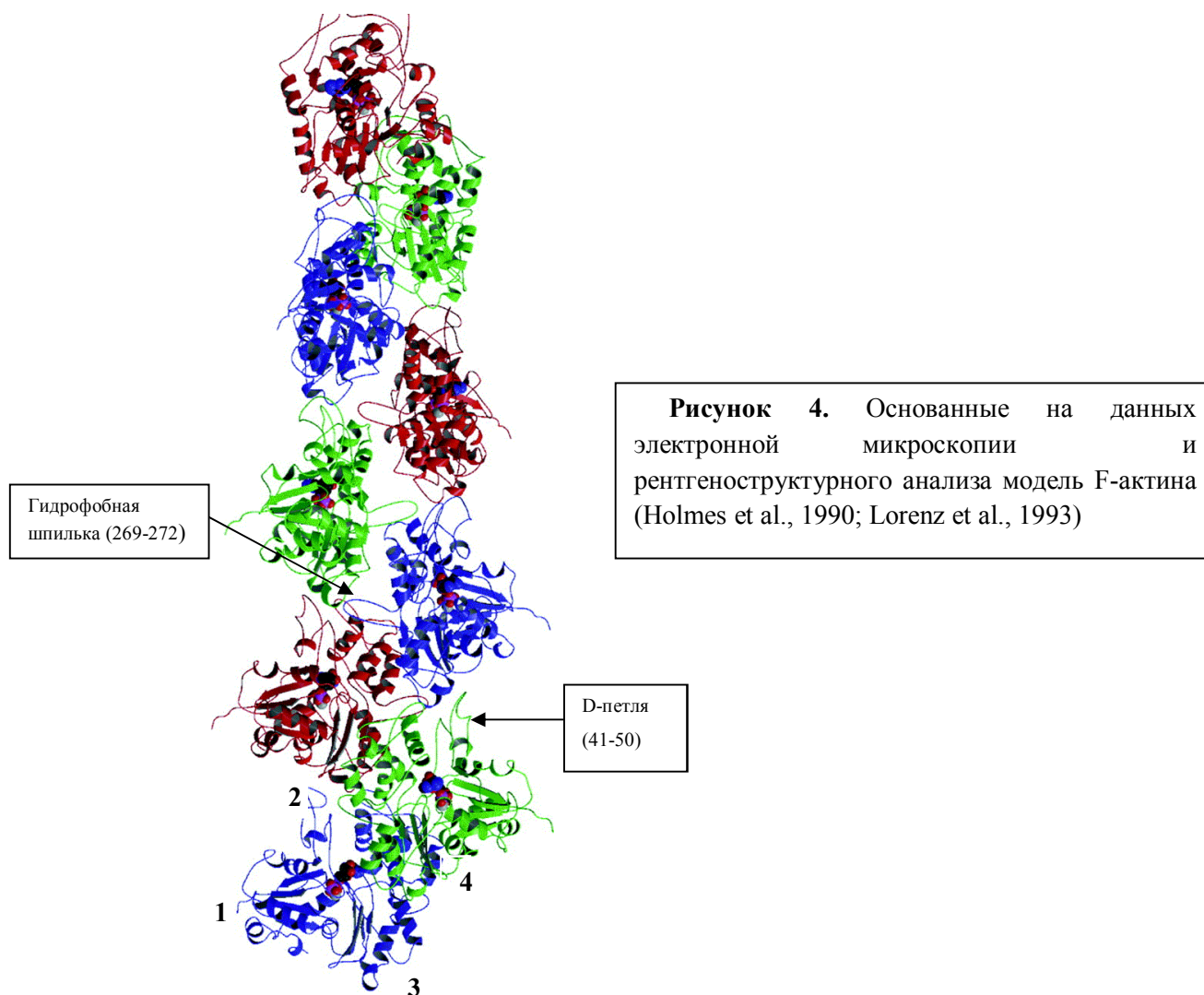
Наконец, субдомен 4 содержит антипараллельную β -структуру из 2 нитей и четырёх α -спиралей. Glu253 и Phe262 отображаются в спиральной конформации, несмотря на то что картина характерной водородной связи нарушается остатком Pro258. Спираль продолжается петлёй из 10 остатков и другой спиралью (остатки 274-282) субдомена 3. Гидрофобные остатки Phe266, Ile267 и Met269 доступны для растворителя. Все четыре субдомена актина поддерживаются вместе, главным образом, при помощи нуклеотида и солевых мостиков.

Основание аденина соответствует карману, образованному остатками Lys213, Glu214, Thr303, Met305, Tyr306 и Lys336. Специфических взаимодействий между данными аминокислотными остатками и аденином обнаружено не было. В завершении рассмотрения структуры G-актина необходимо отметить, что последний не поддаётся рентгеноструктурному анализу в отрыве от комплексов.

F-актин образуется при полимеризации G-актина, и эту полимеризацию можно вызвать увеличением ионной силы в растворе. Известно свыше 150 белков, взаимодействующих с актином (согласно данным Database of Interacting Proteins – DIP: <http://dip.doe-mpi.ucla.edu>). Анализ электронно-микроскопических изображений (Egelman, 1985) показал, что F-актин представлен в виде двойной спирали с периодом $\sim 360^\circ$, на 6 (левозакрученных) витков которой приходится 13 мономеров актина. Поскольку угол смещения одного мономера от соседнего в той же нити составляет 166° , актиновая спираль морфологически отображается в качестве двух правозакрученных спиралей, вьющихся между собой.

Атомная модель F-актина была предложена с разрешением 8 Å в работе (Holmes et al., 1990; рис. 4) того же выпуска журнала *Nature*, в котором была опубликована атомная модель G-актина (Kabsch et al., 1990). Данная модель была широко принята, однако она не раскрывала в полном объёме природу перехода актина из глобулярной формы в фибриллярную. Эксперименты проводились с использованием метода рентгеноструктурного анализа на гелях актина, ориентированного в капиллярах; такой подход был предложен ранее (Porp et al., 1987). Дифракционная картина показала, что максимальный диаметр спирали составляет 90-95 Å. Здесь также была решена локализация C-концевых остатков (373-375). Оказалось, что во взаимодействии между двумя нитями актина задействованы аминокислотные остатки 322-325

одного мономера с остатками 243-245 другого мономера; аналогичным образом, остатки 286-289 с остатками 202-204, остатки 166-169 и 375 с остатками 41-45. Петля, связывающая дезоксирибонуклеазу I (D-петля; остатки 41-50), является гидрофобной и взаимодействует с большим доменом верхнего мономера. В середине спирали электронная плотность оказалась небольшой. Другая петля от противоположной нити (остатки Phe266, Ile267, Gly268, Met269) видимо входит в гидрофобный карман, образованный остатками Tyr166, Ala169, Leu171, Cys285, Ile289, Gly63, Ile64, а также остатками 40-45.



Петля 264-273 может легко перестраиваться в антипараллельный β -лист с β -изгибом в середине, образуя пальцеобразную структуру. Такая перестройка “толкает” последовательность Phe-Ile-Gly-Met в β -изгиб таким образом, что расположение гидрофобных остатков может интеркалировать между молекулами противоположной нити, формируя плотную гидрофобную сердцевину или «шпильку». В гидрофобную шпильку входят аминокислотные остатки 262-274.

Позднее, Лоренц с сотрудниками (Lorenz et al., 1993) ввели некоторые поправки в модель F-актина Холмса (Holmes et al., 1990) в связи с меньшим осевым и радиальным расположениями D-петли.

Недавно была предложена новая модель структуры F-актина (Oda et al., 2009) с разрешением 3.3 Å в радиальном и 5.6 Å в экваториальном направлениях. По нашему мнению, эта модель фундаментально перестраивает принципы, которые были актуальны до этого времени. Ода с сотрудниками показали, что при переходе G-актина в фибриллярную форму – в F-актин, происходит уплощение молекулы актина, что сопровождается наклоном малого (внешнего) домена относительно большого (внутреннего) на 20° (рис. 5б). На это исследование реагирует один из авторов предыдущей модели F-актина К. Холмс (Holmes, 2009). Комментируя работу Оды и сотрудников, он пишет:

«Уплощение мономеров внутри F-актина существенно меняет сайт, к которому связывается миозин; это может объяснить, почему миозин с высоким сродством связывается с F-актином, но никак не с G-актином. Таким образом, новая структура, несомненно, станет важным компонентом в понимании клеточной подвижности и мышечного сокращения».

При инкорпорировании молекулы актина в филамент активируется АТФаза актина (Pollard, 2007). В процессе активации АТФазы существенную роль играет Gln137; замена этого остатка на аланин значительно (четырёхкратно) снижает АТФазную активность, хотя и четырёхкратно ускоряет процесс полимеризации (Iwasa et al., 2008). Кристаллические структуры G-актина показывают, что Gln137 связывает молекулу воды, которая потом атакует γ-фосфат связанной молекулы АТФ. Остаток глутамина в 137 позиции локализован в субдомене 1, тогда как молекула АТФ связывается с субдоменами 3 и 4 (рис. 5). Поэтому, вращение малого домена, вызванное переходом от G- в F-форму подводит Gln137 ближе к γ-фосфату, что видимо позволяет гидролизовать АТФ (Oda et al., 2009; Holmes, 2009). Несмотря на достигнутый прогресс в понимании природы перехода мономерного актина в полимерный, более подробное обсуждение работы АТФазы затруднено. Хотя кажется логичным, что поворот малого домена молекулы актина происходит до гидролиза АТФ, однако не существует прямых опровержений тому, что уплощение происходит вслед за высвобождением фосфата.

Уплощение молекулы актина вызывает также изменения во внутримолекулярных взаимодействиях между двумя доменами, особенно вокруг двух петель, соединяющих их: «чувствительной петли» 71-73 (Rould et al., 2006) и остатков 108-111 (рис. 6).

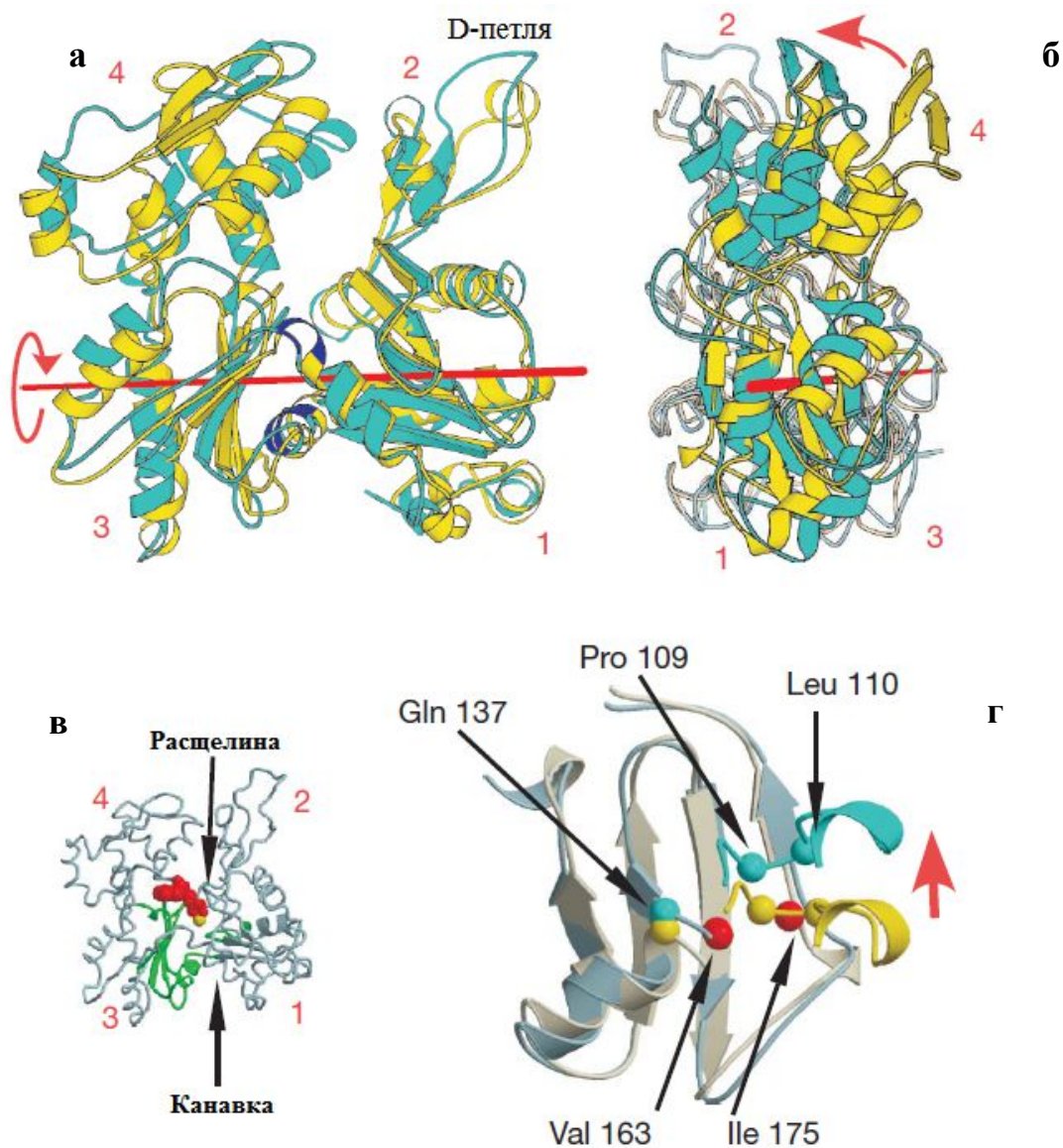


Рисунок 5. Переход актина из глобулярной конформации (G-актин) в плоскую фибриллярную (F-актин) (по Oda et al., 2009, с модификациями). (а) вид спереди, структура мономера F-актина (циановая) и структура TMR³-модифицированного актина (желтая). (б) вид сбоку того же мономера. (в) мономер актина с молекулой АДФ (красная) и с ионом кальция (желтая). (г) подробное изображение петли, отмеченной зеленым цветом на рис. (в).

Arg206, Glu72, Arg183, Asp187, метилированный (Me)His73, Asp179 и Arg177 формируют целый каскад солевых мостиков, которые вероятно способствует стабилизации конформации F-актина (Oda et al., 2009). Заряженный остаток MeHis73 входит в такую конкатенацию в результате вращения домена. Pro109 и Leu110 в составе петли 108-111 субдомена 1 отсоединяются от места вокруг Val163 и Ile175 в гидрофобном стержне субдомена 3 (рис. 5г). Это позволяет Leu110

³ TMR - тетраметилпродамин

взаимодействовать с субъединицей противоположной нити – с остатком Thr194, и такой контакт между субъединицами видимо также стабилизирует плоскую конформацию (Oda et al., 2009).

В конце концов, уплощение молекулы актина способствует образованию контактов как между мономерами двух противоположных нитей актина, так и между мономерами внутри одной нити. Мутации и фосфорилирование аминокислотных остатков (Wertman et al., 1992; Furuhashi et al., 1992; Joel et al., 2004), участвующих в формировании таких связей, ведут к ослаблению формирования F-актина, вплоть до летального исхода у дрожжей (Wertman et al., 1992).

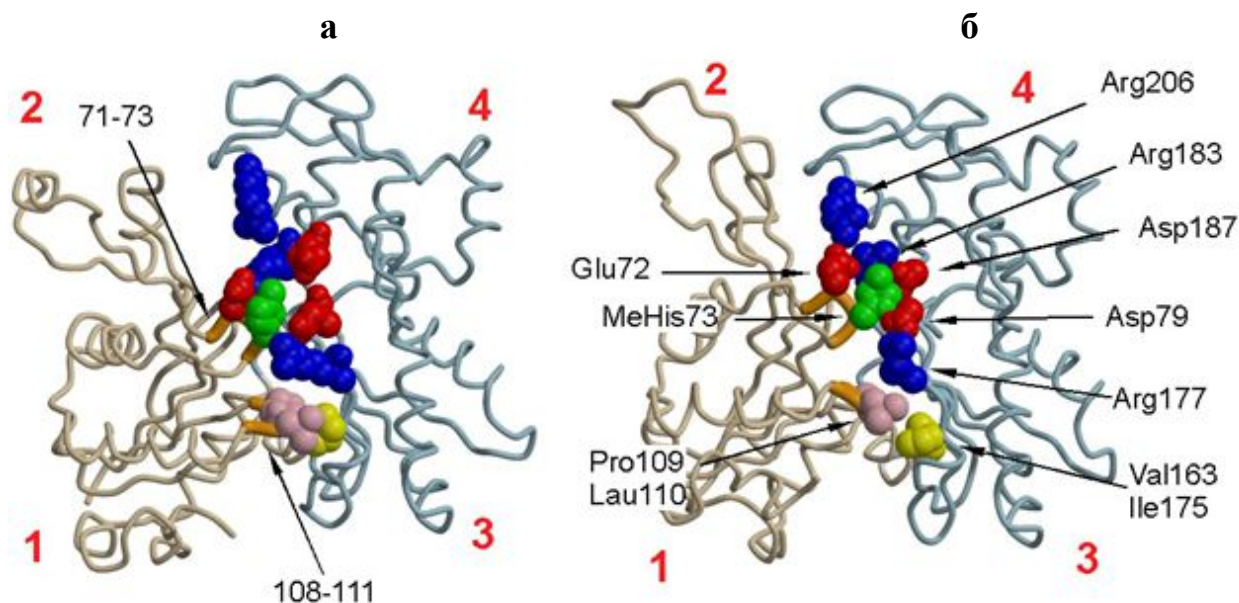


Рисунок 6. Перестройки в боковой цепи на границе между двумя доменами, связанные с переходом актина из G-формы в F-форму (по Oda et al., 2009). (а) TMR-АДФ-G-актин. (б) Мономер в F-актине. Петли 71-73 и 108-111 субдомена 1 (оранжевые) контактируют с двумя большими доменами. В отличие от ранее предложенных моделей, здесь в мономере F-актина остатки Arg206, Glu72, Arg183, Arg187, MeHis73, Asp179 и Arg177 формируют каскад солевых мостиков. К тому же, в F-актине Pro109 и Leu110 (розовые) петли 109-111 субдомена 1 отсоединены от Val163 и Ile175 (желтые) стержня субдомена 3.

С точки зрения функций актина в живых клетках вызывают интерес исследования, направленные на изучение как динамики внутри актиновой нити, так и гибкости всей нити в целом. Показано, что два домена актина могут двигаться друг относительно друга (Schutt et al., 1993; Chik et al., 1996). Если говорить на «субдоменовом языке», то субдомены 1 и 2 являются более подвижными, чем субдомены 3 и 4. При этом субдомен 2 показывает независимую подвижность от прилегающего субдомена (Page et al., 1998). Непосредственной визуализацией асимметричных блоков, содержащих 14 субъединиц актина внутри кристаллического актин-скруинового пучка, Шмид с сотрудниками (Schmid et al., 2004) смогли увидеть, что индивидуальные актиновые мономеры могут изменять угол поворота от идеальной спиральной позиции в любом направлении от -10^0 до $+24^0$. Актин-скруиновый пучок выявил и другие

интересные детали. Вдобавок к вариабельным поворотам, актиновые субъединицы могут наклоняться в пучке от своих идеальных позиций вплоть до 12° . Правдоподобность того, что субъединицы актина могут быть способны к наклону внутри филамента, появилась при анализе с более низким разрешением (Tilney et al., 1983) другого актинового пучка – стержня стереоцилий волосковых клеток внутреннего уха, а также этот наклон был непосредственно виден в актиновом филаменте в комплексе с белками ADF/кофилин (Galkin et al., 2001, 2002).

Усовершенствованная криоэлектронная микроскопия показала целый ансамбль состояний внутри фибриллярного актина (Galkin et al., 2010). В этой работе были выделены структурные состояния, названные режимами. В Т-режиме⁴ находились 24% от всех исследованных сегментов актиновой нити. В таком режиме субдомен 2 нижнего мономера контактирует с субдоменом 3 верхнего, тогда как взаимодействие субдомена 4 нижнего мономера с субдоменом 3 верхнего ослабляется по сравнению с «каноническим» F-актином. В «наклонённом» состоянии нуклеотид-связывающая расщелина открыта (рис. 7а, красная звёздочка) вследствие вращения относительно шарнирного участка двух доменов актина на $\sim 30^{\circ}$, сопровождаемого сдвигом этих доменов друг от друга на 10 Å. Верхняя и боковая стороны спирали субдомена 4 (рис. 7а, синяя и красная стрелки, соответственно) выступают из электронной карты плотностей, предполагая структурное многообразие субдомена 4.

Оставшиеся сегменты были сортированы в соответствии со структурным состоянием субдомена 2. Известно, что D-петля, локализованная на верхушке субдомена 2, может скручиваться в β -нить (Kabsch et al., 1990), α -спираль (Otterbein et al., 2001) или быть неупорядоченной (Kudryashov et al., 2005). Галкин с сотрудниками (Galkin et al., 2010) показали 5 дополнительных режимов в зависимости от структурного состояния D-петли (рис. 7, режимы 1-5). Предполагается, что D-петля контролирует соединение между нитями (тяжами). Две области актинового филамента - межтяжевой контакт, включающий гидрофобный карман и N-конец актина, подвергаются значительным структурным изменениям, сопряженным с конформацией D-петли. Две области субдомена 2 способствуют взаимодействию с гидрофобным карманом. В режиме 3 субдомен 2 находится ближе к наружной поверхности филамента, дальше от межтяжевого контакта, чем в режимах 1 и 2. В режиме 4 D-петля неупорядочена и тем самым невидима в реконструкции. Тем не менее, соединение между двумя актиновыми нитями не нарушается. Это предполагает, что только область 64-67 является необходимой для межтяжевого соединения.

В этих режимах интересна связь между структурными состояниями N-конца и субдомена 2 молекулы. Ранние работы показали, что мышечный актин формирует филаменты, которые

⁴ От англ. *twisted* - наклонённый

являются более стабильными, чем те, которые образуются дрожжевым актином, и, как предполагается, вследствие своей различной динамики они не могут поддерживать рост дрожжевой клетки (Kim et al., 1996). Три N-концевых остатка определяют гибель или жизнедеятельность дрожжевой клетки, когда субдомен 1 и субдомен 2 дрожжевого актина заменяются на субдомены мышечного актина (McKane et al., 2006). Авторы рассуждают, что именно аллостерическое сопряжение между N-концом и субдоменом 2 может объяснить эти наблюдения (Galkin et al., 2010).

Важная роль субдомена 2 как аллостерического переключателя подкрепляется интерпретацией данных по режимам с эффектами точечных мутаций, вызывающих тяжелые заболевания мышц (Galkin et al., 2010). Наконец, ансамбль структурных состояний, описанных авторами, позволяет разрешить проблему, как одиночный белок актин может взаимодействовать со свыше 150 другими белками.

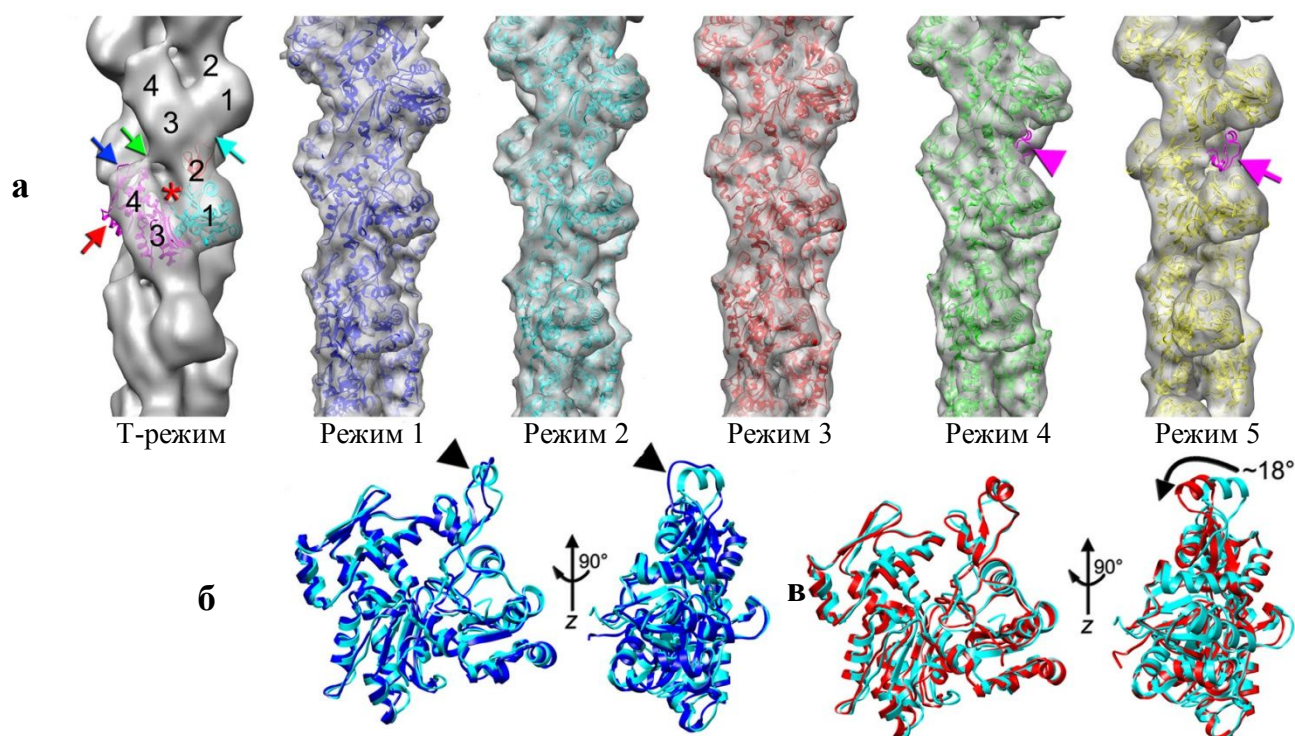


Рисунок 7. Шесть структурных состояний (режимов) актина (по Galkin et al., 2010). (а) Серым цветом показаны трехмерные реконструкции шести структурных режимов. (б) Конфигурация D-петли в режиме 1 является петлей, а в режиме 2 спиралью (показано черными стрелками). (в) Режим 3 представлен спиральной D-петлей, которая поворачивается на $\sim 18^\circ$ от своей позиции в режиме 2.

Хотя актин впервые был открыт как компонент поперечнополосатой мышцы, большинство исследований молекулярных механизмов мышечного сокращения были сосредоточены на миозине, поскольку глобулярные головки миозина гидролизуют АТФ при связывании актина и обеспечивают «рабочий ход» (*power stroke*). Некоторые исследования (Prochniewicz, Yanagida, 1990; Schwyter et al., 1990; Kim et al., 1998), однако, показали, что актин может модифицироваться, оставаясь будучи связанным с миозином, и АТФаза миозина

полностью активирована, но генерации силы либо нет, либо генерация силы значительно снижена. Спектроскопические наблюдения также показывают, что связывание миозина с актином изменяет конформацию актиновой субъединицы (Borovikov et al., 1982; Feng et al., 1997; Borovikov et al. 2004). Одним из объяснений этих наблюдений является то, что внутренние динамические режимы в F-актине необходимы для генерации силы во время мышечного сокращения, и эти режимы подавляются такими модификациями, как сшивание и протеолиз.

Несмотря на богатство структурных состояний в F-актине, последнему в процессе актин-миозинового скольжения приписывают больше роль «статора», тогда как «ротором» и генератором силы считается миозин. Однако были выполнены исследования, предполагающие активную роль актиновых филаментов в генерации силы, опосредованных конформационными перестройками в актине (Borovikov et al., 1982; Borovikov, Levitsky, 1985). Стоит только отметить, что 12 лет назад экспериментальным путём впервые была выявлена способность актина генерировать силу, но в комплексе с формином (Kovar, Pollard, 2004).

1.2 Миозин: структура и функции

Началом изучения миозина можно считать середину 19 века, когда знаменитый биохимик Вильгельм Кюне описывал сократительные “сгустки” (Kuhne, 1859). Позднее В. Халибартон начал изучать эти “сгустки” (Halliburton, 1887). Автор сравнил свёртывание “сгустка” с процессом перехода фибриногена в фибрин.

Миозин, исследуемый этими учёными, в настоящее время известен как миозин II или “традиционный” миозин, который впоследствии был обнаружен и в немышечных клетках (Adelman, Taylor, 1969). Позже были выделены “нетрадиционные” миозины из почвенной *Acanthamoeba castellanii* (Pollard, Korn, 1973). Затрагивая проблему классификации миозинов, необходимо привести существующие данные по этому вопросу. Группирование миозинов в отдельные классы основано на сравнении последовательности консервативного моторного домена с использованием дистанционных матричных методов (например, CLUSTAL; Goodson, Spudich, 1993). К 2001 году были известны 18 классов миозинов и несколько миозинов-“сирот”, обнаруженных в одиночных организмах (Berg et al., 2001). Работы по анализу последовательностей миозинов, выделенных из 5 крупных таксономических групп (амёбы, опистхонкты, растения, экскаваты и хромальвеолы), с акцентом на эукариотические микроорганизмы, выявили 6 новых классов традиционных миозинов, увеличивая общее число классов до 24 (Richards, Cavalier-Smith, 2005; Foth et al., 2006; рис. 8). Саркомерный миозин – миозин II, является наиболее изученной изоформой. Характеризуется глобулярным N-концевым доменом из ~840 аминокислотных остатков. При контролируемом протеолизе миозин

распадается на фрагменты с различными молекулярными массами (Szent-Gyorgyi, 1953): тяжелый меромиозин (ТММ), включающий головку и часть хвоста с молекулярной массой ~130 кДа, и лёгкий меромиозин (ЛММ), представленный остальной частью хвоста (~110 кДа).

Тяжелые цепи миозина состоят из головного, шейного и хвостового доменов. Типичный скелетно-мышечный миозин (миозин II) состоит из 2 тяжелых цепей и 4 легких. Начиная с N-конца тяжелой цепи можно выделить следующие участки:

1. *Моторный домен* (головка или поперечный мостик), в последовательности которого наблюдается высокая консервативность среди всех классов миозина и где находится АТФаза. Структура этого участка различных миозинов - типа I, II, V и VI - была определена методом рентгеноструктурного анализа (Rayment et al., 1993b; Kollmar et al., 2002; Coureux et al., 2003, 2004). Все они очень похожи. Состоят из семи β -листов, окруженных большим количеством α -спиралей. АТФ-связывающий сайт состоит из Φ -петли (P-loop), похожей на Φ -петлю G-белков (Smith, Rayment, 1996). Моторный домен миозина имеет актин-связывающий сайт, который разделен глубокой расщелиной, открывающейся и закрывающейся в ответ на связывание АТФ. К тому же, есть "конвертерный" домен, вращающийся примерно на 60° при связывании АТФ и высвобождении продуктов расщепления. Конвертерный домен является якорем для "рычага" (lever arm) на C-конце, который усиливает изменения в структуре моторного домена, индуцированные связыванием АТФ и высвобождением продуктов гидролиза. АТФ-связывающий участок аналогичен тому, что встречается в кинезинах - моторах, связанных с микротрубочками. Это подразумевает использование аналогичного АТФ-зависимого механизма конформационных перестроек с целью генерации усилия этими моторными белками (Vale, Milligan, 2000).

2. *Рычаг* или шейный участок, представленный длинной α -спиралью с вариабельной длиной из большого числа характерных IQ-мотивов (от одного до шести), имеет консенсусную кальмодулин-связывающую последовательность (IQxxxRGxxxR) (Cheney, Mooseker, 1992). Они связывают либо специфичные для миозина легкие цепи, либо кальмодулин.

3. *Хвостовой* участок, который очень изменчив по аминокислотной последовательности, длине, составу доменов и организации. Хвостовые домены отвечают за таргетирование клеток и функцию миозина (например, сборка в нити, связывание грузов – так же известно как *карга*-связывание). Характерной особенностью миозина II является наличие двухцепочных α -спиральных хвостов, которые свободно формируют различные филаменты.

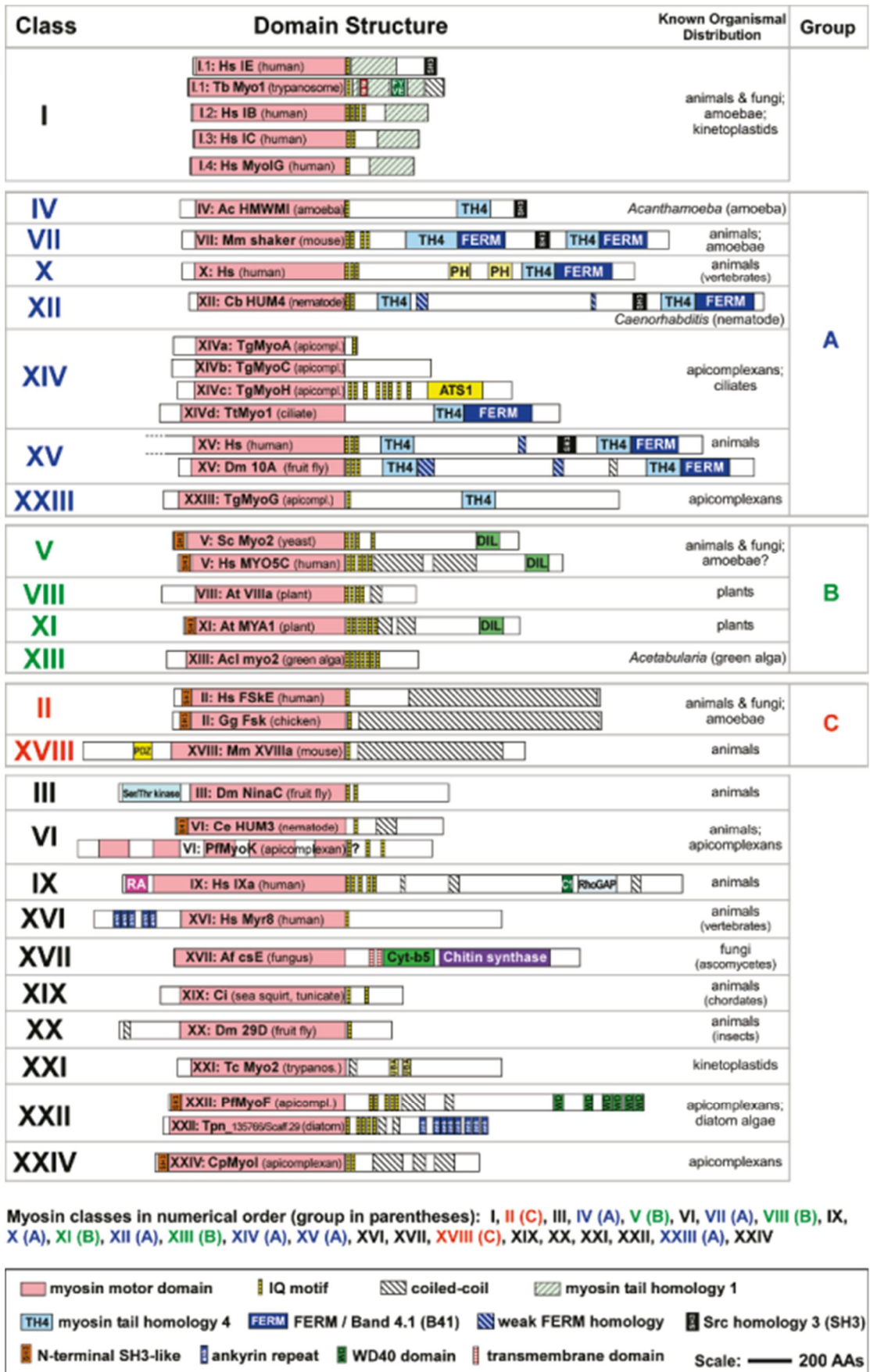


Рисунок 8. Схематическое представление классов традиционных миозинов по их распределению в различных организмах. Классификация основана на филогенетическом анализе консервативного моторного домена миозина (по Foth et al., 2006). Предложены три группы (A, B, C) классов миозинов, содержащих MyTH4-домены (группа A), миозинов, содержащих DIL- домены и родственные классы (группа B), и близко родственные классы II и XVIII (группа C).

В скелетно-мышечных миозинах эти хвосты агрегируют вместе с образованием толстых нитей. Наличие двух головок в миозине II, по-видимому, функционально не существенно, поскольку миозины II связываются с актиновыми нитями в течение коротких периодов и проводят большую часть «своего времени» в несвязанном с актином состоянии. Две головки, видимо, работают независимо друг от друга. С другой стороны, для миозинов V, которые шагают поступательно по актиновым нитям по механизму рука-за-рукой (hand-to-hand), присутствие димера функционально важно, и головки взаимодействуют строго посредством связывания с актином.

Поперечный мостик или моторный домен, впервые идентифицированный методом электронной микроскопии (Huxley, 1957), может быть получен из мышц кролика в качестве протеолитического фрагмента миозина – субфрагмента 1 или S1 (Margossian, Lowey, 1982), который состоит из трёх полипептидных цепей – одного тяжелого и двух лёгких. S1 миозина содержит актин-активируемую АТФазу и двигает актиновые нити в искусственных системах биологической подвижности (*in vitro motility assay*). К тому же, в отсутствие нуклеотидов, формирует сильную (ригорную) связь с актином. Первая кристаллическая структура была решена с использованием S1 миозина из скелетных мышц кролика (Rayment et al., 1993b).

Депонированы более сорока структур поперечного мостика (или их отдельных фрагментов) в базу данных белков. Эти структуры представляют различные типы миозина, комбинированные с широким диапазоном аналогов нуклеотидов. Для понимания значения данных структур необходимо ассоциировать их с определёнными стадиями цикла образования поперечного мостика (Cougeux et al., 2004; Geeves, Holmes, 2005). Лимном и Тейлором (Lymn, Taylor, 1971) был предложен четырехэтапный цикл, с целью объяснения некоторых кинетических свойств актин-миозинового комплекса.

Этот цикл также является хорошим фундаментом для классификации известных конформаций поперечного мостика. Известные структуры собраны в три класса, которые могут быть идентифицированы в трёх состояниях из четырех состояний цикла Лимна-Тейлора. К сожалению, кристаллические структуры получены от головок миозина без актина, в то время как два состояния в цикле Лимна-Тейлора связаны с актином. Для решения данной проблемы используются данные по электронной микроскопии.

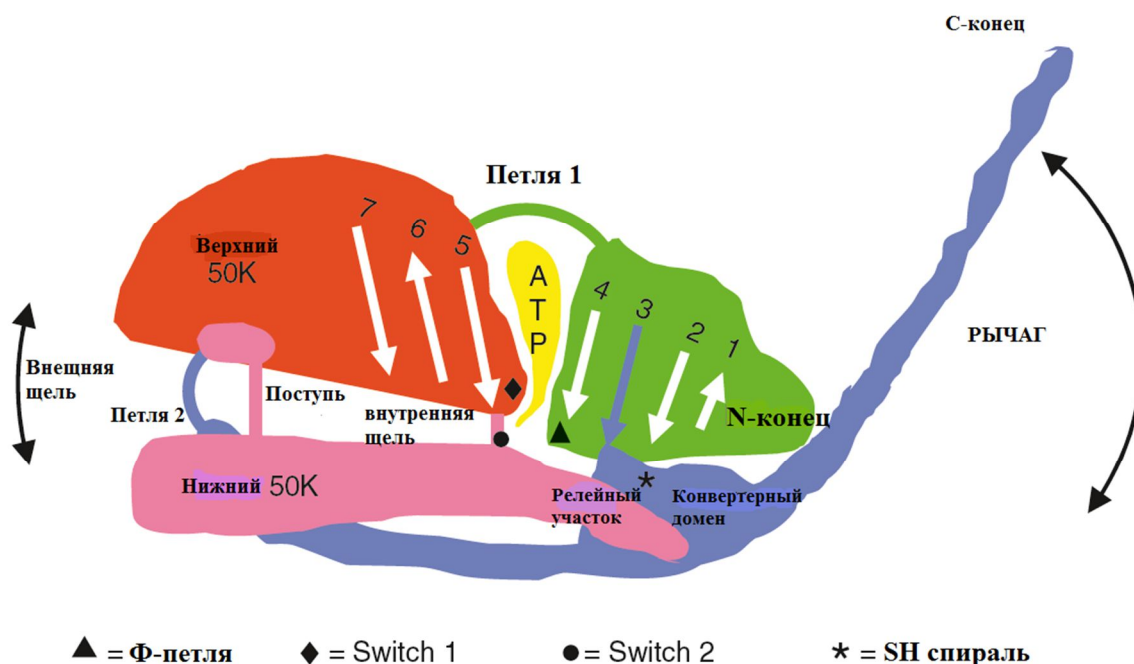


Рисунок 9. Схематическое изображение моторного домена, показывающего основные особенности функционирования (по Bagshaw, 2007, с модификациями).

Рассмотрим цикл подробнее. Моторный домен миозина, как уже отмечалось, является АТФазой. АТФаза стимулируется при связывании с актином. В отсутствие нуклеотида поперечный мостик крепко связывается с актиновой нитью, образуя "сильную" форму связывания или "ригорный" комплекс (стадия 1). Связывание аденозинтрифосфата с АТФазным центром на поперечном мостике приводит к быстрой диссоциации актомиозинового комплекса (стадия 2). На следующем этапе миозин гидролизует связанный АТФ и формирует устойчивый комплекс миозина с продуктами гидролиза (стадия 3 – ADP-Pi). Реакция снабжает энергией поперечный мостик, который далее связывается с соседним сайтом на актине (стадия 4). Связывание к актину высвобождает продукты гидролиза. Сначала высвобождается неорганический фосфат, в результате чего поперечный мостик меняет свою конформацию таким образом, что тянет актин приблизительно на расстояние в 10 нм. Этот процесс был назван «рабочим ходом» (“power stroke” или “working stroke”) или шагом поперечного мостика. В конце рабочего хода высвобождается АДФ. Свободный сайт позволяет присоединить к миозину новую молекулу АТФ, после чего происходит быстрое высвобождение поперечного мостика от актинового филамента и цикл запускается повторно. В отсутствие АТФ (стадия называется *rigor mortis*⁵) поперечный мостик в завершения рабочего хода сильно связывается с актином. Так как АТФ изобилует в живых мышцах, то это состояние является переходным в цикле Лимна-Тейлора. Тем не менее, большинство структур, полученных методом рентгеноструктурного анализа, не

⁵ от *лат.* – трупное окоченение

рассматриваются в цикле. Стадия I впервые была получена по исследованию миозинов V и VI, которые являются процессивными миозинами (т.е., они остаются прикрепленными с актиновым филаментом при движении вдоль него). Такой процесс был также обнаружен у миозина II гребешков (Yang et al., 2007).

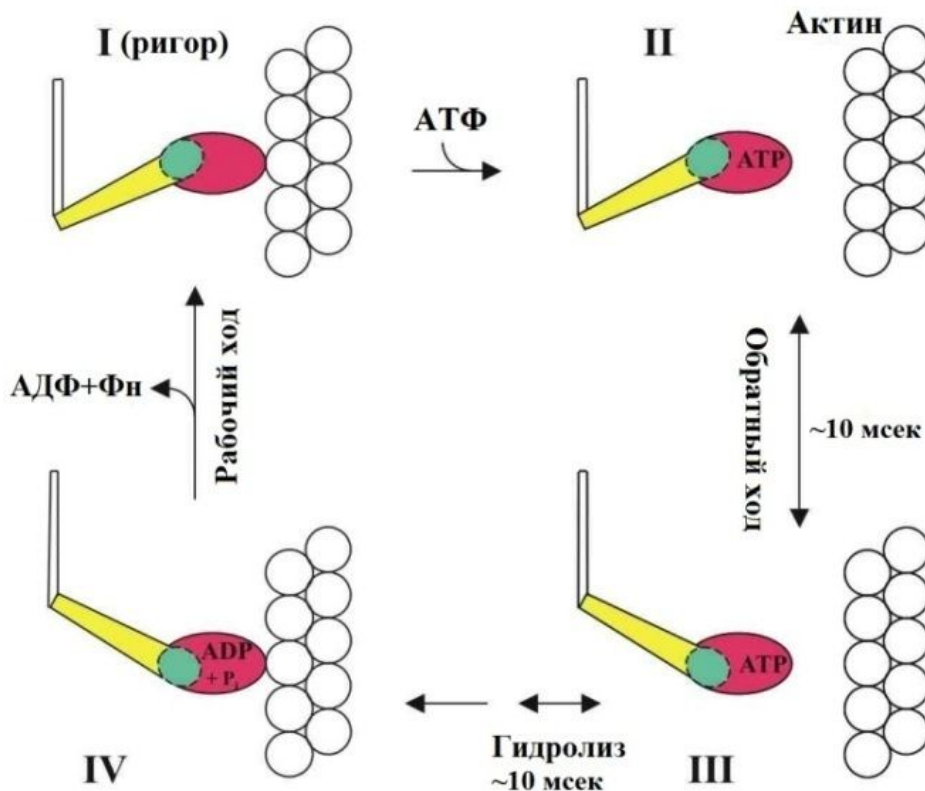


Рисунок 10. Схематическое изображение цикла Лимна-Тейлора (по Lymn, Taylor, 1971; с модификациями).

Инкубация актиновых филаментов с изолированным S1 миозина без АТФ приводит к формированию комплекса, известного как "декорированный актин". Декорированный актин является модельной системой для изучения сильного взаимодействия между актином и миозином. К сожалению, не существует кристаллографических данных актин-миозинового комплекса. Трехмерная структура комплекса может быть выведена из электронно-микроскопических фотографий с высоким разрешением (Moore et al., 1970). Криоэлектронная микроскопия дает разрешение 13 Å скелетного актина кролика, декорированного скелетным S1 курицы (Holmes et al., 2003). Устанавливая известные кристаллические структуры в полученные электронно-микроскопические карты, можно получить атомную модель ригорного комплекса (Holmes et al., 2004).

Первые доказательства относительно полиморфизма миозина были получены структурными исследованиями глицеринизированных мышечных волокон (Reedy et al., 1965). Авторы показали, что в состоянии ригора поперечные мостики находятся под углом $\sim 45^\circ$ к оси

тонкой нити, которые выпрямляются (под угол $\sim 90^\circ$) в присутствии АТФ. Эти результаты позднее были использованы в моделях мышечного сокращения (Huxley, Simmons, 1971; Lynn, Taylor, 1971), подразумевавшие поворот (или вращение) поперечного мостика на поверхности актинового филамента; так называемый “качающийся поперечный мостик”. Кристаллическая структура поперечного мостика (Rayment et al., 1993b) и атомная модель актиновой нити (Holmes et al., 1990) были использованы для построения модели актомиозинового комплекса (Rayment et al., 1993a), который показал, что длинный шейный участок, несущий легкие цепи, отдалён от центра актинового филамента, что делает его прекрасным рычагом. Спектроскопические исследования показали, что большинство поперечных мостиков не двигаются во время цикла сокращения (Cooke, 1986). Эксперимент Уеды и коллег (Uyeda et al., 1996) на миозиновых головках *Dictyostelium* с генетически модифицированными шейками или с рычагами разной длины показал, что скорость перемещения актиновых филаментов относительно молекул миозина строго коррелирует с длиной рычага: была выявлена линейная зависимость. Эта и новая конформация миозинового мостика (Smith, Rayment, 1996) согласуются с той идеей, что большинство поперечных мостиков связываются с актином без существенных изменений формы. Однако С-концевая шейка, или рычаг, “качается” под большим углом (60°) для перемещения актина относительно миозина. Генетически-модифицированные рычаги из повторов α -актинина, показали аналогичные с результатами Уеды и сотрудников скорости в *in vitro motility assay* (Anson et al., 1996). В итоге модель “качающегося поперечного мостика” стала моделью “качающегося рычага” (Holmes, 1996, 1997).

Связывание актина и нуклеотидов к миозину антагонистичны, что является одним из характерных свойств миозина. Так, выход АТФ при связывании миозина с актином ускоряется в 10^4 раз (Sleep, Hutton, 1978). Структурные исследования показывают, что связь между сайтами, связывающими актин и нуклеотиды, может включать открывание и закрывание щели между нижним и верхним 50-кДа доменами головки миозина. Такое предположение было поддержано флуоресцентными исследованиями (Yengo et al., 2002). Вскоре после этого исследования структуры S1 миозина V в отсутствие нуклеотидов, действительно, показали, что щель может находиться в закрытом состоянии (Coueux et al., 2003). Реконструкция актин-миозинового комплекса с использованием криоэлектронной микроскопии продемонстрировала закрывание щели миозина II при сильном связывании миозина с актином (Holmes et al., 2003). Таким образом, закрывание щели включает вращение области 50-кДа домена, в результате чего открывается сайт связывания АТФ.

S1 включает первые 843 аминокислотных остатка тяжёлой цепи скелетных мышц кролика и две лёгкие цепи. Морфологически это и есть поперечный мостик, содержащий всю ферментативную активность миозина. Ограниченный протеолиз расщепляет S1 на три

фрагмента, названных согласно наблюдаемым в электрофореграммах их молекулярным массам – 25 К (N-терминальный), 50 К (средний или центральный) и 20 К (С-конец) (Balint et al., 1978). Эти фрагменты остаются связанными в отсутствие денатурирующих условий, а расщеплённый таким образом S1 сохраняет функциональную активность. Связывание актина и нуклеотидов к миозиновой головке влияет на скорость протеолиза и может включать новые сайты расщепления (Mornet et al., 1981; Hozumi, Muhrad, 1981; Applegate, Reisler, 1984). Понятия "домены", связанные с чувствительными участками миозина при протеолизе, возникли именно при этих исследованиях. Структура субфрагмента-1 показывает позиции гибких петель (петли 1 и 2), которые чувствительны к протеолизу (рис. 9).

Первая кристаллографическая структура субфрагмента-1 (Rayment et al., 1993b) в настоящее время признана как результат пост-ригорного состояния (Holmes et al., 2004; Coureux et al., 2004), несмотря на то, что она изначально предполагала ригор-подобное состояние. Последнее предположение было выдвинуто на основании электронно-микроскопической реконструкции декорированного актина (Rayment et al., 1993a).

Поперечный мостик имеет продолговатую головку, состоящую, как уже отмечалось, из 7 β -листов и окружающих их α -спиралей, формирующих глубокую щель на конце поперечного мостика. Щель разделена на 2 субдомена, которые называются верхний 50-К и нижний 50-К домены. Оба домена вовлечены в связывание с актином. Рэймент с сотрудниками (Rayment et al., 1993a) предположили, что связывание актина может вызывать закрывание щели. АТФ-связывающий сайт, который лежит ближе к основанию щели, состоит из "Ф-петли", ограниченной сегментами *switch 1* и *switch 2*, подобно тем, что были обнаружены в G-белках (Smith, Rayment, 1996). Сегмент *switch 2*, который является структурной частью малого 50-К домена, соединяется с "релейной спиралью". С-концевой участок, иногда называемый "шейным" участком, обеспечивает соединение к толстой нити (в миозине II) или с грузом в немышенных миозинах. Этот участок формирует длинную α -спираль, содержащую "IQ"-повторы, каждая из которых связывает кальмодулин-подобную лёгкую цепь (или кальмодулин). В случае с миозином II, существуют два IQ-повтора, которые связывают две специфические лёгкие цепи; в случае миозина V – таких повторов шесть.

N-концевой участок рычага как бы заякорен в конвертерный домен, который в свою очередь связывается с дистальным концом релейной спирали. Конвертерный домен фактически поддерживается двумя взаимодействующими спиралями: наружным концом релейной спирали и SH1. SH1-(цистеиновая) группа имеет относительную реактивность и может быть использована в качестве сайта связывания флуоресцентных меток.

Петля 1 и петля 2 соединены гибкими участками. N-концевая область петли 2 высоко заряжена. Она образует часть актин-связывающего сайта. Длина и состав петли 1 имеет значительное влияние на связывание нуклеотидов.

Все классы миозинов II содержат N-терминальный участок примерно из 80 остатков, которые включают SH3-подобный субдомен Src (Serin rich–богатые серином) гомологии. Расщепление в позиции 80-ого остатка приводит к полному нарушению функции миозина II (Fujita-Becker et al., 2006). И наоборот, миозин без SH3-подобного субдомена и с N-концевой областью проявляет много меньше функциональных нарушений. Таким образом, SH3-подобный субдомен, по-видимому, необходим для корректной связи между функциональными участками внутри моторного домена миозина. Однако механизм его функционирования остается непонятным, поскольку SH3 домен отсутствует в миозине I.

К настоящему времени определены три первичные конформации миозинового поперечного мостика, которые можно связать со стадиями цикла Лимна-Тейлора. Эти структуры были названы пост-ригорной, ригор-подобной или ригорной (если связывается с актином) и “пре-шаговой” (pre-powerstroke) структурой.

Определённое количество белков, которые называются миозин связывающими белками или MyBPs, связываются с толстыми нитями с целью стабилизации их структуры и образования связок между толстыми нитями. Основными миозин-связывающими белками в мышцах позвоночных являются титин (так же известный, как коннектин или тайтин), миозин-связывающий белок C или просто C белок, миомезин и M белок.

1.3 Тропомиозин: структура, функции, патология.

1.3.1 Изоформы тропомиозина

Вслед за открытием тропомиозина в 1946 г. (Bailey, 1946) к настоящему времени этот белок был обнаружен в широком диапазоне организмов – от дрожжей до человека. Эволюция одноклеточных организмов к многоклеточным на фоне возрастающего усложнения шла с параллельным увеличением числа генов тропомиозина (ТМ) и, следовательно, количества изоформ, кодируемых каждым геном. Регуляция экспрессии изоформ ТМ тесно связана с морфологическими изменениями, имеющими место в течение развития и дифференциации клетки. Экспрессия специфичных изоформ тропомиозина в тканях и в клетках имеет многоуровневую регуляцию, обеспечивающую точную пространственную и временную регуляцию экспрессии белка (Schevzov, O’Neill, 2008).

Тропомиозин принадлежит мультигенному семейству актин-связывающих белков, и многообразие изоформ формируется по причине использования альтернативных промоторов и сплайсинга первичных транскриптов РНК. Количество генов, видимо, растёт с усложнением организма, тем самым увеличивая число изоформ, кодируемых этими генами (Таблица 1).

Таблица 1. Изоформы тропомиозина.

Организм(ы)	Наименование гена	Предполагаемое количество изоформ тропомиозина	Ссылки на работы
Грибы (<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	<i>cdc8TM</i>	1	<i>Balasubramanian et al.</i> , 1992; <i>Drees et al.</i> , 1995
	<i>TPM1</i>	1	
	<i>TPM2</i>	1	
Беспозвоночные: Нематоды (<i>Caenorhabditis elegans</i>) Насекомые (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>tmy-1/lev-11</i>	4	<i>Kagawa et al.</i> , 1995; <i>Anyanful et al.</i> , 2001; <i>Karlik, Fyrberg</i> , 1986; <i>Hanke, Storti</i> , 1988
	<i>TmI</i>	2	
	<i>TmII</i>	6	
Оболочники (<i>Ciona intestinalis</i>)	<i>CTm1</i>	1	<i>Meedel, Hastings</i> , 1993
Позвоночные: Земноводные (<i>Xenopus laevis</i>)	α - <i>Tm</i>	5	<i>Hardy et al.</i> , 1991, 1995; <i>Hardy, Thiebaud</i> , 1992; <i>Gaillard et al.</i> , 1998
	β - <i>Tm</i>	2	
	<i>Tm-4</i>	3	
Птицы (<i>Курица, перепёлка</i>)	α - <i>Tm</i>	8	<i>MacLeod</i> , 1982; <i>Libri et al.</i> , 1989, 1990; <i>Forry-Schaudies, Hughes</i> , 1991; <i>Toutant et al.</i> , 1993; <i>Mak et al.</i> , 1980; <i>MacLeod et al.</i> , 1985; <i>Lees-Miller et al.</i> , 1990; <i>Beisel, Kennedy</i> , 1994; <i>Dufour et al.</i> , 1998; <i>Cooley, Bergstrom</i> , 2001; <i>Denz et al.</i> , 2004
	β - <i>Tm</i> (<i>Tm-1</i>)	9	
	<i>cardiac*</i>	3	
	<i>Tm_{nm}</i>	1	
Млекопитающие (<i>крыса, мышь, кролик, человек**</i>)	α - <i>Tm</i>	29	
	β - <i>Tm</i>	2	
	γ - <i>Tm</i>	10	
	δ - <i>Tm</i>	1	

*Ген, кодирующий сердечную изоформу ТМ, гомологичен гену *Tm4* крысы и *TPM4* человека.

**У человека вместо названий генов α -*Tm*, β -*Tm*, γ -*Tm* и δ -*Tm* приняты *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* и *TPM4*, соответственно.

В целом четыре гена кодируют более чем 40 вариантов ТМ согласно их молекулярным массам, классифицируемым в две большие группы – с высокой молекулярной массой (НМВ – *High Molecular Weight*) и низкой молекулярной массой (ЛМВ – *Low Molecular Weight*). НМВ-тропомиозины представлены последовательностью из ~284 аминокислотных остатков с видимой молекулярной массой на электрофореграммах в пределах от 33 до 40 кДа, а ЛМВ-изоформы состоят примерно из 247 аминокислотных остатков с молекулярной массой 28-34 кДа. Тропомиозины с высокой молекулярной массой классифицируются также согласно их тканевой специфичности: специфичные для поперечнополосатых мышц (α - и β -ТМ), гладких мышц (α -ТМ, также известный как Тм-6 (Schevzov et al., 2005)), мозга (ТМBr1 и ТМBr3), и тропомиозины, связанные с ранним развитием / пролиферацией (ТМ1, ТМ2 и ТМ3). Примерами изоформ с низкой молекулярной массой являются немышечные ТМ5NM1-11, кодируемые геном γ -ТМ, ТМ5a и ТМ5b, кодируемые геном α -ТМ, и ТМ4, являющийся продуктом гена δ -ТМ. Наличие многочисленных генов и альтернативного сплайсинга экзонов является принципиальным механизмом, определяющим регуляцию экспрессии изоформ ТМ (Gunning et al., 2005).

Большая часть информации относительно структуры гена ТМ приходит от клонов кДНК и генома, которые были изолированы, в частности, от грызунов (крысы, мыши) и человека. Общая картина распределения затем была построена с помощью базы данных по геному и EST- (Expressed sequence tag) последовательностей, которые обнаруживают геномные последовательности и/ или гены ТМ в других видах млекопитающих.

Ген α -тропомиозина является наиболее сложным, комплексным геном тропомиозина млекопитающих, структура которого впервые была выяснена из геномного анализа клонов крысы (Ruiz-Opazo, Nadal-Ginard, 1987; Wiczorek et al., 1988; Lees-Miller et al., 1990). Ген охватывает примерно 28 тыс. пар оснований (или пар нуклеотидов) у крысы, содержит 15 экзонов и включает два альтернативных промотора, два внутренних взаимоисключающих экзона (2a:2b и 6a:6b) и четыре 3'экзона альтернативного сплайсинга (9a-9d), которые кодируют 4 разных карбоксильных конца. Гены α -ТМ мыши и человека (*TPM1*) представлены примерно 27 тыс. п.н. и 29 тыс. п.н., соответственно, и показывают аналогичную структуру. В дополнение к экспрессии по крайней мере четырёх цитоскелетных изоформ, ген α -ТМ может производить изоформы, специфичные для скелетной и гладкой мышц, где экзон 2a для гладких мышц является уникальным (Ruiz-Opazo et al., 1985; Goodwin et al., 1991).

Ген β -тропомиозина (*TPM2*) млекопитающих колеблется в пределах от 8 тыс. п.н. у человека до 9 тыс. п.н. у мыши, и 10 тыс. п.н. у крысы.

Структура гена γ -тропомиозина впервые была описана у человека. Ген человека охватывает 42 тыс. п.н. и состоит из 14 экзонов с двумя промоторами, единственным взаимоисключающим внутренним экзоном (6a:6b) и четырёх кодирующих карбоксильные концы

экзонов, подвергшихся альтернативному сплайсингу (Clayton et al., 1988). Гены мыши и крысы охватывают 28 тыс. п.н. и 27 тыс. п.н., соответственно. Ген γ -Тм (ТРМ3 у человека) кодирует тропомиозин с 284 а.к. остатками, представленный в медленных скелетных мышцах и некоторых цитоскелетных тропомиозинов с низкой молекулярной массой.

Структура гена δ -Тм млекопитающих была впервые описана для гена крысы (также известного как ТМ-4). Ген охватывает 16 тыс. п.н. и состоит из 8 экзонов, но не выявляющих экзонов, подвергшихся альтернативному сплайсингу. Ген δ -Тм мыши структурно эквивалентен гену крысы и охватывает 18 тыс. п.н. Ген человека охватывает 35 тыс. п.н., обладает экзоном 2b и может производить белок из 284 а.к. остатков, содержащий карбоксильный конец, кодируемый экзоном 9d, который аналогичен с изоформой ТМ гладких мышц, производимой геном δ -Тм перепёлки.

1.3.2 Структура тропомиозина

Тропомиозин был впервые описан в качестве ассиметричного белка (Bailey, 1946) и приписан к классу *k-m-e-f* (кератин-миозин-эпидермин-фибриноген) α -спиральных белков в ранних исследованиях, выполненных с использованием метода рентгеноструктурного анализа (Astbury et al., 1948). На основании этих исследований Френсис Крик предложил модель для α -спиральной суперспирали, в которой две α -спирали с семикратной периодичностью в последовательности ассоциируются с формированием суперспирали (*coiled coil*). Гидрофобные остатки в первой и четвёртой позициях в повторе (*a* и *d*, где 7 остатков обозначаются как *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*) упакованы особым способом, образуя «холмики» во «впадинах» (от *англ.* knobs into holes), позволяющим поддерживать две цепи вместе (Crick, 1953; рис. 11a). Определение аминокислотной последовательности тропомиозина (Hodges, Smillie, 1972a, b; Sodek et al., 1972), завершённое и полностью опубликованное в 1978 (Stone, Smillie, 1978), подтвердило наличие предположенным Ф. Криком гептапептидного повтора («гептады») из гидрофобных остатков и показало, что последовательность тропомиозина соответствует непрерывной суперспирали на протяжении всей его длины (McLachlan, Stewart, 1975; Parry, 1975). Заряжённые остатки в *e* и *g* позициях способствуют образованию межспиральных солевых мостиков (Parry, 1975; McLachlan et al., 1975) (рис. 11a): такая организация была проверена химическими методами. Предсказанная упаковка «холмики во впадинах» гидрофобного интерфейса суперспирали и солевые мостики *e-g* были первоначально доказаны в структуре лейцинового zipper GCN4 (O'Shea et al., 1991) и годами позже в структуре фрагмента тропомиозина с высоким разрешением (Brown et al., 2001).

Саркомерный и немышечные НМW-тропомиозины, как отмечалось выше, представлены 284 аминокислотными остатками и двумя цепями, ассоциированными параллельно и дающими

стержнеобразную молекулы с диаметром приблизительно 20 Å и длиной 400 Å, что соответствует длине семи актиновых субъединиц в составе нити (рис. 11б). Тропомиозин необычен тем, что не существует разрывов в определяемом гептапептидном повторе *coiled coil* в виде «пропусков» или «прерываний», обнаруженных в большинстве других суперспиралях аналогичной длины (см. Lupas, Gruber, 2005). Тем не менее, детальный анализ последовательности показывает, что неканонические участки тропомиозина, способствующие «гибкости» суперспирали, являются ключевыми для выполнения большинства базовых функций тропомиозина, например, связывания вдоль спирали актиновой нити.

Вдобавок к непрерывно повторяющимся «гептадам» длиной в семь аминокислот, присущим всем α -спиральным суперспиралям, тропомиозин показывает уникальный длинный период примерно в 40 аминокислотных остатков (Crick 1953; Stone, Smillie 1978; Parry 1975; Stewart, McLachlan, 1975; Phillips et al. 1986). Такие периоды составляют семь модулирующих доменов тропомиозина, которые пересекаются с семью актин-связывающими областями вдоль тонких нитей. Другие суперспирали, представленные в мышце, которые не имеют семикратной модулирующей периодичности, не связываются с актином (например, стержневая часть миозина в составе толстых нитей и парамиозина у беспозвоночных). Однако, большинство соматических клеток содержат урезанные изоформы тропомиозина из 4-6 актин-связывающих модулей длиной в ~40 аминокислотных остатков, предназначенных для связывания к более коротким отрезкам тонких нитей (Gunning et al., 2005, 2008).

Цикл экспериментов, выполненных группами Хитчкок Де-Грегори и Тобакмана (Hitchcock-DeGregori, An, 1996; Landis et al. 1999; Rosol et al. 2000; Hitchcock-DeGregori et al. 2001, 2002), показали, что строгая точность модульного квантования тропомиозина существенна для связывания с актином: тропомиозин был укорочен удалением одного и более повторяющихся модулей и оставшиеся модули в составе этих конструкций по-прежнему связывали актин. В отличие от этого, при введении дополнительных аминокислот или делеций, изменяющих длину одного или другого из модулей, расположение тропомиозина на актине нарушалось и связывание к актину значительно слабело. Аналогично, замена рандомных витков в области суперспиральных модулей приводили к потере способности тропомиозина связывать актин.

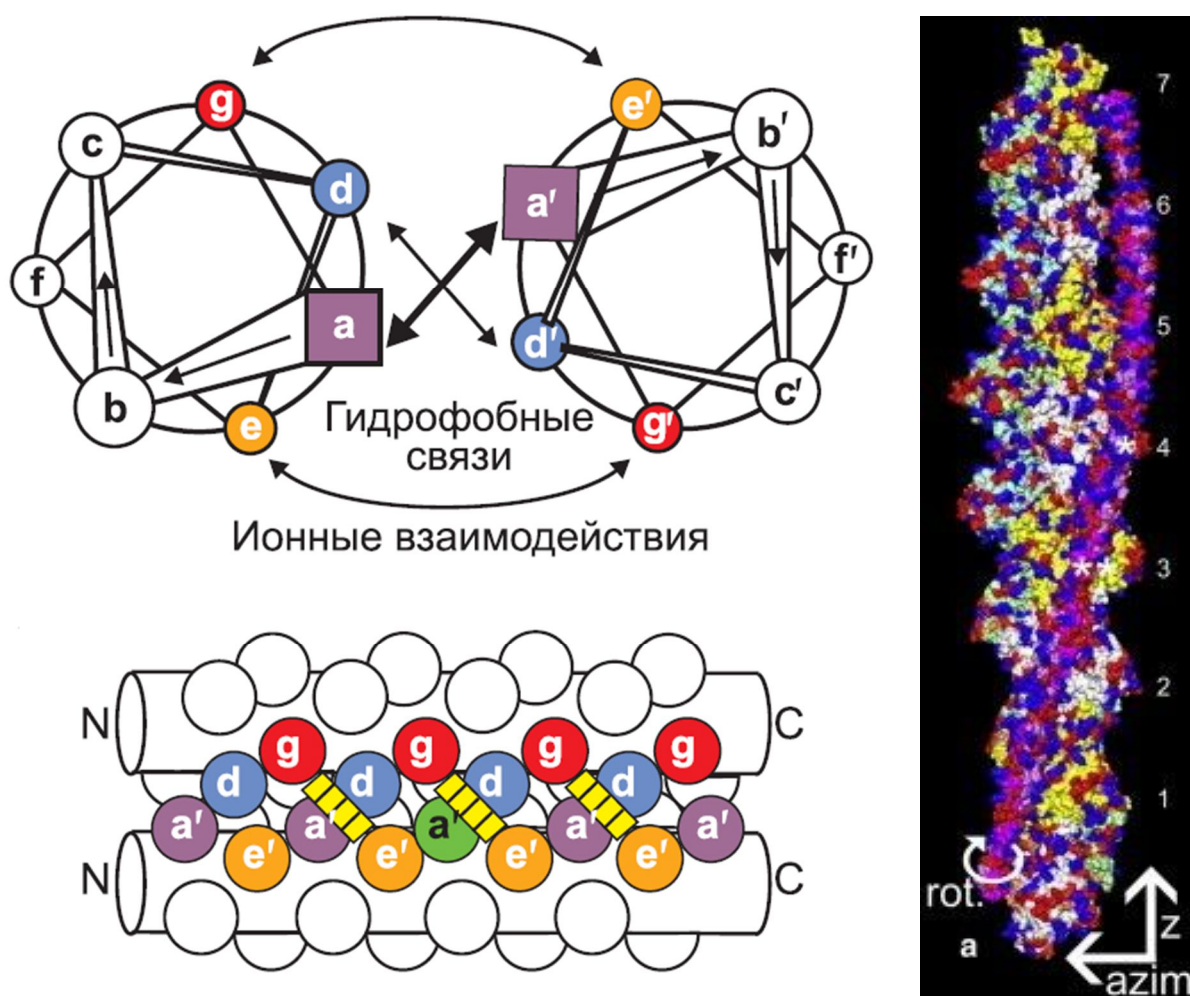


Рисунок 11. (а) Взаимодействие двух α -спиралей тропомиозина в составе димера (виды "с торца" и с боку; по Невзоров, Левицкий, 2011). (б) Обзор поверхности, показывающей локализацию тропомиозина на F-актине, оптимизированную электростатическими взаимодействиями между двумя структурами (по Li et al., 2011).

На поверхности каждого из повторяющихся модулей тропомиозина содержатся стратегически важные кислые остатки. Они, несомненно, взаимодействуют электростатическим образом с положительно заряженными остатками, присутствующими на комплементарной плоской поверхности актиновых субъединиц по длине тонких нитей (Lorenz et al. 1995; Brown et al. 2005). Такое взаимодействие согласуется с данными по чувствительности к концентрации одновалентных ионов при связывании тропомиозина с актином (Eaton et al. 1975; Hill et al. 1992; Willadsen et al. 1992). К сожалению, отсутствие кристаллической структуры комплекса актин-тропомиозин с высоким разрешением не позволяет определить и построить точные позиции межфазных взаимодействий между этими белками.

Тем не менее, результаты моделирования *in silico* предполагают, что заряды на поверхностях актина и тропомиозина являются комплементарными (Lorenz et al. 1995; Brown et al., 2005; Brown, Cohen, 2005).

Атомная модель актин-тропомиозинового комплекса была построена подгонкой структуры закрученной суперспирали, основанной на данных по последовательности тропомиозина из дифракционных картин рентгеновского излучения волокон, ориентированных в гелях из F-актин-тропомиозина (Lorenz et al., 1995). Модель показывает, что тропомиозин лежит на поверхности F-актина в радиусе $\sim 39 \text{ \AA}$ от оси актиновой нити. Сравнение атомных координат в тропомиозине с электронно-микроскопическими реконструкциями тропонин-тропомиозин-регулируемых тонких нитей, дало сопоставимые значения с радиусом тропомиозина: радиус 40 \AA для нитей, обработанных ионами кальция, и 42 \AA для свободных от кальция нитей (Poole et al., 2006). Расположение на таком расстоянии от центра нити исключает сильное взаимодействие тропомиозина с актином (типа «ключа к замку»). Наиболее близкое расстояние между C^{α} атомами актина и тропомиозина составляет $\sim 10\text{-}11 \text{ \AA}$. Такое расстояние допускает наличие электростатических взаимодействий. По-видимому, именно такое расположение тропомиозинового «кабеля» на F-актине позволяет молекуле тропомиозина без каких-либо существенных энергетических барьеров перемещаться в азимутальном направлении над поверхностью тонкой нити.

Поскольку тропомиозин выполняет динамическую функцию в регуляции тонких нитей, представляется интересным рассмотрение стабильности (в том числе, гибкости) молекулы тропомиозина. Несмотря на непрерывную суперспиральную структуру, показано, что стабильность неравномерно распределена вдоль длины молекулы. В кристаллической структуре белка существуют структурно различные домены, отличающиеся по своей стабильности и конформационной гибкости, а также наблюдаются отклонения в расстоянии между цепями и длине шага суперспирали (Phillips et al., 1980, 1986). Внутренняя гибкость и наличие множества развёрнутых доменов с отличающейся стабильностью и чувствительностью к протеолизу подтверждены большим количеством биохимических и биофизических экспериментов (Graceffa, Lehrer, 1980; Potekhin, Privalov, 1982; Betteridge, Lehrer, 1983; Ueno, 1984; Swenson, Stellwagen, 1989; Ishii et al., 1992; Phillips, Chacko, 1996). Участки с меньшей стабильностью играют важную роль в связывании с F-актином и регуляции функции последнего (Ishii, Lehrer, 1985; Hitchcock-DeGregori et al., 2002; Singh, Hitchcock-DeGregori, 2006).

Предельное разрешение кристаллической структуры целостной молекулы тропомиозина равно 7 \AA . Такое невысокое разрешение связано с высоким содержанием растворителя в кристаллах тропомиозина (свыше 90%; Whitby, Phillips, 2000). Эти структуры показали общую волнистую суперспиральную организацию, гибкость и изгибы в кристаллической решётке вместе с локальными отклонениями в шаге и в радиусе молекулы. Одним примечательным исходом структурных исследований явилась переменная и динамическая природа интерфейса суперспирали, а также её роль в связывании спирального актина. Необычная особенность

тропомиозина среди других суперспиралей является высокая встречаемость остатка аланина (Ala) в *d* позициях интерфейса (Conway, Parry, 1990), а также остатков других «неканонических» аминокислот. «Аланиновые кластеры», охарактеризованные Брауном с сотрудниками (Brown et al., 2001), показаны на рис. 12а. Чередование интерфейсов стабилизирующих и дестабилизирующих консервативных остатков, как считается, должно быть важным в фолдинге двух цепей, общей стабильности и межспиральном расстоянии (Kwok, Hodges, 2004). Некоторые вызывающие заболевания точечные мутации в молекуле тропомиозина меняют стабильность суперспирали (будут рассматриваться ниже).

Прорывом в понимании роли консервативных дестабилизирующих «аланиновых кластеров» явилось определение структуры остатков 1-80 с атомным разрешением, содержащей первый аланиновый кластер (Brown et al., 2001) (RCSB Protein Data Bank, код доступа 1IC2). Авторы отметили, что радиус суперспирали меньше в области аланинового кластера, чем в участках канонической суперспирали; такая особенность наблюдалась в сайтах всех пяти аланиновых кластеров в исследовании других структур тропомиозина (Brown et al., 2005; Nitanaï et al., 2007). На рис. 12б показаны участки аланинового кластера (рис. 2В, левая часть), которые смещены по оси и находятся ближе друг к другу на 2 Å, чем участки с лейциновым интерфейсом (рис. 12б, правая часть). Таким образом, область аланинового кластера (рис. 12б, левая часть и 12в, левая часть) хуже упакована и цепи располагаются ближе друг к другу, что отображается в меньшей межспиральной дистанции, по сравнению с моделью с каноническим интерфейсом суперспирали из остатков Leu и Val (рис. 12в, центральная часть). Диаметр и упаковка отображают характер стержней боковых цепей. Интерфейс с более дестабилизирующими аминокислотными остатками Asn и Gln плохо упакован (рис. 12в, правая часть), однако межспиральное расстояние аналогично той, что и при гидрофобных участках боковых цепей (Singh, Hitchcock-DeGregori, 2003).

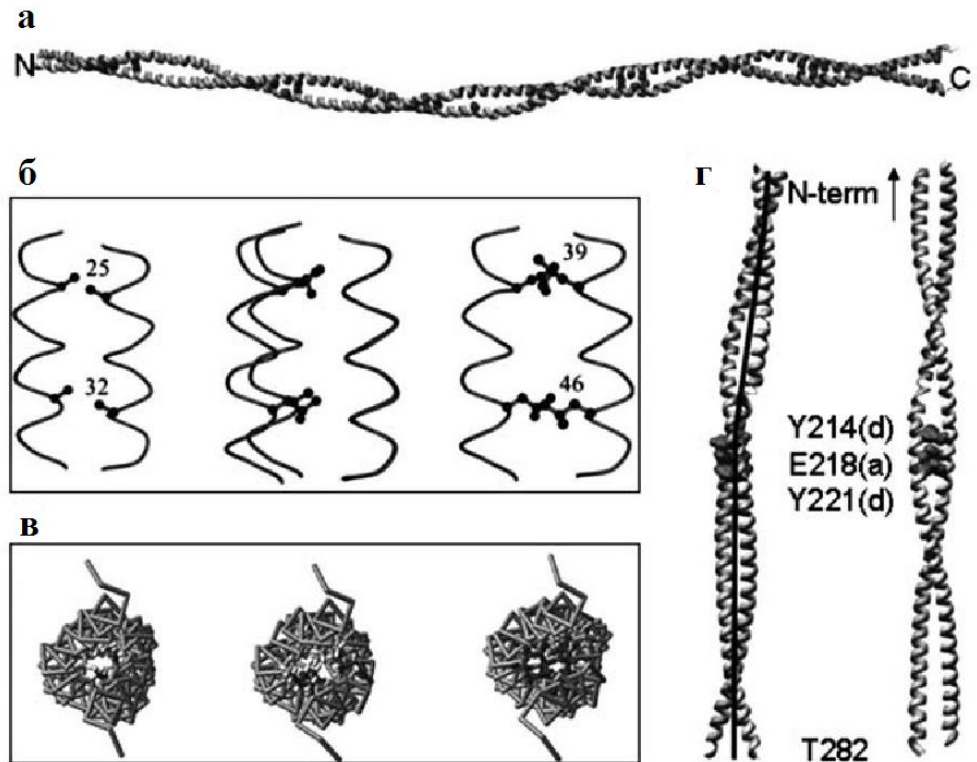


Рисунок 12. Схематическое изображение суперспирали тропомиозина (по De-Gregori, 2008). (а) отображены поверхности боковых цепей аланиновых кластеров на модели тропомиозина с разрешением 7 Å. (б) модели сегментов из кристаллической структуры первых 80 аминокислотных остатков тропомиозина, показывающих влияние остатков на упаковку, осевые колебания и межспиральное расстояние. (в) модели участков тропомиозина, показывающих влияние остатков интерфейса на упаковку стержня спирали и межспиральное расстояние. (г) модель структуры С-концевой трети тропомиозина, стабилизированной на N-конце лейциновым zipperом. Приведены дестабилизирующие остатки боковых цепей.

В двух из пяти структурах аланинового кластера осевому расположению следует своеобразный осевой изгиб (Brown et al., 2001, 2005). Изгибы не наблюдаются во всех молекулах или во всех богатых аланином областях. Это предполагает, что изгибы отражают молекулярную гибкость, способную повлиять на кристаллическую упаковку белка (Hitchcock-DeGregori, 2008). Распределение дестабилизирующих аланиновых кластеров вдоль длины молекулы тропомиозина привели к выводу, что они *де факто* являются «пропусками» или «прерываниями», и что изгибы обеспечивают гибкость, необходимую тропомиозину для «наматывания» вокруг спиральной нити актина и осуществления динамической роли при регуляции работы тонкой нити (Brown et al., 2001). Важность нестабильных участков по сравнению с остатками аланина, или осевого расположения как такового, поддерживается исследованиями по мутагенезу, в которых дестабилизирующие остатки в сайтах аланиновых кластеров показали важную роль для кооперативного связывания с актином (Singh, Hitchcock-DeGregori, 2003, 2006).

Итак, присутствие повторов аланиновых кластеров (Conway, Parry, 1990) в тропомиозине вызывает локальное сужение и искривление суперспирального белка (Brown et al. 2001; Brown,

Cohen 2005, см. также Nitanaï et al., 2007; Minakata et al., 2008). Изгибы, скорее всего, ответственны за форму закрученной суперспирали тропомиозина, который хорошо соответствует поверхности F-актина. Формально, аланиновые кластеры могут изгибать нитевидный белок в противоположных направлениях. Один из гибких областей в тропомиозине находится в сайте с неканоническими, дестабилизирующими остатками (Tyr214, Glu218 и Tyr221 при *d*, *a* и *d* позициях интерфейса, соответственно), показанными в структурах фрагментов тропомиозина с высоким разрешением (Nitanaï et al., 2007). Здесь наблюдается плохо упакованная область и большая межспиральная дистанция: больше, чем в каноническом Leu-Val интерфейсе (рис. 12в). Нитанаи с коллегами отмечают, что второй изгиб в молекуле тропомиозина находится в позиции Asp137 – в другом плохо упакованном участке с аланином и аспарагиновой кислотой в интерфейсе и на «пике» межспиральной дистанции (Brown et al., 2005). Участок между изгибами в позициях Asp137 и Tyr214 важен для связывания с актином (Hitchcock-DeGregori et al., 2002; Singh, Hitchcock-DeGregori, 2006), для кооперативной активации актинового филамента миозином (Landis et al., 1999; Hitchcock-DeGregori et al., 2001), а также является областью, где связывается тропониновый стержень, содержащий тропонин С, тропонин I и С-концевой домен тропонина Т. Есть предположение, что сегментарная подвижность этой области, регулируемая связыванием Ca^{2+} с тропонином С, или связывание головок миозина к актиновым нитям, может быть ключевым моментом в активации тонкой нити (Hitchcock-DeGregori, 2008).

Интересный влияние неканонического интерфейса суперспирали на структуру наблюдается в С-конце, который формирует «перекрывающийся» комплекс с N-концом, ответственным за ассоциацию молекул тропомиозина вдоль длины актиновой нити. В двух кристаллических структурах 22 остатка С-конца раздвигаются друг относительно друга и две молекулы ассоциируются с формированием ненативного антипараллельного пучка из 4 спиралей (Li et al., 2002; Nitanaï et al., 2007). Гибкость обуславливается атипичными остатками – Gln263 (*d*) и Tyr267 (*a*), которые не упакованы в виде «холмиков» во «впадинах» и позволяют С-концевым цепям раздвигаться и формировать межмолекулярный комплекс. В растворе С-концевая структура полностью различается (Greenfield et al., 2003). С-конец является мономерным и вместо раздвижения, после остатка 269, цепи формируют необычную линейную, параллельную структуру с атипичными гидрофобными взаимодействиями. Как и в кристаллической структуре, Gln263 и Tyr267 плохо упакованы и выявляют конформационную гибкость. Гибкость необходима для обеспечения связи типа «головка-к-хвосту», поскольку замена аминокислотного остатка Gln263 на Leu (на канонический остаток) увеличивает стабильность и ингибирует способность С-концевого пептида формировать комплекс с N-концом тропомиозина и тропонина Т (Greenfield et al., 2002).

Предположение о существовании перекрывания молекул тропомиозина было выдвинуто в связи с тем, что длина тропомиозина, рассчитанная в кристаллах и паракристаллах была короче, чем ожидалось для спиральной молекулы из 284 остатков. Такой результат навёл на мысль о перекрывании примерно 9 остатков (McLachlan, Stewart, 1975; Phillips et al., 1979). Необходимость противоположных концов в образовании комплекса и нормального сродства к актину была изначально показана карбоксипептидазным перевариванием С-конца (Johnson, Smillie, 1977) и делеционным мутагенезом N-конца (Cho et al., 1990). Несмотря на то, что сайт перекрывания был идентифицирован в кристаллах тропомиозина, структура до сих пор не разрешена, оставляя открытым вопрос, как последовательный тропомиозин и предполагаемые им актин-связывающие сайты ассоциируются друг с другом и с мономерами актина в составе филамента. Структуры N- и С-конца с атомным разрешением и их динамика были получены с использованием модельных пептидов (Li et al., 2002; Greenfield et al., 1998, 2003), а структура сформированного перекрывающегося комплекса определена с использованием ЯМР (Greenfield et al., 2006). ЯМР-структуры комплекса перекрывания были получены с использованием пептидов как для поперечнополосатомышечной изоформы тропомиозина, так и гладкомышечной (Greenfield et al., 2009; Frye et al., 2010). Оба аддукта – скелетных и гладких мышц, показывают вращение примерно в 90° (т.е., поворот вокруг центральной оси) С-концевого суперспирального фрагмента относительно N-концевого суперспирального фрагмента. К тому же ось суперспирали N-концевых фрагментов не совпадает с осью С-концевого фрагмента, а вместо этого они расположены под углом относительно друг друга. Этот угол изгиба равен 12.4° в гладкомышечном соединении и 19.6° в поперечнополосатой мышце. В последнем случае наблюдается более значительное изгибание, чем в кривизне канонического тропомиозина на F-актине, который составляет 8.6 градусов (Li et al., 2010a). Влияет ли присутствие аддуктов ненативного белка на поворот и изгибание синтетических комплексов перекрывания, остаётся непонятным (Li et al., 2014).

Недавно методом молекулярной динамики (MD simulation) (Li et al., 2014) оценена гибкость комплексов перекрывания, т.е. отклонение угла изгиба от своего среднего значения во время МД расчётов. Стандартное отклонение угла изгибания (4.8°) для поперечнополосатой мышцы было значительно выше, чем для гладкой мышцы (3.8°). Эти значения равны динамическим персистентным длинам 342 и 546 нм, являющимся индикаторами жёсткости при изгибании, т.е. свойств материала комплексов перекрывания тропомиозина поперечнополосатых и гладких мышц (Li et al., 2010a,b)⁶. Таким образом, если в среднем комплекс перекрывания в гладкой мышце изгибается чуть больше, чем в поперечнополосатой мышце, он значительно

⁶ высокая динамическая персистентная длина соответствует низкой гибкости

жѐстче, как и было предположено наблюдениями по результатам исследований по электронной микроскопии на очищенных образцах тропомиозина (Sousa et al., 2010). Интересно, что жѐсткость 4-спирального домена перекрывания аналогична той, что у остальной части двухспирального тропомиозина, имеющего динамическую персистентную длину 423 нм (Li et al., 2010b).

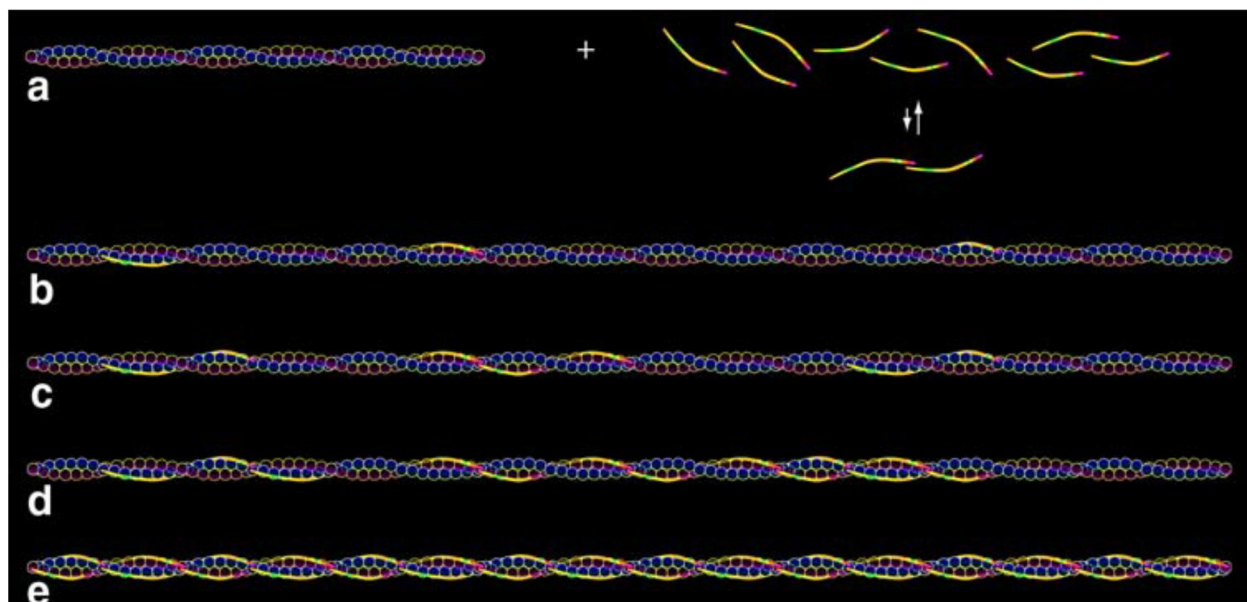


Рисунок 13. Схематическое изображение связывания тропомиозина с F-актином. (a) молекулы тропомиозина в начале смешивания F-актина и тропомиозина являются мономерами. (b) тропомиозин связывается с актином с очень низким K_a и только из-за того, что имеет правильную форму для связывания с семью мономерами актина. (c) молекулы тропомиозина формируют связи головкой к хвосту с соседними молекулами тропомиозина вдоль F-актина. (d) когда достигается критическая концентрация, тропомиозин формирует полимеры и происходит процесс сортировки между длинными и короткими нитями тропомиозина, приводя к насыщению тропомиозина на F-актине (e).

В 2008 году была предложена гипотеза *Gestalt*-связывания тропомиозина с актиновой нитью (Holmes, Lehman, 2008). Рассмотрим эту модель более подробно. Согласно ей «отдельные молекулы тропомиозина кратковременно связываются с F-актином с чрезвычайно низким K_a ⁷. Объединение возможно только из-за структурной комплементарности между F-актином и тропомиозином, уменьшающей затраты энтропии взаимодействия между этими белками. Поскольку контуры молекулы тропомиозина длиной в 40 нм представляют половину витка актиновой спирали, нет необходимости в широкой гибкости тропомиозина, чтобы оборачиваться вокруг актина, как предполагается. Таким образом, молекулы тропомиозина могут приближаться к актину как довольно жѐсткие закрученные суперспирали и участвовать в электростатических

⁷ K_a - коэффициент связывания

взаимодействиях. Когда достигается критическая концентрация тропомиозина на актине, тропомиозин будет «находить» партнёров (другие молекулы тропомиозина на нити) и связываться с ними, образуя полимеры. Как только полимеры тропомиозина начинают садиться на тонкие нити, происходит процесс сортировки, который облегчает связывание длинных нитей тропомиозина, связанных «головкой-к-хвосту», из более коротких олигомеров, разделяющихся промежутками актима, свободного от тропомиозина. Такой стохастический механизм будет эффективно «застёгивать» тропомиозин и актин вместе и, следовательно, вести к полному декорированию актиновой нити.

В то время как связывание полимеризованных нитей тропомиозина на полностью декорированный F-актин будет строгим, позиция тропомиозина на актине на локальном уровне по-прежнему будет определяться слабыми электростатическими взаимодействиями и будет легко подвергаться колебаниям тропонином, миозином и другими белками при низкой затрате энергии. *Gestalt*-связывание системы тонких нитей хорошо подходит физиологическим требованиям, предъявляемым к ней. Без сомнения, *Gestalt*-связывание является общим признаком, определяющим и другие биомолекулярные взаимодействия» (рис.13а-е).

1.3.3 Модель стерического блокирования

Исследования по рентгеноструктурному анализу на интактных мышцах показали, что связывание ионов Ca^{2+} с тропонином индуцирует изменения в тропомиозине и актине в составе тонких нитей (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972; Parry, Squire, 1973). Эти исследования послужили основой для хорошо известной модели стерического блокирования в мышечной регуляции, изначально предложенной Хенсон и Лоуви (Hanson, Lowy, 1964). Данная модель предполагает, что нити тропомиозина, проходящие по тонким нитям, блокируют сайты связывания миозина на актине в покоящейся мышце и открывают их, когда мышца активируется, разрешая взаимодействие поперечного мостика с тонкой нитью, в результате которого происходит сокращение. Аналогичные модели, включающие данные по кристаллографии актима и тропомиозина, согласуются с этим мнением (Phillips et al., 1986; Al-Khayat et al., 1995; Poole et al., 1995). Однако в то время как анализ дифракционных картин может обеспечивать моделями структуры филамента, однозначная интерпретация не видится возможным, поскольку отсутствует информация по этапам мышечного сокращения. С другой стороны, трёхмерные изображения тонкой нити, полученные методом электронной микроскопии с использованием подходов спиральной реконструкции, разработанных Дэ-Росье и Клаггом (DeRossier, Klug, 1968), предлагают инструменты непосредственной проверки модели подвижности тропомиозина. Попытки на протяжении долгого времени выяснить функциональные свойства тропомиозина

таким подходом привели зачастую к довольно запутанной литературе. Тропомиозин был разрешён в ЭМ-реконструкциях декорированных с S1 нитях (Milligan et al., 1990), но не в недекорированных нитях в ингибированном (с низкой концентрацией Ca^{2+}) состоянии. Следовательно, гипотеза стерического блокирования не может быть напрямую проверена. Наблюдение тропомиозина в ингибированном состоянии было впервые достигнуто в реконструкциях нативных тонких нитей, выделенных из поперечнополосатых мышц мечехвостки *Limulus polyphemus*, где тропомиозин показал движение над актином в манере, соответствующей со стерической моделью (Lehman et al., 1994). Филаменты *Limulus* являются удобным объектом для изучения, поскольку они сохраняют полный комплект функциональных компонентов тропомиозина и тропонина, даже при низких концентрациях, необходимых для получения ЭМ изображений; анализ также опирался на новые, хорошо документированные программы для реконструкции спиралей (Owen et al., 1996), эталонные модели F-актина, способствующих интерпретации трёхмерных карт (Holmes et al., 1990, Milligan et al., 1990) и работе компьютера, способного быстро считать и усреднять карты плотностей. Более поздние исследования показали похожее Ca^{2+} -зависимое движение тропомиозина в составе тонких нитей, выделенных из скелетной и сердечной мышц позвоночных, а также в составе тонких нитей, собранных из отдельных компонентов позвоночных (т.е., F-актина, тропонина и тропомиозина) (Lehman et al., 1995, 2000). Возможность разрешить тропомиозин в типично разных позициях на актине во включённом (“ON”) и выключенном (“OFF”) состояниях непосредственно подтвердило гипотезу, что тропомиозин не двигается на тонких нитях в манере, совместимой со стерической моделью регуляции (Xu et al., 1999; Lehman et al., 1994, 1995; Vibert et al., 1997; Craig, Lehman, 2001; Pirani et al., 2005, 2006; Poole et al., 2006). Эти результаты повлияли на достоверность предложенной модели движения тропомиозина. В соответствии со стерической моделью, тропомиозин в расслабленном состоянии выявил способность закрывать сайты связывания миозина на актине, вовлечённого в сильное стереоспецифическое актомиозиновое взаимодействие (Lehman et al., 1994, Vibert et al., 1997). Интересно, что определённое количество заряженных аминокислотных остатков на периферии актина остаются открытыми, даже при низкой концентрации Ca^{2+} . Эти остатки могут быть вовлечены в слабые электростатические взаимодействия между головками миозина и актином, имеющие место до сильного связывания (Chalovich et al., 1981). Таким образом, тропомиозин при низких концентрациях Ca^{2+} , по-видимому, блокирует переход от исходного слабого к сильному взаимодействию поперечного мостика, тем самым ингибируя актомиозиновую АТФазу, работу поперечного мостика и генерацию силы.

ЭМ-реконструкции показали, что в отсутствии Ca^{2+} тропомиозин сдерживается в позиции на внешнем домене актина, который закрывает известный сайт связывания миозина, приводя к

расслабленному "блокированному" или В-состоянию (стадия 1). Полная активация при обращении стерического блокирования, как было показано, включает два дополнительных состояния тонкой нити, требующих последовательное движение тропомиозина дальше от блокирующей позиции. Связывание кальция с тропонином вызывает движение тропомиозина в направлении к "внутреннему домену" актлина, раскрывая большинство миозин-связывающих сайтов (отмечено как "Ca-индуцированное", "закрытое" или С-состояние; стадия 2). Однако, даже после этого изменения, тропомиозин по-прежнему закрывает существенную часть сайтов. Дальнейшее смещение тропомиозина, вызванное связыванием самих головок миозина, как показано, открывает весь миозин-связывающий сайт, полностью активируя филамент (названный как "миозин-индуцированное", "открытое" или М-состояние; стадия 3) (Vibert et al., 1997; Xu et al., 1999; Lehman et al., 1994, 1995, 2000; Craig, Lehman, 2001). Концепция, что связывание Ca^{2+} к тропонину является необходимым, но не существенным для запуска активации мышцы, поддерживается биохимическими данными по влиянию тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие и по гидролизу АТФ (Lehrer, Morris, 1982; McKillop, Geeves, 1993; Lehrer, Geeves, 1998).

Таким образом, в трёхстадийной версии стерической модели связывание Ca^{2+} индуцирует конформационное изменение нити, где тропомиозин снимает блокирующий эффект с актлина. Это обеспечивает связывание миозинового поперечного мостика, который в свою очередь приводит к дальнейшему движению тропомиозина, полностью выставляя сайт связывания миозина и ведя к кооперативному содействию собственного связывания во время активации мышцы; такой вывод также поддерживается моделированием данных по рентгеновской дифракции на интактных волокнах (Poole et al., 1995, 2006). Эти исследования также показывают, что эффект миозина на позицию тропомиозина распространяется на больше актиновых мономеров, предполагая, что молекула тропомиозина двигается кооперативным образом как относительно жёсткий кабель. Данные по кинетике актин-миозинового взаимодействия показывают, что три регуляторных состояния (стадии) находятся в равновесии один с другим, где каждая стадия может доминировать в зависимости от влияния тропонина и миозина (McKillop, Geeves, 1993; Lehrer, Geeves, 1998).

Для соответствия с 3-стадийной моделью регуляции тонкой нити тропомиозин в промежуточном Ca^{2+} -индуцированном "закрытом" С-состоянии должен стерическим образом ингибировать связывание поперечных мостиков миозина, хотя и в меньшей степени, чем в "блокированном" В-состоянии (в отсутствие Ca^{2+}). Следовательно, тропомиозин-тропониновый комплекс, который разрешает Ca^{2+} -индуцированному движению, но не миозин-индуцированному движению, должен ингибировать циклическую работу миозина.

Филаменты с делецией тропомиозина в позиции Asp234, который охватывает четыре вместо семи мономеров актина (актин-связывающие псевдоповторы 2, 3 и 4 отсутствуют), видимо, ведут себя как если они были стабилизированы в С-состоянии (Landis et al., 1997). ЭМ и 3D реконструкции показали, что мутация не влияет на Ca^{2+} -индуцированное движение тропомиозина, имеющим место в норме (Rosol et al., 2000). Был сделан вывод, что тропомиозин с делецией остатка Asp234 способен сдвигаться с позиции С-состояния к позиции полностью активированного М-состояния (Rosol et al., 2000). Такой вывод поддерживается тем, что в Ca^{2+} -индуцированном состоянии тонкая нить не полностью переключается в режим “ON” (включённый режим). Скорее всего, она переключается в “OFF”, будучи являясь относительно "закрытым" для связывания миозина. Аналогично, работы на молекулах тропомиозина дрожжей, ингибирующие актомиозиновую АТФазу, показали, что в одном случае тропомиозин сильно смещается к С-состоянию (Skoumpla et al., 2007), а в другом случае практически иммобилизуется в позиции С-состояния (Maytum et al., 2007). Обобщая результаты, следует отметить, что они обеспечивают сильной поддержкой для 3-стадийной модели регуляции актомиозинового взаимодействия, в которой активация, как считается, должна быть ступенчатым процессом, требующим Ca^{2+} - и миозин-индуцированные переходы с последующим снятием эффекта ингибирования.

1.3.4 Патологии, ассоциированные с мутациями в генах, кодирующих изоформы тропомиозина

Исследования последних двух десятилетий показали, что такие врождённые мышечные патологии (миопатии), как немалиновая миопатия (НМ), дистальный артрогрипоз (ДА), врождённая диспропорция типов волокон (ВДТВ) и кэп-миопатия (КМ) ассоциированы с мутациями в генах, кодирующих основные белки саркомера, в том числе тропомиозин. Указанные патологии скелетной и сердечной мышц известны уже на протяжении долгого времени, однако их молекулярная основа выявлена не так давно и исследуется по сей день. Развитие техники и новых подходов к изучению патологий мышц привело к накоплению определённого объёма информации, усложняющей классификацию этих расстройств. Итак, рассмотрим расстройства скелетных мышц на гистологическом и молекулярном уровнях.

1.3.4.1 Немалиновая миопатия

Немалиновая миопатия представляет собой форму врождённой миопатии, характеризующейся нитеобразными или стержнеобразными структурами, выявляемыми в мышечных волокнах при гистологическом анализе («нема» происходит от греческого слова

«нить»; рис. 14А-С). Впервые была описана как «стержнеобразная миопатия» (“rod myopathy”) австралийским патологом Дугласом Рейе в 1958 году (см. Schnell et al., 2000). Позже было предложено название «немалиновая миопатия» (Shy et al., 1963), которое устоялось и используется в настоящее время.

Клиническая картина НМ весьма изменчива – с дебютом заболевания в разном возрасте и с разной тяжестью. Мышечная слабость, как правило, наблюдается в проксимальных мышцах, с поражением мышц лица, языка (бульбарных мышц) и дыхательных мышц (Ilkovski et al., 2001). Попытки классифицировать немалиновые миопатии в клинические подтипы осложнены перекрыванием клинических особенностей и фенотипа заболевания (North et al., 1997; Wallgren-Pettersson et al., 1999; Ryan et al., 2001; Sanoudou, Beggs, 2001). Тем не менее, можно выделить две клинические формы заболевания – «типичную» и «тяжелую». Типичная НМ является наиболее общей формой, проявляющейся инфантильной гипотонией и мышечной слабостью. Это медленно прогрессирующая или непрогрессирующая форма болезни; большинство взрослых больных сохраняют способность передвигаться. Тяжелая форма болезни характеризуется отсутствием спонтанных движений или дыхания при рождении, артрогрипозом и смертью в первые шесть месяцев жизни. Реже может проявляться в более позднем возрасте. НМ у взрослых больных обычно не является семейной (Wallgren-Pettersson et al., 1999; Sanoudou, Beggs, 2001). При НМ мутации чаще всего обнаруживаются в гене, кодирующем гигантский белок саркомеров – небулин (Lehtokari et al., 2006).

Одной из первых идентифицированных мутаций в гене ТМ, ассоциированной с НМ, оказалась гомозиготная миссенс-мутация в гене *TPM3*. Описанная мутация приводила к аминокислотной замене вблизи N-конца в позиции Met9 α_{slow} -ТМ на остаток аргинина и влияла на связывание с актином (Laing et al., 1995). Исследования показали, что мутация Met9Arg в α -тропомиозине (в позиции a) медленных скелетных мышц человека ослабляет (в 30-100 раз) сродство ТМ к F-актину; регуляторная функция Ca^{2+} сохраняется, однако уменьшается актин-активируемая АТФазная активность S1 в присутствии ионов Ca^{2+} (Michele et al., 1999; Moraczewska et al., 2000). Было выдвинуто предположение, что данная мутация влияет на эффективность перехода ТМ в открытую позицию на тонких нитях, способствующую генерации силы, а также нарушает способность ТМ полимеризоваться на F-актине и связываться N-концом с тропомодулином – белком, кэпирующим актиновую нить (Moraczewska et al., 2000; Kostyukova, 2008). Нарушение взаимодействия с тропомодулином было подтверждено также другими методами (Ilkovski et al., 2008). Были отмечены и другие особенности при этой мутации, а именно гипертрофия быстрых мышечных волокон, в которых не наблюдалось наличие немалиновых телец, и атрофия медленных волокон, в которых немалиновые тельца обнаруживались.

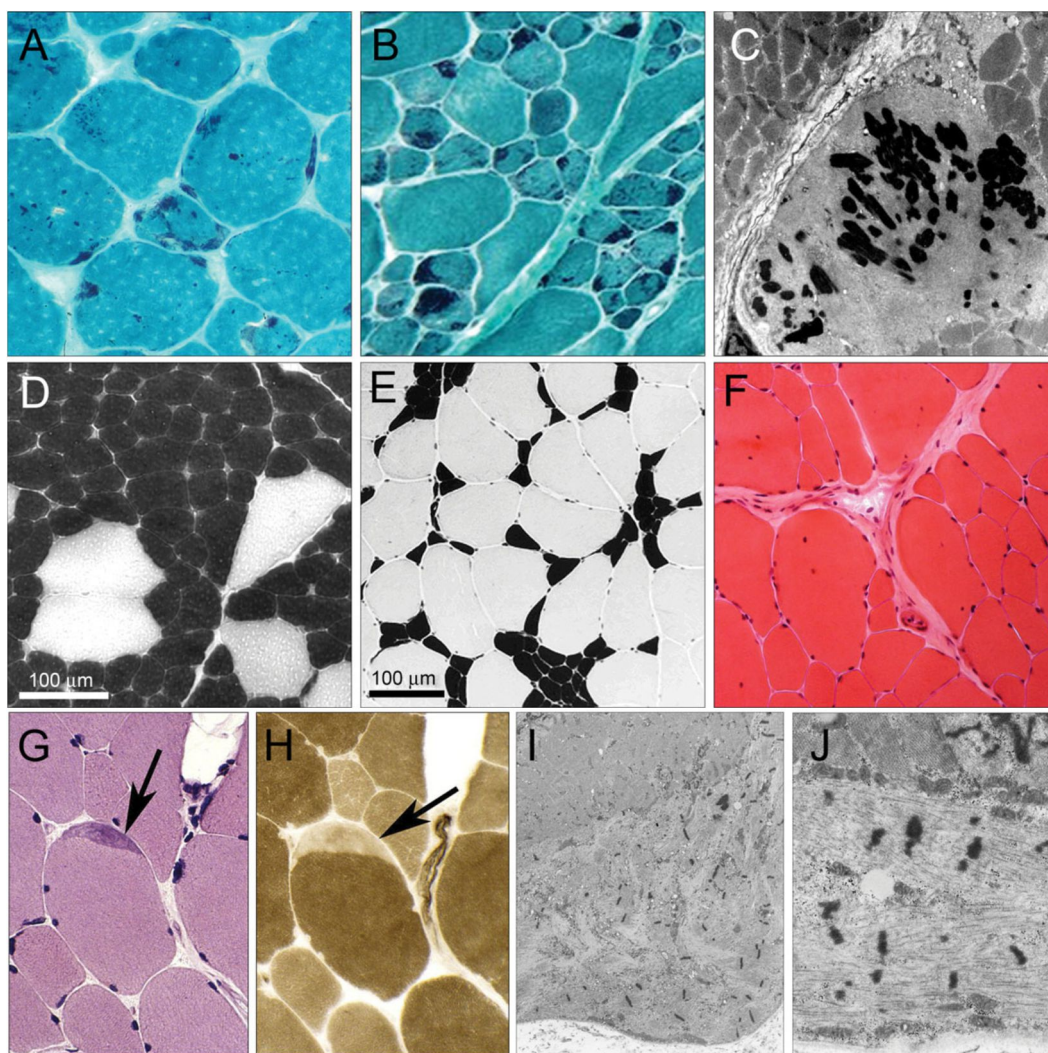


Рисунок 14. Гистологические характеристики немалиновой миопатии, кэп-миопатии и врождённой диспропорции типов волокон. (A-C) – немалиновая миопатия (замена Lys7del в β -ТМ); представлены хаотически расположенные включения (тельца). (D-F) ВДТВ, вызванная мутациями в гене *TPM3*. (G-J) Кэп-миопатия, вызванная мутацией Glu139del в β -ТМ; стрелочками показаны шапкообразные структуры (по Marttila et al., 2014).

Похожая клиническая картина наблюдалась у 57-летней пациентки с диагнозом НМ (Kipruth et al., 2010), у которой была идентифицирована новая миссенс-мутация в гене *TPM3*, приводящая к замене Ala156Thr в α_{slow} -ТМ. Недавно было проведено интересное исследование, в котором сравнили эффекты, вызываемые мутацией Met9Arg в ТМ, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (Gineste et al., 2014). Оказалось, что результаты исследования данной мутации *in vivo* и *in vitro* совсем противоположны: в экспериментах *in vitro* на скинированных мышечных волокнах наблюдалось более низкое значение от максимальной силы сокращения, тогда как в экспериментах *in vivo* волокна с мутацией Met9Arg в ТМ показали значение максимальной силы сокращения на 30% выше, чем в норме. Исследование влияния мутации Ala156Thr в ТМ на сродство к F-актину в присутствии и отсутствии тропонина и ионов Ca^{2+} , а также АТФазную активность актомиозина при различных концентрациях S1 показало, что

мутация снижает сродство ТМ к нитям актина (примерно в 2.0-2.3 раза) и вдвое снижает Ca^{2+} -активируемую АТФазную активность актомиозина (Robaszkiewicz et al., 2012). Как отмечают авторы, для них явился неожиданным тот факт, что мутация Ala156Thr, возникающая в позиции неконсенсусного остатка, влияет на связывание ТМ с актином так же, как и мутации в позициях консенсусных остатков аминокислот. Отметим, что Ala156 является одним из остатков, входящих в аланиновый кластер (вместе с остатками Ala152 и Ala159), который значительно уменьшает радиус суперспирали, приводя к образованию изгиба молекулы ТМ (Brown et al., 2005).

В недавней статье сообщается о двух новых мутациях, вызывающих НМ, Ala3Gly и Asp14Val в β -Тм скелетных мышц (Marttila et al., 2014). Мутация Ala3Gly была идентифицирована у 66-летнего пациента со слабостью проксимальных мышц, в случае мутации Asp14Val заболевание прогрессировало. Некоторые мутации в гене *TPM2*, вызывающие НМ, рассмотрим ниже, после описания кэп-миопатии и врожденной диспропорции типов волокон. Дело в том, что определённые мутации в гене *TPM2*, кодирующем β -Тм скелетных мышц, были идентифицированы у пациентов с перекрыванием НМ с кэп-миопатией, врожденной диспропорцией типов волокон, дистальным артрогрипозом и синдромом Эскобара. К тому же, мутации Gln147Pro и Glu117Lys в β -ТМ, выявленные у пациентов, по-видимому, приводят к развитию кэп-миопатии, а не к изначально диагностированной НМ.

К сожалению, эффективного подхода к лечению НМ не предложено, однако используются симптоматические подходы к «лечению» заболевания. Среди таких подходов можно выделить активную вентиляцию лёгких, назогастральное зондирование и использование ортезов (Wallgren-Pettersson et al., 2004). Интересный эффект был продемонстрирован при использовании L-тирозина в диете некоторых больных немалиновой миопатией (Ryan et al., 2008). Оказалось, что после применения L-тирозина улучшаются бульбарная функция и энергообеспечение мышц. У одного подростка, страдающего НМ, применение L-тирозина усиливало силу и выносливость при физических нагрузках. Механизм такого позитивного эффекта данной аминокислоты непонятен, поскольку у пациентов не было выявлено дефицита L-тирозина.

1.3.4.2 Кэп-миопатия

Кэп-миопатия – редкое врожденное заболевание, характеризующееся наличием шапкообразных структур (cap-structures) в составе волокон скелетных мышц. Гистопатологически шапкообразные структуры имеют периферическую локализацию с явными субсарколеммными включениями, которые имеют пурпурно-голубоватый или зелёный цвет при модификации трихромом Гомори и имеют эозинофильную реакцию на окрашивание

гематоксилином и эозином. Иммуногистохимический анализ выявил активность шапкообразных структур к α -актину, актину, тропонину T, саркомерному Tm и десмину. На ультраструктурном уровне эти структуры содержат дезорганизованные тонкие нити и материал Z-диска и, в основном, не содержат толстых нитей. Внутри шапкообразных структур изредка наблюдаются утолщённые Z-линии, проявляющиеся в виде стержнеобразных структур. При этом структура прилегающих саркомеров обычно нормальная. Частота встречаемости шапкообразных структур в мышечных волокнах колеблется от 4 до 100 процентов (Ohlsson et al., 2008, 2009; Clarke et al., 2009; Karasoy et al., 2009; De Paula et al., 2009; Hung et al., 2010) и зависит от возраста пациента и тяжести заболевания (Fidzianska, 2002; Cuisset et al., 2006; Lehtokari et al., 2007; De Paula et al., 2009; Hung et al., 2010).

Клинически симптомы кэп-миопатии проявляются в младенчестве или в детском возрасте: главным образом, слабостью проксимальных и аксиальных мышц, удлинённым миопатическим лицом, высоким арочным нёбом, деформациями скелета (сколиоз) и поражением респираторной функции. Поражение сердца не является общим признаком кэп-миопатии и был описан только у одного пациента со значительным ухудшением систолы (Clarke et al., 2009).

Генетические исследования выявили мутации в трёх генах, кодирующих саркомерные белки: *ACTA1*, кодирующий α -актин скелетных мышц (Hung et al., 2010), *TPM2*, кодирующий β -тропомиозин скелетных мышц (Lehtokari et al., 2007; Tajsharghi et al., 2007; Ohlsson et al., 2008; Clarke et al., 2009; Tasca et al., 2013) и *TPM3*, кодирующий α -тропомиозин медленных скелетных мышц (De Paula et al., 2009; Ohlsson et al., 2009; Waddell et al., 2010).

Примечательно, что мутации в гене *TPM2* при кэп-миопатии являются наиболее частыми, чем мутации в гене *TPM3*. Существует предположение, что кэп-миопатию можно рассматривать как подкатегорию немалиновой миопатии (Tajsharghi et al., 2007). Лехтокари с сотрудниками (Lehtokari et al., 2007) описали 33-летнего пациента с шапкообразными структурами в мышечных волокнах, однако биопсия, сделанная в 11 лет у того же пациента, не выявила наличие таких структур, а показала диспропорцию типов волокон. Анализ генома выявил мутацию со сдвигом рамки считывания кодона экзона 4 в *TPM2*, приводящую к удалению остатка глутамата в 139 позиции молекулы β -тропомиозина, что предполагает нарушение гептаповтора в суперспирали белка. В результате нарушается взаимодействие с актином. Исследование данной мутации методами Вестерн-блоттинга (Clarke et al., 2009) и круговым дихроизмом (Marttila et al., 2012) показало, что, действительно, нарушается взаимодействие с актином и что начиная с места делеции к С-концу, видимо, нарушается димерная структура мутантного белка с α -тропомиозином дикого типа (Marttila et al., 2012; рис.15C,D)⁸. Возможно, что именно по

⁸ В скелетной мышце тропомиозин представлен преимущественно $\alpha\beta$ -гетеродимерами (см. Perry, 2001)

последней причине наблюдалась высокая кальциевая чувствительность и, следовательно, усиление функции волокон (Marston et al., 2013).

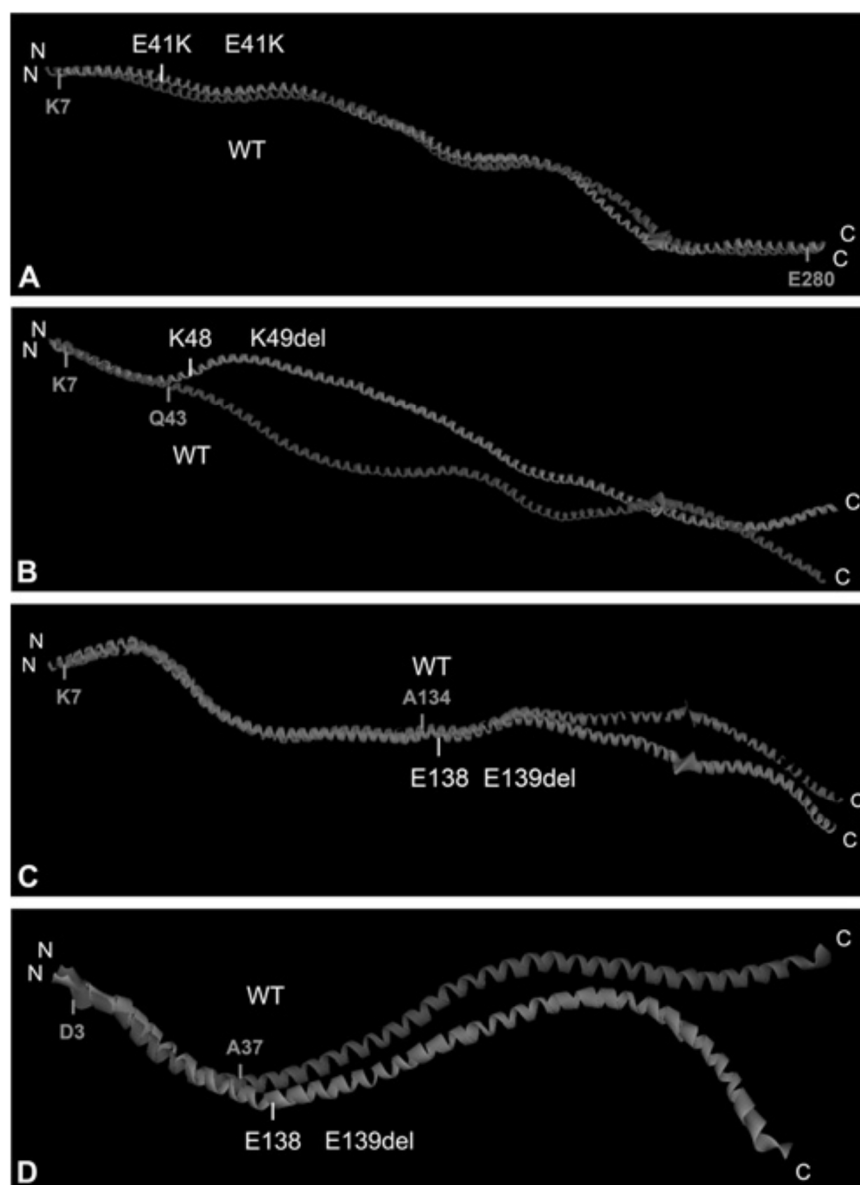


Рисунок 15. Структурные модели тропомиозинов с мутациями (а) Glu41Lys, (b) Lys49del и (c-d) Glu139del (по Marttila et al., 2012)

В литературе имеются сообщения и о других мутациях в генах, кодирующих ТМ медленных скелетных мышц, вызывающих КМ: Lys49del, Gly52dup⁹ и Asp202Lys в β -тропомиозине (Ohlsson et al., 2008; Tajsharghi et al., 2012; Abdul-Hussein et al., 2013) и Leu149Ile в α_{slow} -ТМ (Schreckenbach et al., 2014).

β -ТМ с мутацией Lys49del был конъюгирован с флуоресцентным агентом EGFP (enhanced green fluorescent protein) и трансфицирован в миобласты человека. В результате обнаружили колокализацию мутантного ТМ с цитоплазматическими и ядерными агрегатами с образованием

⁹ Dup. от слова дупликация. Вместо обозначения Gly52dup может встречаться Gly53ins (Abdul-Hussein et al., 2013)

утолщённых нитей и внутриядерных стержнеобразных структур, которые можно идентифицировать только при мечении фаллоидином (Abdul-Hussein et al., 2013). Марттила с сотрудниками (Marttila et al., 2012) считают, что данная делеция, как и Glu139del, приводит к ослаблению связи с α_{slow} -ТМ дикого типа, в результате чего цепи расходятся (рис.15С).

Наиболее заметной аномалией в миобластах человека при мутации Gly52dup в β -ТМ явилось формирование агрегатов эндогенного актина и ненормальное инкорпорирование в структуру филамента. Локализация мутантного ТМ значительно изменялась при дифференциации: трансфицированные клетки дифференцировались в мышечные трубки (миотубы) при развитии, приобретая продолговатую форму и множество ядер. Трансфицированные миотубы, в свою очередь, показали хорошую интеграцию мутантного Тм в структуру саркомера. Однако, мутантный ТМ, содержащий дубликацию остатка Gly52, при модификации с помощью EGFP, давал диффузную картину в цитоплазме на концах миотуб (Abdul-Hussein et al., 2013).

Трансфекция ТМ-EGFP с мутацией Asp202Lys, вызывающей кэп-миопатию (Ohlsson et al., 2008), в миобласты человека вызывала незначительное агрегирование белка в цитоплазме, а также вокруг ядер с образованием взвесей (Abdul-Hussein et al., 2013). Более строгий фенотип наблюдался после дифференциации миобластов: тонкие нити саркомеров были чрезвычайно утолщены в результате огромного накопления полимеризованного актина. Предполагают нарушение организации актиновых филаментов и их колокализацию с мутантным ТМ.

Мутация Leu149Ile в α_{slow} -ТМ была обнаружена у двух пациентов – матери и её сына, страдающих кэп-миопатией (Schreckenbach et al., 2014). Влияние этой мутации на связывание с актином и на актин-миозиновое взаимодействие, в целом, не изучено.

Недавно идентифицированы две новые мутации в гене *TPM3* (замены Glu151Ala и Arg245Ile), вызывающие кэп-миопатию (Marttila et al., 2014). У пациентов наблюдалась слабость мышц-сгибателей шеи, слабость проксимальных мышц, сохранялась способность садиться, но отсутствовала способность вставать.

1.3.4.3 Врождённая диспропорция типов волокон

Врождённая миопатия с диспропорцией типов волокон является генетически гетерогенным заболеванием, при котором при биопсии скелетных мышц обнаруживается относительная гипотрофия мышечных волокон типа 1 по сравнению с волокнами типа 2 (рис. 14, D-F). Эти признаки, однако, не являются специфичными и могут быть обнаружены при большинстве других миопатических и невропатических отклонениях. Кларк и Норт (Clarke, North, 2003) установили, что диагноз «врождённая диспропорция типов волокон», болезни как

таковой, является одним из исключений. Они также предположили, что неспецифические гистологические наблюдения должны называться «диспропорция размера волокон», тем самым оставляя термин ВДТВ для тех случаев, в которых нельзя обнаружить вторичных признаков.

Термин «врождённая диспропорция типов волокон» был впервые введён на основании обследований 12 случаев этого заболевания (Brooke, Engel, 1973). У всех пациентов наблюдалась гипотрофия мышечных волокон типа 1, которых было на 12% меньше, чем волокон типа 2А или 2В. Клиническая картина проявлялась в виде врождённой гипотонии, общей слабости и задержки развития. Другими особенностями были удлинённое узкое лицо, сколиоз, высокое арочное нёбо и множественные контрактуры суставов.

Уточнение определения «ВДТВ» было сделано во всеобъемлющем обзоре литературы и её анализе (Clarke, North, 2003). Из 218 сообщённых к тому моменту случаев диспропорции размеров волокон при мышечной биопсии, они классифицировали 67 случаев в качестве ВДТВ, вводя следующие критерии: (1) клинически выраженную мышечную слабость и/или гипотонию, и (2) средний диаметр волокон типа 1, по крайней мере, на 12% меньше, чем средний диаметр волокон типа 2. К критериям исключения относились недостатки в клинической информации. В большинстве случаев была выявлена слабость конечностей (наиболее выраженная в пояснично-конечностных и проксимальных группах мышц), хотя у многих детей наблюдалась общая мышечная слабость. Другими признаками были слабость лицевых мышц (у 42% пациентов), офтальмоплегия (19%) и поражение респираторной функции (18%). Рефлексы обычно ослабевали или вовсе отсутствовали. Многие пациенты имели контрактуры либо при рождении, либо при позднем развитии. Контрактуры проявлялись в голеностопных суставах (10 случаев), в пальцах (4 случая), в бёдрах (3 случая), в локтях (3 случая) и в коленях (2 случая). У 15 пациентов был развит сколиоз. Только у двух пациентов наблюдалось поражение сердца: дилатационная кардиомиопатия и фибрилляция предсердий, соответственно (Banwell et al., 1999). Два пациента имели интеллектуальную недоразвитость и трое мужчин имели крипторхизм. Пятьдесят пациентов имели диаметры волокон типа 1 на 25% меньше, чем волокон типа 2; у этих пациентов проявлялся более сложный клинический фенотип.

В отличие от КМ, при ВДТВ наиболее частыми оказались мутации в гене TPM3, кодирующем α -Тм медленных скелетных мышц. Идентифицированы следующие мутации: Ala4Val, Arg91Pro, Leu100Met, Arg133Pro, Leu148Pro, Arg168Gly, Arg168Cys, Lys169Glu, Glu174Ala, Glu241Lys, Arg245Gly, X286Ser (Clarke et al., 2008; Lawlor et al., 2010; Munot et al., 2010; Ottenheijm et al., 2011; Robaszkiewicz et al., 2012; Marttila et al., 2014). В гене TPM2, кодирующем β -Тм, идентифицирована единственная мутация, связанная с ВДТВ, - Ser61Pro (Clarke et al., 2012). Некоторые исследователи считают, что именно мутации в TPM2 являются "хорошими кандидатами", вызывающими типичную ВДТВ (Clarke et al., 2012), поскольку среди

пациентов с диагнозом КМ в качестве вторичного признака отмечается диспропорция волокон (Clarke et al., 2009).

У пациента с заменой Ala4Val наблюдалась легкая форма ВДТВ: поражена сосательная функция, отмечалась гипотония при рождении. Лёгкая форма патологии наблюдалась также при мутации Arg168His. В последнем случае клиническая картина была схожа с клинической картиной, вызванной мутацией Ala4Val. Отметим, что мутация Arg168His была идентифицирована также у 58-летнего пациента с легкой формой НМ (Clarke et al., 2008; Lawlor et al., 2010).

Замены Leu100Met, Arg168Gly, Lys169Gly и Arg245Gly приводили к нормальному ингибированию актомиозиновой АТФазы, тогда как эта функция была существенно нарушена у ТМ с мутацией Arg168Cys. Кроме того, если при заменах Leu100Met и Arg245Gly наблюдалась пониженная активация АТФазы актомиозина по сравнению с ТМ дикого типа, то у ТМ с заменами Arg168 и Lys169 активация отсутствовала. Снижение сродства к F-актину, хотя и выраженное в разной степени, наблюдалось при всех этих заменах, за исключением Leu100Met.

1.3.4.4 Дистальный артрогрипоз

Дистальные артрогрипозы представляют собой группу расстройств, при которых, главным образом, поражаются дистальные конечности. Эти миопатии характеризуются врождёнными контрактурами двух или более частей тела, не сопровождаемыми первичными неврологическими или мышечными заболеваниями. Типичным дистальным артрогрипозом является артрогрипоз типа 1 (ДА1), который характеризуется преимущественно камптодактилией или косолапостью. Гипоплазия и/или отсутствие некоторых межфаланговых складок является общим признаком данной патологии. Плечи и бёдра поражаются реже. Картина поражения суставов изменчива: с эквиноварусной деформацией от умеренного до тяжёлого поражения, поражение рук от изолированной гипоплазии дистальной межфаланговой складки пятого пальца до сильно сжатых кулаков и локтевого отклонения запястья.

Первой обнаруженной мутацией в β -Тм (ген *TPM2*), вызывающей дистальный артрогрипоз (ДА1), оказалась замена остатка Arg91 на глицин, обнаруженная в составе быстрых скелетных мышц генетическим анализом 14 пробандов (Sung et al., 2003). АТФазная активность актомиозина в присутствии мутантного ТМ (мутация Arg91Gly) при всех исследованных концентрациях кальция была выше по сравнению с активностью, измеренной в присутствии ТМ дикого типа (Robinson et al., 2007). Методом тепловой денатурации установлено, что мутация Arg91Gly дестабилизирует молекулу ТМ: при этом дестабилизирующее действие мутации не

является локальным, а, как предполагают, распространяется по всей длине молекулы β -ТМ (Невзоров и др., 2008).

Замена Arg133Trp¹⁰ связана с мышечной слабостью без прогрессирующей потери мышечной массы или гистопатологических признаков атрофии мышечных волокон, вместе с ДА типа 2В: с поражением, в основном, дистальных конечностей, сжатыми кулаками с рождения, перекрыванием пальцев, камптодактилией, локтевым отклонением и позиционной деформацией стопы (Ochala et al., 2007; Tajsharghi et al., 2007). Результаты исследований этой мутации не выявили изменений в Ca^{2+} -чувствительности волокон, но показали существенное влияние мутации на генерацию силы и, следовательно, кинетику взаимодействия миозина с актином (Ochala et al., 2007). Методом рентгеноструктурного анализа показано, что во время активации волокна β -тропомиозин с мутацией Arg133Trp ингибирует и Ca^{2+} -индуцированное, и миозин-индуцированное движение ТМ на тонкой нити, предотвращая конформационные изменения в актине и уменьшая количество поперечных мостиков и генерацию силы (Ochala et al., 2010). Авторы заключают, что те меры, которые в первую очередь восстановили бы движение ТМ, могут стать потенциальной терапевтической стратегией в будущем. Таких мер, к сожалению, пока не предложено. Хотя, необходимо отметить, что при некоторых мутациях, при которых наблюдалась пониженная Ca^{2+} -чувствительность, было предложено применение кальциевых сенситизаторов, специфически повышающих Ca^{2+} -чувствительность тропонина (например Ca^{2+} -сенситизатор EMD57033, использованный при мутации Glu41Lys в β -ТМ, вызывающей НМ и КМ) (Ochala et al., 2008). Отметим, что мутация Arg133Trp также была идентифицирована в β -ТМ скелетных мышц пациента с диагнозом ВДТВ (Marttila et al., 2014).

1.3.4.5 Мутации в тропомиозине, вызывающие разные патологии и их перекрывании

Рассмотрим некоторые, известные нам, мутации, которые вызывают в одном случае одну патологию, в другом случае – совсем иную, а также мутации, идентифицированные при перекрывании заболеваний, и мутации, для которых диагнозы вызванных ими заболеваний сомнительны.

Мутации с заменами Glu117Lys и Gln147Pro в β -ТМ скелетных мышц впервые были идентифицированы у пациентов с диагнозом "немалиновая миопатия" (Donner et al., 2002). В недавнем кратком сообщении (Brandis et al, 2008) этот диагноз ставится под сомнение. К такому выводу Брэндис с сотрудниками пришли из-за отсутствия в электронно-микроскопических изображениях явных немалиновых телец и/или шапкообразных структур; наоборот, наблюдается

¹⁰ Отметим, что мутация Arg133Trp также была идентифицирована в β -тропомиозине скелетных мышц пациента с диагнозом ВДТВ (Marttila et al., 2014).

преобладание волокон первого типа, что, по мнению авторов сообщения, больше похоже на диспропорцию типов волокон (ВДТВ). Исследование мутации Glu117Lys методом поляризационной флуориметрии показало, что мутантный ТМ ингибирует вращение субдомена 1 актина и наклон SH1 спирали головки миозина по сравнению с ТМ дикого типа (Karpicheva et al., 2014).

Позже была идентифицирована ещё одна мутация в гене *TPM2* – Glu41Lys (Tajsharghi et al., 2007), связанная с НМ. Эта мутация у матери вызывала образование немалиновых телец, однако у дочери выявлялись шапкообразные структуры (Lehtokari et al., 2007; Tajsharghi et al., 2007; Marttila et al., 2014). Кларк с сотрудниками (Clarke et al., 2012) описали 20-месячного мальчика из кавказской семьи, в которой ранее не были выявлены случаи мышечной слабости. У мальчика наблюдалось преобладание волокон 1-ого типа и гипертрофия волокон 2-ого типа. По первичным признакам, заболевание напоминает ВДТВ, однако при исследовании волокон под электронным микроскопом, выявились шапкообразные структуры, в результате усложнилась постановка диагноза. У мальчика была идентифицирована мутация Ala155Val в β -ТМ скелетных мышц.

Мутация Lys7del в β -ТМ была идентифицирована у пациентов с лёгкой формой НМ, болезнью центрального стержня и ДА типа 7А (Davidson et al., 2013; Mokbel et al., 2013). У мутантного ТМ была нарушена способность образовывать контакты с соседними молекулами ТМ. Кроме того, ТМ плохо встраивался в миобласты и обладал низким сродством к актину (Mokbel et al., 2013). β -ТМ с мутацией Glu181Lys, идентифицированный у больного НМ с артрогрипозами, усиливал активацию тонкой нити, связывание миозина и генерацию силы (Jarraya et al., 2012; Ochala et al., 2012). Мутация Gln210Stop в β -ТМ была идентифицирована у пациента с перекрыванием НМ с синдромом Эскобара (Monnier et al., 2009). Предполагают, что эта гомозиготная мутация может являться единственным случаем, когда происходит инактивация гена *TPM2*, и скелетные мышцы представлены только α_{slow} -ТМ.

Позиции замен в α_{slow} -ТМ и β -ТМ, вызванные мутациями в генах *TPM3* и *TPM2*, соответственно, схематически представлены на рис. 16.

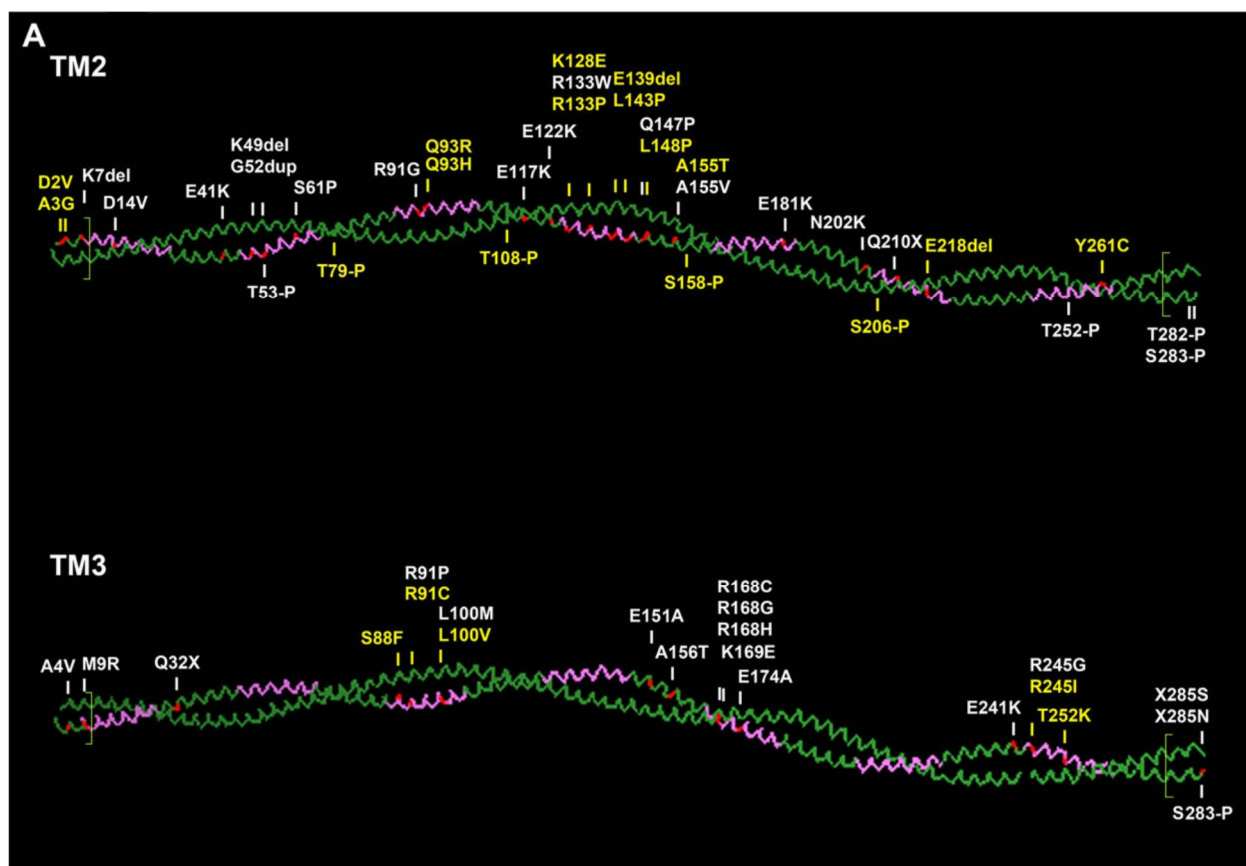


Рисунок 16. Схематическое изображение позиций мутаций в α_{slow} - (*TPM3*) и β - (*TPM2*) тропомиозинах (из Marttila et al., 2014).

Попытки обнаружить специфическую зависимость картины заболеваний, проявляющихся в виде утере функциональной активности (loss-of-function) или усилению функциональной активности (gain-of-function) на молекулярном уровне, от позиции мутации или типа аминокислотной замены увенчались успехом только для ограниченного набора мутаций в тропомиозине (Memo, Marston, 2013). Показано, что все известные мутации, приводящие к делеции в тропомиозине, выявляются высокую кальциевую чувствительность сокращения *in vitro* (Donkervoort et al., 2015). Мало данных относительно влияния мутаций на характерное изменение положения тропомиозина на актине в АТФазном цикле. Выяснение механизмов нарушения позиционирования мутантного ТМ на актине, по нашему мнению, послужит хорошей основой для разработки новых подходов к диагностике и лечению широкого спектра мышечных патологий, вызываемых мутациями в генах тропомиозина.

1.4 Заключение по обзору литературы и постановка задач исследования

Мышечное сокращение исследуется уже более полувека и основные принципы работы сократительного аппарата выяснены. Известны белки, играющие ключевую роль в регуляции актин-миозинового взаимодействия: одним из них является тропомиозин. Интерес к тропомиозину возрос, когда многочисленные исследования показали, насколько разнородна эта молекула и изначальная модель "стерического блокирования", приписывающая тропомиозину исключительно роль молекулярной "затычки", стала подвергаться сомнениям.

Генетические исследования пациентов с разными формами врождённых миопатий показали, что в развитии заболеваний могут быть вовлечены точечные мутации в генах, кодирующих белки сократительного аппарата. При таких тяжелых врождённых заболеваниях скелетных мышц, как немалиновая миопатия, кэп-миопатия, врожденная диспропорция типов волокон и дистальный атрогипоз, были идентифицированы множество мутаций в генах, кодирующих α - и β -изоформы тропомиозина скелетных мышц. Исследование влияния мутаций на актин-миозиновое взаимодействие позволит понять не только механизм нарушения тропомиозиновой регуляции при той или иной патологии, но обеспечит информацией о том, как отдельные аминокислотные остатки влияют на структуру и функцию белка в норме.

В связи с этим в настоящей работе были исследованы четыре точечные замены в α - и β -ТМ с целью выявить их влияние на подвижность актина, миозина и на изменение позиции мутантных форм тропомиозина на различных моделируемых этапах цикла гидролиза АТФ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение глицеринизированных мышечных волокон

Глицеринизированные мышечные волокна получали из поясничной мышцы кролика (*Musculus psoas*) согласно ранее описанной процедуре (Szent-Gyorgyi, 1949). Пучок мышечных волокон диаметром ~2 мм закрепляли на лигатурах-распалках и помещали на сутки в охлажденный глицериновый раствор с содержанием ~50% глицерина, 0.1 М КСl, 1 мМ MgCl₂, 67 мМ фосфатного буфера (рН 7.0). Через сутки пучки мышечных волокон переносили в новую порцию глицеринового раствора на 24 часа. В новой порции этого раствора материал хранился при -20°C в течение 3-4 месяцев. За два часа до эксперимента из пучков с помощью микропинцетов под световым микроскопом выделяли одиночные мышечные волокна. Полученные волокна промывали от глицеринового раствора в течение 3-4 минут в отмывающем 67 мМ растворе К-На фосфатного буфера со следующим содержанием: 41 мМ NaH₂PO₄*12H₂O, 27 мМ KH₂PO₄, 100 мМ MgCl₂*6H₂O.

2.2 Приготовление «теневого» мышечных волокон

Мышечные волокна, из которых избирательно удаляют регуляторные белки (тропомиозин и тропонин) и миозин, называются «теновыми» волокнами. «Теновые» волокна (*англ.* ghost fibers) получали путем помещения очищенных от глицерина мышечных волокон (см. выше) в экстрагирующий раствор, содержащий 0.8 М КСl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ АТФ, 67 мМ фосфатный буфер (рН 7.0). Выделенные из пучка одиночные мышечные волокна перемещали на дно чашек Петри, заполненных экстрагирующим раствором, размещали на магнитную мешалку и инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре. После процесса инкубации «теновые» волокна перемещали из раствора на предметные стекла и прикрепляли их к стеклам с помощью клея на концах волокна. «Теновые» волокна, полученные таким образом, при электрофоретическом анализе показывают 80% содержание актина (Borovikov, Gusev, 1983, настоящая работа рис. 2.2). После перемещения на предметные стекла, волокна тщательно отмывали раствором, содержащим 10 мМ КСl, 3 мМ MgCl₂, 6.7 мМ фосфатный буфер, рН 7.0.

2.3 Получение и модификация актина

Ацетоновый порошок с актином получали из скелетных мышц спины и ног кролика посредством метода, описанного ранее (Straub, 1942). При этом ацетоновый порошок из мышц

получали при 0°C в течение 30 мин с 200 мл буфером-А (2 мМ Трис-НСl, 0.2 мМ АТФ, 0.5 мМ β-меркаптоэтанол, 0.2 мМ СаСl₂; конечный рН 8.0 при 25°C) и фильтровали через воронку из грубо-спеченного стекла (Spudich, Watt, 1971). Остаток промывали в 100 мл буфера-А и фильтровали, а супернатант очищали центрифугированием при 10,000 x g в течение 1 часа (неочищенный экстракт: около 400 мг от белка). Потом добавляли КСl (до 50 мМ) и МgСl₂ (до 2 мМ) и запускали полимеризацию актина на 2 часа. Далее доводили концентрацию КСl до 0.6 М: полученный раствор осторожно перемешивали в течение 1.5 часа, а затем центрифугировали 3 часа при 80.000 x g. Осадок тщательно ресуспендировали в 30 мл буфера-А каждые 24 часа. G-актин очищали из полученного порошка скелетных мышц кролика, в G-буфере, содержащем 0.2 мМ АТФ, 0.2 мМ СаСl₂, 0.1 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 0.1 мМ NaN₃ и 2 мМ трис-НСl, рН 7.6. Вся процедура получения ацетонового порошка занимает 7 дней.

Модификацию G- и F-актина производили флуоресцентными зондами 1,5-IAEDANS и ФИТЦ-фаллоидин, соответственно. Модификацию 1,5-IAEDANS производили по остатку цистеина 374 субдомена-1 актина по методу, описанному ранее (Tawada et al., 1978). Полученный G-актин-AEDANS инкорпорировали в «теневые» волокна путем инкубации волокна в растворе (40-50 мкл), содержащем 2-4 мг/мл актина, в течение 3 часов (Tawada et al., 1978; Borovikov et al., 2000). После инкубации запускали полимеризацию G-актина в «теновом» волокне, добавляя полимеризующий раствор, содержащий 100 мМ КСl, 1 мМ МgСl₂ и 20 мМ трис-НСl, рН 7.5 (Боровиков и др., 1988). Показано, что нативный G-актин и G-актин, модифицированный 1,5-IAEDANS, практически одинаково полимеризуются в теновом мышечном волокне с образованием новых нитей F-актина, либо связыванием с уже существующими нитями с удлинением нитей (Dobrowolski et al., 1988; Хорошев, Боровиков, 1991). Для модификации F-актина использовали специфический для таких целей зонд ФИТЦ-фаллоидин, добавленный в количестве 40-50 мкл на теневые мышечные волокна, который связывается в канавке актиновой нити с тремя мономерами актина (Oda et al., 2005). Волокна инкубировали в течение 3-4 часов; несвязавшийся зонд удаляли тщательной промывкой волокна отмывающим раствором, описанным в разделе 2.2. Хотя известно, что фаллоидин стабилизирует нити актина (Isambert et al., 1995), оценка влияния этого зонда на АТФазную активность актомиозина не выявила достоверных различий от контрольных экспериментов (Borovikov et al., 2004; Rysev et al., 2014). Существуют и другие данные относительно влияния фаллоидина на функциональное состояние актомиозина. Так, Данкер с сотрудниками (Dancker et al., 1975) не обнаружили достоверного эффекта этого гептапептида на АТФазную активность изолированного актомиозина, тогда как эксперименты на миофибриллах (Bukatina, Fuchs, 1994) показали, что фаллоидин увеличивает АТФазную активность актомиозина Са²⁺-зависимым образом.

2.4 Выделение миозина из скелетных мышц кролика

Скелетно-мышечный миозин выделяли по методу, предложенному Ивановым и Юрьевым в 1961 году (Иванов, Юрьев, 1961). Мышцы задних конечностей свежезабитого кролика очищали от соединительной и жировой ткани. Этот процесс осуществляли на льду во избежание порчи мышц эндогенными протеазами. Затем пропускали мышцы через предварительно охлажденную мясорубку. Полученный фарш (~100 г) заливали 300 мл раствором Вебера, содержащего 0.6 мМ KCl, 0.01 М Na₂CO₃, 0.04 М NaHCO₃. Этот материал тщательно перемешивали на холоде в течение 7-10 мин с дальнейшим центрифугированием при 3000 об/ мин в течение 15-20 мин. К образовавшемуся осадку добавляли 10-кратный объем воды и 0.5% уксусной кислотой доводили pH раствора до значения 6.8. После данной процедуры белок в течение 2-3 часов выпадал в осадок. Этот осадок центрифугировали и промывали один раз холодной водой. К супернатанту постепенно добавляли 0.02 М K₂CO₃ и 0.01% раствор фенолфталеина с тщательным перемешиванием до получения розового окрашивания (pH 8,3). Затем доводили концентрацию KCl до 0.5 мМ. Полученный раствор заново разводили 10-кратным добавлением воды при комнатной температуре, предварительно подщелоченной K₂CO₃ до слабо-розового окрашивания по фенолфталеину. В образовавшихся условиях миозин остается в растворе, а актомиозиновый комплекс выпадает в виде рыхлого осадка. Супернатант (слегка розоватый) охлаждали при 4°C и добавляли к нему равный объем холодной воды с добавлением 0.5% CH₃COOH до получения pH 7.0. При сильном перемешивании данного раствора происходило выпадение осадка миозина, который при хранении в течение 10-12 ч оседал с образованием студенистого слоя. Надосадочную жидкость отделяли от миозинового слоя декантацией и центрифугированием. Далее миозин растворяли добавлением KCl до конечной концентрации 0,6 М с тем расчетом, чтобы объем раствора увеличился вдвое по сравнению с количеством миозинового осадка. Нерастворившуюся взвесь частиц отделяли фильтрованием через бумажный фильтр, смоченный 0.6 М KCl. Миозин хранили в растворе со следующим содержанием: 50% глицерина, 0.5 М KCl, 0.005 М ДТТ, 0.001 М NaN₃ при температуре -20°C.

2.5 Получение и модификация субфрагмента 1 миозина

Субфрагмент-1 получали α-химотриптическим перевариванием миозина (Okamoto, Sekine, 1985) при температуре 25°C в течение 20 мин в буфере, содержащем 0.01 М трис-HCl (pH 6.8), 0.12 М NaCl, 2 мМ ЭДТА и 1 мМ NaN₃. При этом, весовое соотношение миозин/химотрипсин было равно 1:300. Процесс протеолиза останавливали добавлением ФМСФ до

конечной концентрации 0.001 М. Затем суспензию незамедлительно перемещали на ледяную баню.

S1 миозина выделяли из ацетонового порошка мышц добавлением насыщенного раствора сульфата аммония до 75%-ого насыщения. Далее, субфрагмент-1 осаждали центрифугированием при 15000 об/мин в течение 5-10 мин. Осадок ставили на диализ в буфере, содержащем 0.02 М трис-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM NaN₃. Полученный S1 миозина хранили при 4°C в термосе и использовали в течение двух недель. Такой субфрагмент-1, как показывает ПААГ-электрофорез, не содержит регуляторных легких цепей и содержит щелочные легкие цепи.

Модификацию цистеина 707 субфрагмента-1 миозина проводили флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS, как было описано ранее (Borejdo, Putnam, 1977). Для этого в буфере, содержащем 60 mM KCl, 0.1 ДТТ и 30 mM трис-HCl (pH 7.5), субфрагмент-1 смешивали с зондом в молярном отношении 1:1 в течение 18 ч при 4°C. Реакцию останавливали избытком ДТТ. Несвязавшийся зонд удаляли с помощью диализа против раствора, содержащего 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ДТТ, 10 mM трис-HCl буфер, pH 6.8. Через каждые 3 часа дважды обновляли процедуру диализа – при соотношении объема белка к буферу 1:500, с дальнейшим 12 часовым диализом, при соотношении объема белка к диализному раствору 1:1000. Степень модификации S1 оценивали коэффициентом поглощения, равным 6100 M⁻¹·см⁻¹ при длине волны 336 нм (Hudson, Weber, 1973).

Эксперименты по влиянию связанного с остатком 707 зонда на функциональное состояние S1 миозина показали, что модифицированный зондом субфрагмент-1 сохраняет чувствительность к связыванию нуклеотида, способность менять свою конформацию и способность к «рабочему ходу» (англ. *powerstroke* – см. раздел 1.2) миозиновой головки (Nihei et al., 1974; Borejdo et al., 1979; Ajtai et al., 1994; Bobkov et al., 1997). Недавно Ониши и Нитанаи (Onishi, Nitanaï, 2008) показали, что связывание зонда 1,5-IAEDANS с цистеином 707 SH1 спирали S1 миозина может существенно влиять на конформационное состояние конвертерного домена миозиновой головки, тем самым влиять на АТФазную активность актомиозина. Чтобы проверить эффект 1,5-IAEDANS на активность субфрагмента-1, нашей лабораторией были проведены эксперименты по соосаждению S1-AEDANS с актином из теневых мышечных волокон в отсутствие нуклеотидов или в присутствии 3 mM MgADP, 15 mM MgAMP-PNP и 5 mM MgATP. Эти эксперименты не выявили существенного влияния зонда на связывание S1 с актином (Borovikov et al., 2015).

2.6 Получение и модификация рекомбинантных α - и β -тропомиозина

Рекомбинантные α -тропомиозины (продукты гена *TPM1*) и β -тропомиозины (продукты гена *TPM2*) были получены и любезно предоставлены заведующей кафедрой биохимии и клеточной биологии университета им. Казимира Великого в г. Быдгощ, доктором И. Морачевской (α -тропомиозины с мутациями Glu240Lys и Arg244Gly) и профессором кафедры медицины Оксфордского университета Ч. Рэдвудом; методики экспрессии тропомиозинов можно посмотреть в указанных работах (Robinson et al., 2007; Robaszkiewicz et al., 2012).

Модификацию α -тропомиозина по остатку цистеина 190 и β -тропомиозина по остаткам цистеина 36 и 190 производили по ранее описанным методикам (Lamkin et al., 1983; Borovikov et al., 1993). Модификацию производили 5-йодоацетоамидо-флуоресцеином (5-IAF). Перед началом собственно процесса модификации флуоресцентным красителем производили восстановление сульфгидрильных групп (SH-групп) тропомиозинов в присутствии 10 мМ ДТТ в течение 2 часов при температуре 37⁰С. Тропомиозины от ДТТ отмывали диализом, затем перемещали в раствор, содержащий 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0.1 мМ NaN₃, 20 мМ Трис-HCl (pH = 8.0) и 20-кратный избыток красителя. Окрашивание запускали на 24 часа при температуре 37⁰С и останавливали избытком ДТТ. ДТТ и несвязавшийся краситель удаляли диализом против буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 0.1 мМ NaN₃, 2 мМ HEPES (pH = 7.5). Соотношение зонд/белок вычисляли спектрофотометрически с использованием коэффициентов поглощения тропомиозина при 227 нм (см. раздел 2.7) и зонда при 337 нм ($E_{337}=6100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Соотношение белка к красителю составляло 1:(0.8-1.2). Специфичность окрашивания тропомиозинов оценивали электрофоретически с последующей визуализацией полученных гелей.

2.7 Определение концентраций исследуемых белков

Концентрации исследуемых белков (актина, субфрагмента-1 миозина, тропомиозина) определяли спектрофотометром “СФ-46”. Для определения концентрации актина и S1 миозина использовались коэффициенты поглощения при длине волны 280 нм ($E_{280}(\text{актин})=110 \text{ (мг/мл)}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $E_{280}(\text{S1})=75 \text{ (мг/мл)}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и молекулярные массы 42000 Да и 110000 Да, соответственно. Для определения концентрации рекомбинантных тропомиозинов использовались коэффициент поглощения при длине волны 277 нм ($E_{277}(\text{ТМ})=0.24 \text{ (мг/мл)}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и молекулярную массу 66000 Да.

2.8 ДСН-ПААГ-электрофорез

Белковый состав мышечных волокон, молярные соотношения белков к актину, а также степень очистки и специфичность окрашивания белков флуоресцентными красителями оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970).

Электрофорез проводили в вертикальном блоке ПААГ с размерами 100мм x 83мм x 0.5мм. В основном использовали 4% концентрирующий гель и 10% разделяющий гель. Электродный буфер имел одинаковый состав по обеим сторонам пластин: 0.2 М трис-глициновый буфер (рН 8.3), 0.1% ДСН. Для проведения электрофореза использовали 10-15 волокон и 2-5 мкг отдельных белков. В течение пропускания образцов через концентрирующий гель силу тока устанавливали 4 мА, а при прохождении образцов в разделяющий – увеличивали силу тока до 18 мА. После проведения электрофореза, гели визуализировали в ультрафиолетовом свете. Далее гели окрашивали в растворе, содержащем 10% CH_3COOH , 25% изопропанол ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$) и 0.05% Кумасси R-250, в течение 20 минут при тщательном перемешивании раствора. Избыток красителя отмывали 10% уксусной кислотой.

2.9. Метод поляризационной флуориметрии

Метод поляризационной флуориметрии используется при изучении структурных состояний отдельных белков, модифицированных флуоресцентными красителями, в мышечных моделях.

С помощью этого метода оценивали изменения в ориентации и подвижности субфрагмента-1 миозина, тропомиозина и актина. О происходящих структурных изменениях судили по изменениям параметров поляризованной флуоресценции соответствующего зонда. Измерения проводили на ранее описанном поляризационном фотометре МИ-47 (Иоффе и др., 1974). Считается, что изменения в параметрах флуоресценции свидетельствует о конформационных изменениях белков, связывающих зонд (Yanagida, Oosawa, 1978; Wilson, Mendelson, 1983; Kakol et al., 1987; Andreev et al., 1995; Irving, 1996).

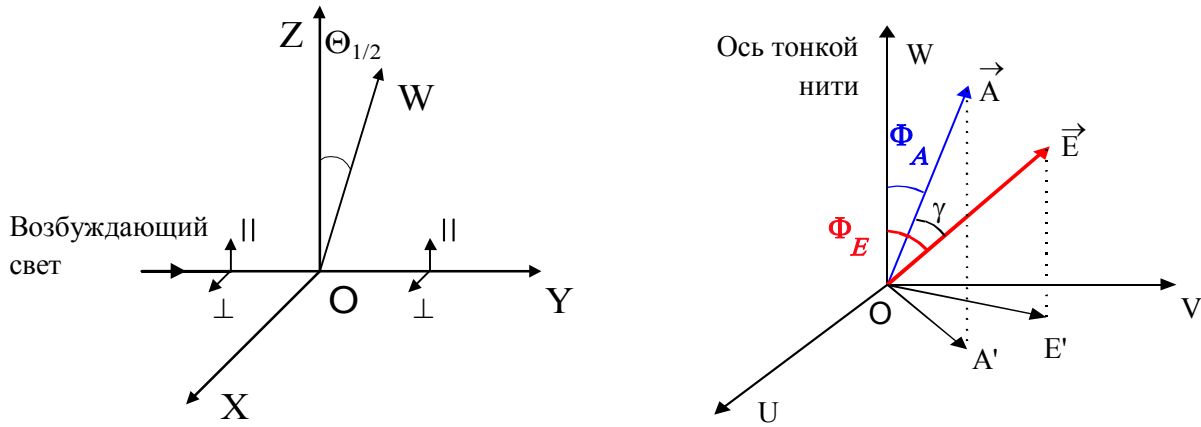


Рисунок 17. Графики, объясняющие схему вычислений отдельных параметров поляризованной флуоресценции (Yanagida, Oosawa, 1978). W – ось тонкой нити, которая при отклонении образует угол $\Theta_{1/2}$. Диполи поглощения и излучения A и E , соответственно, образуют с осью тонкой нити W углы Φ_A и Φ_E . Символы \perp и \parallel показывают перпендикулярное и параллельное составляющие поляризованного возбуждающего света.

Анализ экспериментальных данных проводили с помощью модельзависимого (Каулин, 1968; Розанов и др., 1971; Tregear, Mendelson, 1975; Yanagida, Oosawa, 1978; Wilson, Mendelson, 1983; Morales, 1984; Kakol et al., 1987; Andreev et al., 1995; Irving, 1996). В этой модели допускается, что в мышечном волокне имеются две популяции флуорофоров: популяция, имеющая упорядоченную ориентацию с осцилляторами поглощения и излучения со значениями углов Φ_A и Φ_E , соответственно, и популяция хаотически расположенных флуорофоров N . Тонкая нить гибкая, и угол между осью волокна и осью тонкой нити ($\Theta_{1/2}$) соответственно не равен нулю. Вследствие того, что в обеих моделях углы Φ_A и Φ_E были равны друг другу, то в дальнейшем при обсуждении результатов будут приводиться только значение одного из них.

Значения параметров Φ_A , Φ_E , $\Theta_{1/2}$ и N вычисляли измерением четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции зонда при ориентации волокна параллельно ($\parallel I_{\parallel}$, $\parallel I_{\perp}$) и перпендикулярно ($\perp I_{\perp}$, $\perp I_{\parallel}$) плоскости поляризации возбуждающего света с помощью уравнений, описанных Дедовой с сотрудниками (2004) (рис. 17). Степени поляризации света параллельно (P_{\parallel}) и перпендикулярно (P_{\perp}) к оси мышечного волокна определяли по формулам (1) и (2):

$$P_{\parallel} = (\parallel I_{\parallel} - \parallel I_{\perp}) / (\parallel I_{\parallel} + \parallel I_{\perp}), \quad (1) \quad P_{\perp} = (\perp I_{\perp} - \perp I_{\parallel}) / (\perp I_{\perp} + \perp I_{\parallel}), \quad (2)$$

Флуоресценцию зондов 5-IAF и ФИТЦ-фаллоидина возбуждали при 488 ± 5 нм, 1,5-IAEDANS при 407 ± 5 нм с последующей регистрацией при 500-600 нм. Регистрацию интенсивностей флуоресценции выполняли в пяти разных точках для каждого мышечного

волокна. Для исследования каждого мутантного тропомиозина были использованы от 15 до 21 теневых мышечных волокон.

Все измерения проводились в отмывающем растворе в отсутствие или в присутствии 3 мМ АДФ, 5 мМ АМР-РНР и 5 мМ АТФ.

Статистическую достоверность изменений оценивали *t*-критерием Стьюдента (Student, 1908).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы применили модельную систему лишённых тропонина нитей актина, реконструированных в теневые мышечные волокна, с использованием экзогенного F-актина и ТМ: декорировали их с S1 и моделировали различные этапы цикла гидролиза АТФ (Borovikov et al., 2004, 2009). Для исследования эффекта мутаций Arg91Gly и Gln147Pro в β -ТМ, Glu240Lys и Arg244Gly в α -ТМ, ассоциированных с различными молекулярными фенотипами, на поведение ТМ и ответ головок миозина и актина на движение ТМ в течение АТФазного цикла, мы использовали метод поляризационной флуориметрии (Borovikov et al., 2004). Состояние актомиозинового комплекса (АМ) было смоделировано в отсутствие нуклеотидов. Mg-ADP, Mg-AMP-PNP и Mg-ATP были использованы для моделирования состояний АМ[^]ADP, АМ[']ATP и АМ^{*}ATP, соответственно (Goody, Hofmann, 1980; Roopnarine, Thomas, 1996).

3.1 Исследование β -тропомиозина с мутацией Arg91Gly

3.1.1 Влияние мутации Arg91Gly в β -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле

При инкорпорировании комплексов ФИТЦ-фаллоидин, S1-AEDANS и ТМ-AF в теневые мышечные волокна и возбуждении волокон поляризованным светом появлялась поляризованная флуоресценция, интенсивность которой регистрировали в двух направлениях волокна относительно плоскости поляризации – параллельном и перпендикулярном. По четырём интенсивностям (I_{\parallel} , I_{\perp} , ΔI_{\parallel} , ΔI_{\perp}) флуоресценции определяли степени поляризации зонда ФИТЦ-фаллоидин, специфически связанного с тремя мономерами актина в канавке нити (Oda et al., 2005), параллельно (P_{\parallel}) и перпендикулярно (P_{\perp}) плоскости волокна. Результаты по степеням поляризации для актина, специфически связанного с зондом ФИТЦ-фаллоидин, в отсутствие или присутствии S1, ТМ-WT и ТМ-Arg91Gly и нуклеотидов, представлены в таблице 2. В отсутствие нуклеотидов и субфрагмента-1 значение P_{\parallel} выше, чем P_{\perp} , что свидетельствует о высокой организованности зонда на актине параллельно оси волокна. В присутствии ТМ-WT соотношение $P_{\parallel} / P_{\perp}$ демонстрирует увеличение, предполагая увеличение организованности актиновых нитей, вызванной, по-видимому, ростом жёсткости нитей. В отличие от этого, мутация Arg91Gly приводит к уменьшению соотношения $P_{\parallel} / P_{\perp}$ относительно того же соотношения для актиновых нитей без тропомиозина. Такой эффект скорее всего связан с неспособностью мутантного тропомиозина упорядочивать нити актина должным образом, как это делает тропомиозин дикого типа.

Таблица 2. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного красителя ФИТЦ-фаллоидин, специфически связанного с F-актином, в отсутствие или в присутствии S1, TM(WT/Arg91Gly) и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM-Arg91Gly	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	-	-	0.336 ± 0.003	0.155 ± 0.003
-	-	+	-	0.353 ± 0.003	0.173 ± 0.002
-	-	-	+	0.323 ± 0.003	$*0.170 \pm 0.002$
-	+	+	-	0.305 ± 0.003	0.197 ± 0.002
-	+	-	+	0.285 ± 0.002	0.206 ± 0.003
ADP	+	+	-	0.287 ± 0.003	0.231 ± 0.004
	+	-	+	0.303 ± 0.003	0.150 ± 0.002
AMP-PNP	+	+	-	0.331 ± 0.003	0.037 ± 0.002
	+	-	+	$*0.334 \pm 0.002$	0.018 ± 0.003
ATP	+	+	-	0.321 ± 0.003	0.137 ± 0.003
	+	-	+	0.329 ± 0.002	0.067 ± 0.003

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

Связывание S1 с актином уменьшает долю параллельно ориентированных зондов и увеличивает долю перпендикулярно ориентированных (таблица 2). При этом соотношение $P_{\parallel} / P_{\perp}$ в присутствии TM-WT выше, чем в присутствии TM-Arg91Gly. Последнее, по нашему мнению, связано с тем, что мутантный TM увеличивает гибкость F-актина, проявляющееся в увеличении пропорции зондов, ориентированных перпендикулярно к оси мышечного волокна.

В присутствии нуклеотидов ADP, AMP-PNP и ATP соотношение $P_{\parallel} / P_{\perp}$ для F-актин-ФИТЦ-фаллоидина, декорированного S1 и TM-Arg91Gly, достоверно больше, чем для F-актин-ФИТЦ-фаллоидина, декорированного S1 и TM-WT. Проявление такого эффекта означает, что большая доля мономеров актина в присутствии мутантного тропомиозина находится параллельно к оси тонкой нити.

Дабы объяснить полученные эффекты, мы рассчитали изменение угла (Φ_E) ориентации зонда ФИТЦ-фаллоидин, специфически связанного с нитями актина, в отсутствие и в присутствии тропомиозина (WT и Arg91Gly), S1 и нуклеотидов при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТФ. Мы также рассчитали гибкость нити актина в АТФазном цикле как функцию от значения максимального отклонения зонда от оси волокна ($\theta_{1/2}$). Результаты вычислений представлены в виде гистограмм на рисунке 18, а и б.

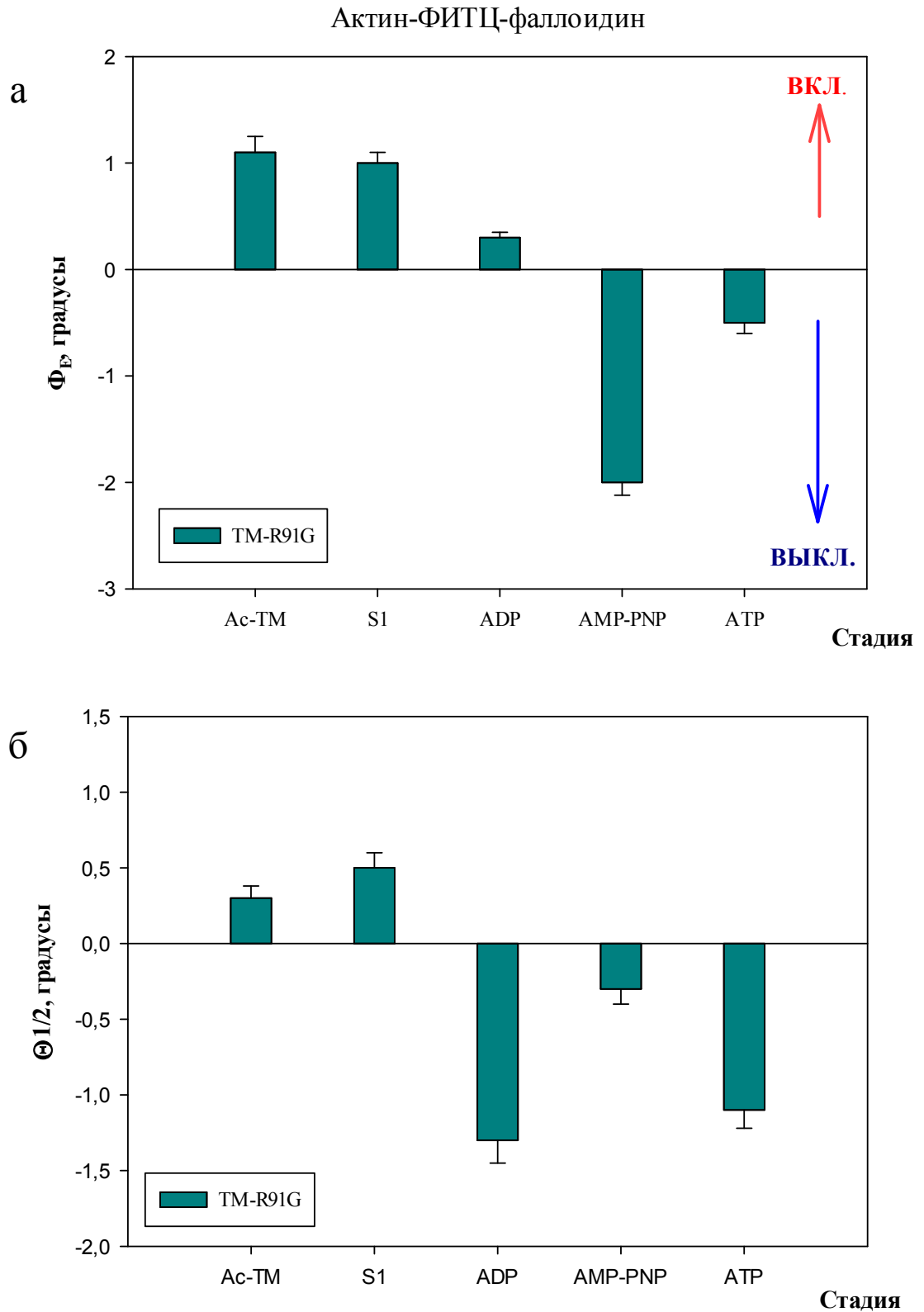


Рисунок 18. Влияние мутации Arg91Gly (R91G) в β -тропомиозине скелетных мышц на величину угла Φ_E (**а**) и $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда ФИТЦ-фаллоидин, специфически связанного с тремя мономерами актина в F-актине, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для актина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие включение (красная) и выключение (синяя) доли актиновых мономеров в F-актине ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения.

В соответствии с ранее опубликованными данными (Borovikov et al., 2009a) присоединение TM-WT к F-актину вызывает переход определённого количества мономеров актина из включённого в выключенное структурное состояние. Иными словами, происходит увеличение относительного количества мономеров актина, не способных активировать АТФазу миозина (Gordon et al., 2000). Такой переход сопровождается вращением актинового мономера к центру тонкой нити, что приводит к уменьшению угла Φ_E зонда ФИТЦ-фаллоидин, специфически связанного с тремя прилегающими мономерами актина в канавке F-актина.

В отсутствие нуклеотидов и субфрагмента-1 миозина доля включенных мономеров актина в присутствии TM-Arg91Gly достоверно больше (Φ_E больше на 1.1^0), чем в присутствии TM-WT (рис. 18, а). Видимо мутантный тропомиозин теряет способностью должным образом выключать долю мономеров актина, играющую существенную роль в процессе регуляции актин-миозинового взаимодействия. Связывание S1 с актином сдвигает тяжи тропомиозина в направлении центра тонкой нити (McKillop, Geeves, 1993; Lehman, Craig, 2008), увеличивая долю включенных мономеров актина (Gordon et al., 2000; Borovikov et al., 2004), способных активировать АТФазу миозина. Связывание S1 с актином в присутствии TM-Arg91Gly приводит к еще большему увеличению доли включенных мономеров актина, чем в присутствии тропомиозина дикого типа (рис. 18, а). Повышенная доля включённых мономеров актина сохраняется и при моделировании $AM^{\wedge}ADP$ в присутствии мутантного тропомиозина и достоверно сокращается при переходе в слабую форму связывания миозиновой головки с актином (“AMP-PNP” и “АТР” на рис. 18, а). Так, доля включенных мономеров актина при моделировании слабой формы связывания миозина с актином была ниже (соответственно, выше доля выключенных мономеров актина) в присутствии TM-Arg91Gly, чем те же значения для актина в присутствии TM-WT. По-видимому, мутация в тропомиозина влияет на движение мономеров актина в составе тонкой нити при взаимодействии с миозиновой головкой и нарушает в данном конкретном случае (в присутствии АТФ) образование слабого структурного состояния между S1 и актином.

Одновременно с изменениями в значениях угла Φ_E зонда ФИТЦ-фаллоидин, специфически связанного с F-актином, происходят также изменения в гибкости актиновой нити в присутствии мутантного, Arg91Gly тропомиозина, по сравнению с контролем (рис. 18, б). Если сравнить гистограммы на рис. 18, а и б, то становится очевидным, что изменения в доле включенных и выключенных мономеров актина в присутствии мутантного тропомиозина тождественно влияют на изменения в гибкости актиновой нити. Так, высокой по сравнению с контролем доле включенных мономеров актина в присутствии тропомиозина с мутацией Arg91Gly соответствует высокая гибкость нити актина (состояния “Ac-TM” и “S1” на рис. 18, а и б). Низкой же доле включенных мономеров актина в присутствии TM-Arg91Gly соответствует низкая по сравнению с контролем гибкость нити актина при моделировании слабой формы

связывания S1 с актином (состояния “AMP-PNP” и “АТФ” на рис. 18, а и б). Единственное отклонение от такой корреляции наблюдается в присутствии АДФ, моделирующего сильное связывание S1 с актином: высокой доле включенных субъединиц F-актина приходилась низкая гибкость актиновой нити в присутствии мутанта, по сравнению с гибкостью нити в присутствии TM-WT (состояние “ADP” на рис. 18, а и б).

Для более глубокого понимания и детального объяснения этих эффектов мы оценили влияние этой мутации на пространственную организацию и подвижность миозиновых головок, а также на позицию и гибкость мутантного тропомиозина на актине на моделируемых стадиях АТФазного цикла.

3.1.2 Влияние мутации Arg91Gly в β -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле

Исследование влияния мутации Arg91Gly в β -TM на пространственную организацию головок миозина, модифицированных по остатку цистеина в 707 позиции конвертерного домена зондом 1,5-IAEDANS, на актине в теневых мышечных волокнах методом поляризационной флуориметрии показало, что мутация существенно влияет на параметры флуоресценции на моделируемых стадиях цикла гидролиза АТФ. Значения параметров поляризованной флуоресценции параллельно (P_{\parallel}) и перпендикулярно (P_{\perp}) оси мышечного волокна в присутствии тропомиозинов дикого типа и с мутацией Arg91Gly в течение АТФазного цикла представлены в таблице 3.

В отсутствие нуклеотидов доля диполей излучения S1-AEDANS в присутствии TM-Arg91Gly параллельно оси волокна достоверно выше, чем в присутствии TM-WT. При этом, расчёт угла Φ_E и количества хаотически ориентированных флуорофоров для S1-AEDANS показывает, что величины этих параметров достоверно уменьшаются в присутствии мутанта, чем в контрольных экспериментах (рис. 19, а и б).

Таблица 3. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, на актине в присутствии ТМ(WT/Arg91Gly) и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM-Arg91Gly	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	+	+	-	0.359 ± 0.002	-0.074 ± 0.004
-	+	-	+	0.366 ± 0.003	-0.090 ± 0.002
ADP	+	+	-	0.389 ± 0.003	-0.065 ± 0.004
	+	-	+	$*0.395 \pm 0.003$	-0.082 ± 0.004
AMP-PNP	+	+	-	0.333 ± 0.003	0.069 ± 0.002
	+	-	+	0.349 ± 0.002	-0.030 ± 0.004
ATP	+	+	-	0.295 ± 0.003	0.219 ± 0.005
	+	-	+	$*0.298 \pm 0.003$	$*0.211 \pm 0.006$

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

Изменения в значениях угла Φ_E комплекса S1-AEDANS в большую или меньшую сторону коррелируют с изменением количества сильно и слабо связанных головок миозина с актином (Borovikov, Gusev, 1983; Borovikov et al., 2004, 2009a, 2015). При этом модификация миозиновой головки указанным зондом не показала существенного влияния на связывание миозиновой головки с актиновой нитью в отсутствие или в присутствии нуклеотидов в экспериментах по соосаждению этих двух белков (Borovikov et al., 2015). Поэтому полученные нами результаты с комплексом S1-AEDANS можно считать полезными в выяснении работы поперечного мостика на актине в присутствии тропомиозинов.

Так, количество сильно связанных головок миозина в присутствии мутантного тропомиозина достоверно выше и в отсутствие нуклеотидов, и в присутствии АДФ, АМР-РНР и АТФ (рис. 19, а). Наибольшая доля сильно связанных головок миозина с актином наблюдалась в присутствии негидролизуемого аналога АТФ – АМР-РНР, который использовался для моделирования промежуточной стадии актин-миозинового взаимодействия (рис. 19, а). Можно предположить, что мутация Arg91Gly влияет на переход миозиновой головки от слабого к сильному связыванию с актином, играющую значительную роль в процессе генерации силы.

S1-AEDANS

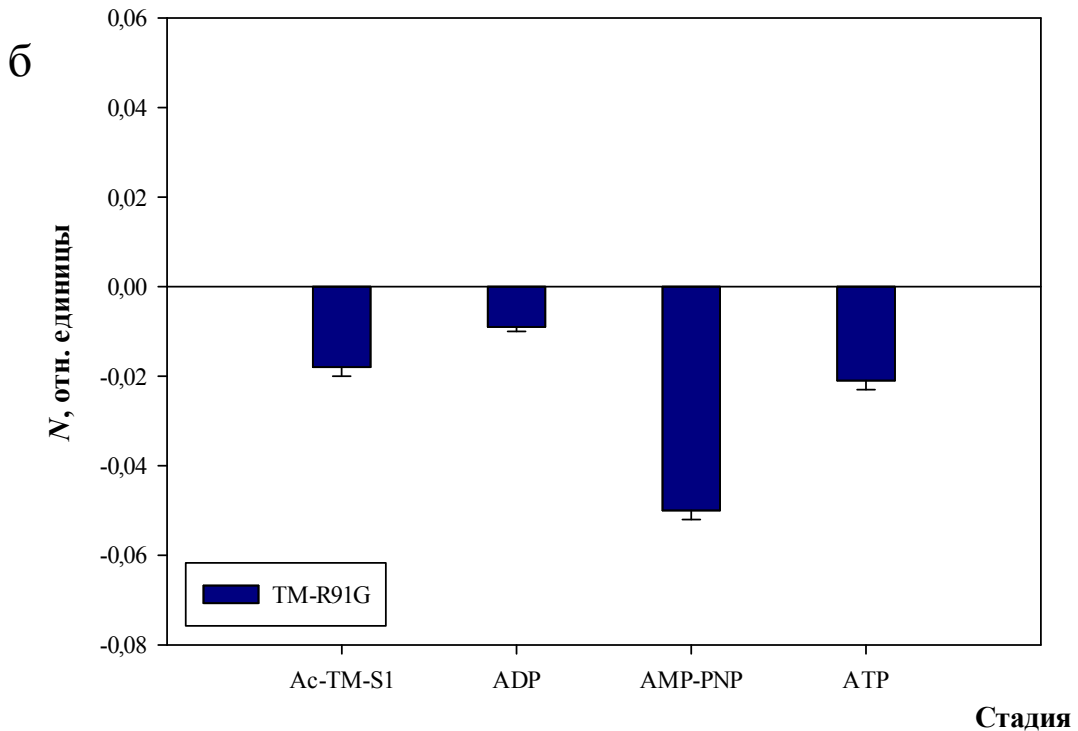
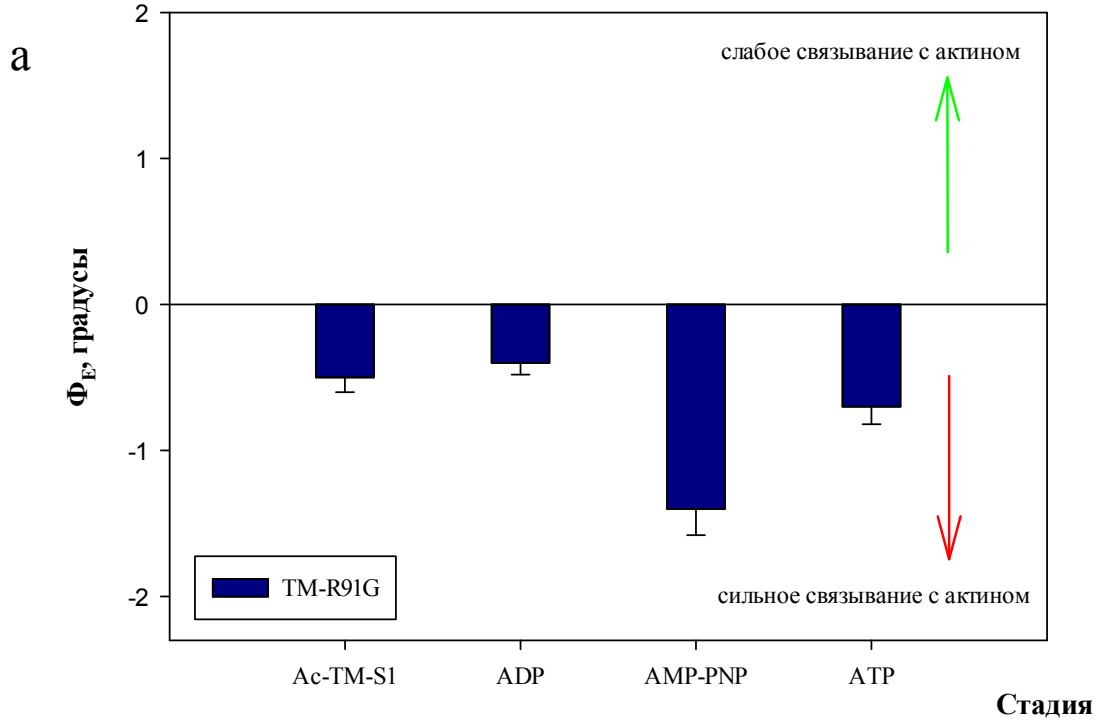


Рисунок 19. Влияние мутации Arg91Gly (R91G) в β -тропомиозине скелетных мышц на величину угла Φ_E (**а**) и показатель подвижности N (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и N для головки миозина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие изменения доли сильно (красная) и слабо (зеленая) связанных головок миозина с актином ($P < 0.05$). Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения.

С высокой долей сильно связанных головок миозина в присутствии мутантного тропомиозина согласуются также результаты по количеству хаотически ориентированных флуорофоров N в теневом мышечном волокне (рис. 19, б). Сравнив гистограммы на рис. 19, а и б, нетрудно заметить, что изменения в значениях Φ_E пропорциональны изменению значений величины N . Количество хаотически ориентированных флуорофоров достоверно меньше в присутствии тропомиозина с мутацией Arg91Gly, чем в контроле, что свидетельствует о высокой организованности головок миозина в присутствии этого мутанта.

Наконец, мы оценили влияние мутации Arg91Gly в β -TM на позицию тропомиозина на актине в отсутствие или присутствии S1 миозина и нуклеотидов. При инкорпорировании β -TM, модифицированного флуоресцентным зондом 5-IAF по остатками цистеина в позициях 36 и 190, и при возбуждении этих волокон поляризованным светом появлялась поляризованная флуоресценция, интенсивность которой регистрировали в двух направлениях. Рассчитанные на основании четырех интенсивностей (I_{\parallel} , I_{\perp} , I_{\parallel} , I_{\perp}) значения параметров поляризации флуоресценции (P_{\parallel} и P_{\perp}) представлены в таблице 4.

Таблица 4. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 5-IAF, специфически связанного с цистеинами 36 и 190 в β -TM (WT/Arg91Gly), в присутствии актлина, S1 и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM-Arg91Gly	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	+	-	-0.012 ± 0.002	0.241 ± 0.002
-	-	-	+	0.042 ± 0.002	0.227 ± 0.002
-	+	+	-	-0.026 ± 0.003	0.222 ± 0.001
-	+	-	+	0.025 ± 0.002	0.232 ± 0.003
ADP	+	+	-	-0.028 ± 0.002	0.227 ± 0.001
	+	-	+	0.019 ± 0.002	0.193 ± 0.002
AMP-PNP	+	+	-	0.014 ± 0.002	0.165 ± 0.002
	+	-	+	-0.016 ± 0.002	0.219 ± 0.002
ATP	+	+	-	0.030 ± 0.002	0.182 ± 0.002
	+	-	+	0.026 ± 0.002	0.129 ± 0.002

Как видно из таблицы, в отсутствие нуклеотидов и миозиновых головок диполи излучения зонда 5-IAF, связанного с тропомиозинами дикого типа и с мутацией Arg91Gly (TM-WT-AF/TM-Arg91Gly-AF), организованы преимущественно перпендикулярно оси мышечного волокна; при этом, доля диполей излучения от мутантного тропомиозина, располагающихся параллельно и перпендикулярно оси волокна достоверно больше и меньше, соответственно, чем у тропомиозина дикого типа. Связывание головок миозина (моделирование ригорного состояния актомиозина) достоверно меняет долю параллельно и перпендикулярно ориентированных

диполей для TM-WT и меняет долю параллельно ориентированных к оси диполей для мутанта тропомиозина. При моделировании слабых форм связывания миозина с актином ориентация диполей излучения исследованных тропомиозинов обнаружила различия преимущественно в их перпендикулярном расположении к оси волокна.

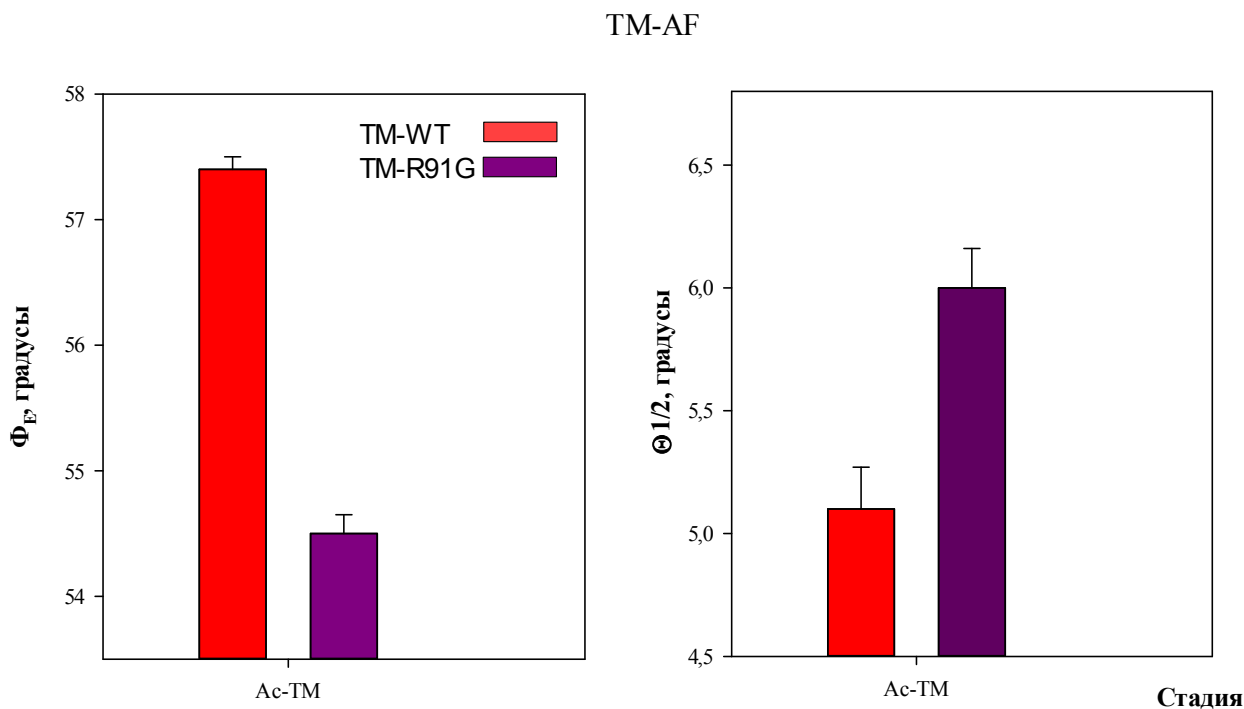


Рисунок 20. Представлены величины угла Φ_E (а) и $\theta_{1/2}$ (б) для тропомиозина дикого типа (TM-WT) и с мутацией Arg91Gly (TM-R91G), связанного с нитями актина, в отсутствие головок миозина и нуклеотидов ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения.

Рассмотрим изменения значений величины угла Φ_E и показателя гибкости ($\theta_{1/2}$) для исследованных тропомиозинов (WT и Arg91Gly). Результаты представлены в виде гистограмм на рисунках 20 и 21. Следует здесь отметить, что в результатах, представленных в виде гистограммы на рис. 20, а и 21, а, мы ввели некоторые коррективы. Поправки касаются того факта, что поскольку тропомиозин связан с актином и может вовлекаться в движение, инициированное движением актина, мы вычли из значений Φ_E , полученных от актин-ФИТЦ-фаллоидина (рис. 20, а) значения угла Φ_E для TM-AF.

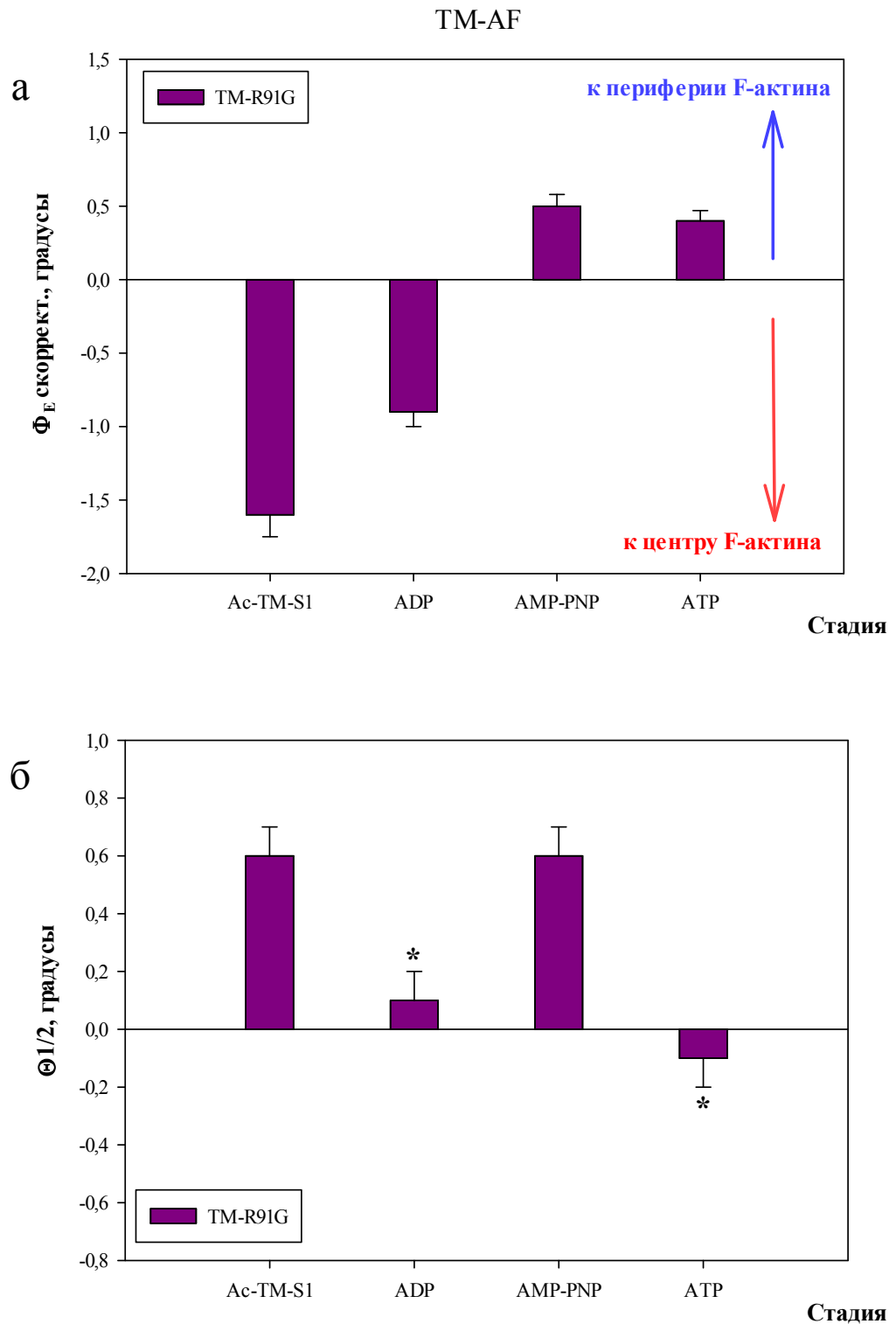


Рисунок 21. Влияние мутации Arg91Gly (R91G) в β -тропомиозине скелетных мышц на величину скорректированного с движением актин-AEDANS угла Φ_E (**а**) и $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда 5-IAF, специфически связанного с двумя остатками цистеина в тропомиозине, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие движение тропомиозина к периферии (синяя) и к центру (красная) актиновой нити ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Итак, в отсутствие головок миозина и нуклеотидов величина угла Φ_E для TM-Arg91Gly-AF ниже (на 2.9°) по сравнению с Φ_E для TM-WT-AF (рис. 20, а). Это предполагает, что мутация может приводить к вращению диполей излучения зонда 5-IAF, связанного с TM-Arg91Gly, к центру актиновой нити. При этом такой процесс происходит с более высокой гибкостью мутантного тропомиозина, чем в контроле (рис. 20, б). Связывание субфрагмента-1 миозина с актином в присутствии тропомиозинов приводит к дальнейшему уменьшению значений угла Φ_E (рис. 21, а). Причем сохраняется более высокая доля диполей излучения зонда 5-IAF, связанного с TM-Arg91Gly, находящихся ближе к центру нити актина. Добавление АДФ уменьшает угол Φ_E для TM-Arg91Gly-AF на 0.8° больше, чем для TM-WT, свидетельствуя о сохранении высокой доли ориентированных ближе к центру нитей флуорофоров излучения для мутанта (рис. 21, а). Такая картина для мутанта меняется при моделировании слабых форм связывания миозина с актином. В присутствии нуклеотида АТФ и его аналога АМР-РНР увеличивается доля флуорофоров для TM-Arg91Gly-AF, расположенных ближе к периферии нити актина, увеличивается по сравнению с контролем (рис. 21, а). При этом высокая гибкость мутантного тропомиозина сохраняется в присутствии АМР-РНР и не отличается от контрольных значений в присутствии АТФ (рис. 21, б).

3.1.3 Обсуждение результатов по исследованию β -тропомиозина с мутацией Arg91Gly

Считается, что молекула тропомиозина заворачивается вокруг нити актина и формирует 14 псевдоповторов из 19-20 остатков каждый, разделена на 7 пар α - и β - зон. Эти зоны могут действовать в качестве альтернативных сайтов специфического связывания с актином при различных функциональных состояниях тонкой нити (McLachlan, Stewart, 1976). Было предположено, что ТМ может кооперативным образом переключать расположение поверхности актин-тропомиозина между активным и расслабленным состояниями в ответ на связывание ионов Ca^{2+} и головок миозина в регулируемой тонкой нити (Geeves, Holmes, 2005). Недавно полученные данные с комбинированием электронной микроскопии и молекулярного моделирования предполагают, что существует ~ 30 потенциальных солевых мостиков между ТМ и актином в лишённых тропонина нитях, что, как полагают, обеспечивает относительно сильное взаимодействие между этими белками (Lehman et al., 2013). В противоположность этому, в присутствии миозина обнаружено только ~ 11 солевых мостиков. Несмотря на это, ТМ взаимодействует с миозином, приводя к образованию других 16 возможных солевых мостиков (Behrmann et al., 2012).

Важность солевых мостиков была отмечена в исследованиях точечных мутаций аминокислотных остатков в последовательности ТМ, участвующих в электростатических взаимодействиях с актином (Wieczorek et al., 2008; Marston et al., 2013). Было обнаружено, что эти мутации, ассоциированные с большим числом заболеваний мышц человека, могут изменять позицию ТМ на нитях актина, а также конформационные и функциональные состояния актина и миозина (Ohlsson et al., 2008; Borovikov et al., 2009b,c; Rysev et al., 2012). Опираясь на эти данные, было сделано предположение, что позиция тяжей ТМ на поверхности актиновой нити определяет функциональное состояние F-актина и миозина в мышечных волокнах через электростатические взаимодействия ТМ с актином и миозином (Borovikov et al., 2015). В лишённых миозина и тропонина нитях тяжи нормального ТМ локализуются ближе к периферии нити (к внешнему домену актина): следовательно, в соответствии с электростатическим взаимодействием между ТМ и актином только часть мономеров актина включена. В отличие от этого, связывание миозиновой головки с актином сдвигает тяжи ТМ к внутреннему домену актина (к открытой позиции), тем самым заметно изменяя природу электростатического взаимодействия между ТМ и актином и индуцируя новое электростатическое взаимодействие с миозином (Behrmann et al., 2012). Последнее приводит к заметному увеличению числа включенных мономеров актина до тех пор, пока головки миозина сильно связаны с F-актином (Borovikov et al., 2015).

Как уже отмечалось, мутация Arg91Gly была обнаружена в β -тропомиозине быстрых скелетных мышечных волокон у пациента, страдающего дистальным артрогрипозом (Sung et al., 2003). Исследование этой мутации показало, что она увеличивает актин-активируемую АТФазную активность миозина при всех исследованных концентрациях Ca^{2+} (Robinson et al., 2007) и дестабилизирует молекулу тропомиозина (Невзоров и др., 2008). При этом, дестабилизация молекулы белка считается не локальной, а охватывающей все длину тропомиозина, начиная с места возникновения мутации (Невзоров и др., 2008). Аргинин 91 находится в *g* позиции гептапептидного повтора тропомиозина во втором актин-связывающем модуле. Остатки в позициях *g* и *e* участвуют в образовании солевых мостиков между двумя спиральями тропомиозина в составе суперспирали и, тем самым, стабилизируют молекулу белка (см. обзор Perry, 2001). По-видимому, дестабилизация молекулы тропомиозина с мутацией Arg91Gly, выявленная в экспериментах по тепловой денатурации белка (Невзоров и др., 2008), вызвана нарушением солевого мостика между остатком Arg91 одной цепи и Glu96 другой (рис. 22).

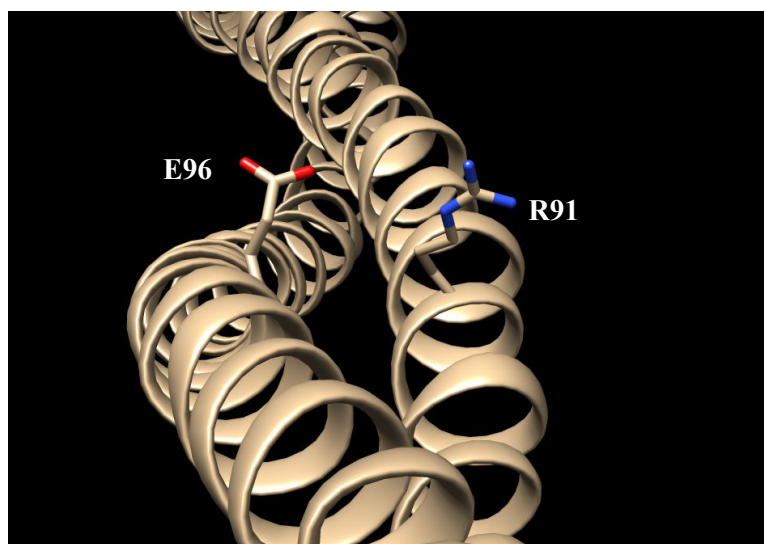


Рисунок 22. Представлено расположение остатков аргинина 91 (R91) и глутамата 96 (E96) в α -спиралях тропомиозина (вид “с торца”). Изображение сгенерировано на основании трехмерной модели тропомиозина (Whitsby, Philips, 2000) в программе “Chimera” (версия 1.10.1).

Обобщая наши результаты по исследованию влияния мутации Arg91Gly на актин-миозиновое взаимодействие и на позиционирование тропомиозина с этой мутацией, можно сделать следующие заключения:

1. В отсутствие нуклеотидов и головок миозина мутантный тропомиозин по сравнению с тропомиозином дикого типа занимает позицию, близкую к открытой, включая больше, чем в контроле, мономеров актина.
2. Головки миозина при моделировании сильной формы связывания способствуют смещению мутанта еще дальше по направлению к центру тонкой нити, открывая еще больше сайтов связывания миозина на актине, чем это наблюдается в присутствии тропомиозина дикого типа.
3. Тропомиозин с мутацией Arg91Gly при моделировании слабого структурного состояния актомиозина располагается в позиции, близкой к закрытой, выключая долю актиновых мономеров в F-актине и способствуя образованию большой доли сильно связанных головок миозина с актином.

Основываясь на этих выводах, можно схематически представить модель работы актин-тропомиозин-миозиновой системы в присутствии тропомиозина с мутацией Arg91Gly по сравнению с диким типом, как это сделано на рис. 23.

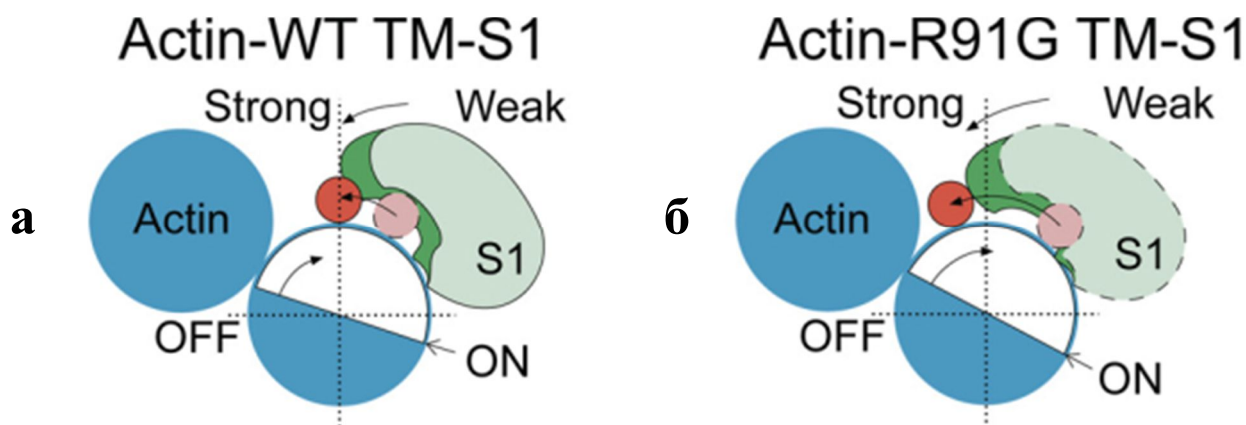


Рисунок 23. Схематическая модель работы актин-тропомиозин-миозинового комплекса в присутствии тропомиозина дикого типа (а) и тропомиозина с мутацией Arg91Gly (R91G) (б) при моделировании перехода актомиозина от слабой (Weak) к сильной (Strong) форме связывания.

Таким образом, гиперсократительный молекулярный фенотип при мутации Arg91Gly в тропомиозине, обнаруженный в экспериментах по определению кальциевой чувствительности актомиозиновой системы (Robinson et al., 2007), можно объяснить неспособностью тропомиозина закрывать сайты связывания миозина на актине в присутствии АТФ, нарушая функцию перехода миозиновой головки в слабое связывания с актином и, тем самым, нарушая процесс релаксации, держа актомиозин в сильно связанном состоянии. По-видимому, высокая доля сильно связанных с актином головок миозина в присутствии АТФ может являться одной из причин возникновения контрактур у больных дистальным артрогрипозом.

3.2 Исследование β -тропомиозина с мутацией Gln147Pro

3.2.1 Влияние мутации Gln147Pro в β -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле

Одной из мутаций, вызывающих врождённую миопатию у человека, явилась мутация с заменой полярного нейтрального глутамина 147 на неполярный нейтральный пролин в β -тропомиозине быстрых скелетных мышц человека (Donner et al., 2002). У пациента были выражены общая мышечная слабость и трудности в передвижении, начиная с 12 лет. Биопсия мышц выявила наличие белковых скоплений на гистологических срезах, в связи с чем у пациента диагностировали немалиновую миопатию (Donner et al., 2002). Годы спустя этот диагноз был поставлен под сомнение другой группой авторов (Brandis et al., 2008). Авторы сочли, что присутствия выраженных немалиновых телец в электронно-микроскопических изображениях не наблюдалось и, более того, выявленная диспропорция типов волокон предполагает диагноз

ВДТВ, чем НМ. Анализ соосаждения вместе с актином показал, что тропомиозин с мутацией Gln147Pro практически не связывается с F-актином (Marttila et al., 2012), но сохраняет сродство с небулином (Marttila et al., 2014). Сразу отметим, что в наших экспериментах тропомиозин с мутацией Gln147Pro связывался с F-актином при инкорпорировании в теневые мышечные волокна (Karpicheva et al., 2016).

Величины степеней поляризации флуоресценции зонда 1,5-IADANS, специфически связанного с остатком цистеина 374 субдомена 1 актина, в присутствии β -тропомиозинов дикого типа (TM-WT) и с мутацией Gln147Pro (TM-Gln147Pro), S1 и нуклеотидов, параллельно и перпендикулярно оси теневого мышечного волокна представлены в таблице 5.

Таблица 5. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного красителя 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 374 субдомена 1 актина, в отсутствие или в присутствии S1, TM(WT/Gln147Pro) и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM-Gln147Pro	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	-	-	0.229 ± 0.001	0.109 ± 0.002
-	-	+	-	0.236 ± 0.001	0.107 ± 0.002
-	-	-	+	0.232 ± 0.001	$*0.106 \pm 0.002$
-	+	+	-	0.124 ± 0.001	0.223 ± 0.002
-	+	-	+	0.091 ± 0.002	0.211 ± 0.002
ADP	+	+	-	0.114 ± 0.001	0.204 ± 0.001
	+	-	+	0.092 ± 0.002	0.197 ± 0.001
AMP-PNP	+	+	-	0.122 ± 0.002	0.201 ± 0.001
	+	-	+	$*0.121 \pm 0.001$	0.175 ± 0.001
ATP	+	+	-	0.165 ± 0.001	0.167 ± 0.002
	+	-	+	0.193 ± 0.002	0.108 ± 0.001

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

В отсутствие S1, тропомиозина и нуклеотидов мономеры актин-AEDANS занимают расположение, преимущественно параллельное к оси мышечного волокна – значение P_{\parallel} вдвое больше P_{\perp} . Практически такая же величина соотношения P_{\parallel} к P_{\perp} наблюдалась в случае использования другого зонда – ФИТЦ-фаллоидина, результаты которого представлены в таблице 2 (см. выше). Одинаковый ответ этих двух зондов – 1,5-IAEDANS и ФИТЦ-фаллоидина, является хорошим показателем для их использования в исследовании конформационных перестроек актина. Связывание TM-WT достоверно увеличивает долю параллельно расположенных диполей излучения актин-AEDANS. Незначительное, но все-таки отличающееся от дикого типа, увеличение P_{\parallel} также наблюдается в присутствии мутанта.

Связывание субфрагмента-1 миозина увеличивает значение P_{\perp} и уменьшает P_{\parallel} в присутствии TM-WT и TM-Gln147Pro. Однако, доля и параллельно, и перпендикулярно ориентированных к оси волокна диполей излучения в присутствии мутанта достоверно меньше,

чем в контроле. По-видимому, мутация в тропомиозине влияет на процесс конформационных перестроек, происходящих в субдомене 1 актина под воздействием S1 миозина. При моделировании сильного и слабого структурного состояния актомиозинового комплекса (соотв. “ADP” и “ATP” в таблице 5) значения параметров поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) достоверно отличались в присутствии TM-WT и TM-Gln147Pro. В присутствии AMP-PNP значения P_{\parallel} для актин-AEDANS в присутствии TM-WT или TM-Gln147Pro достоверно не отличались.

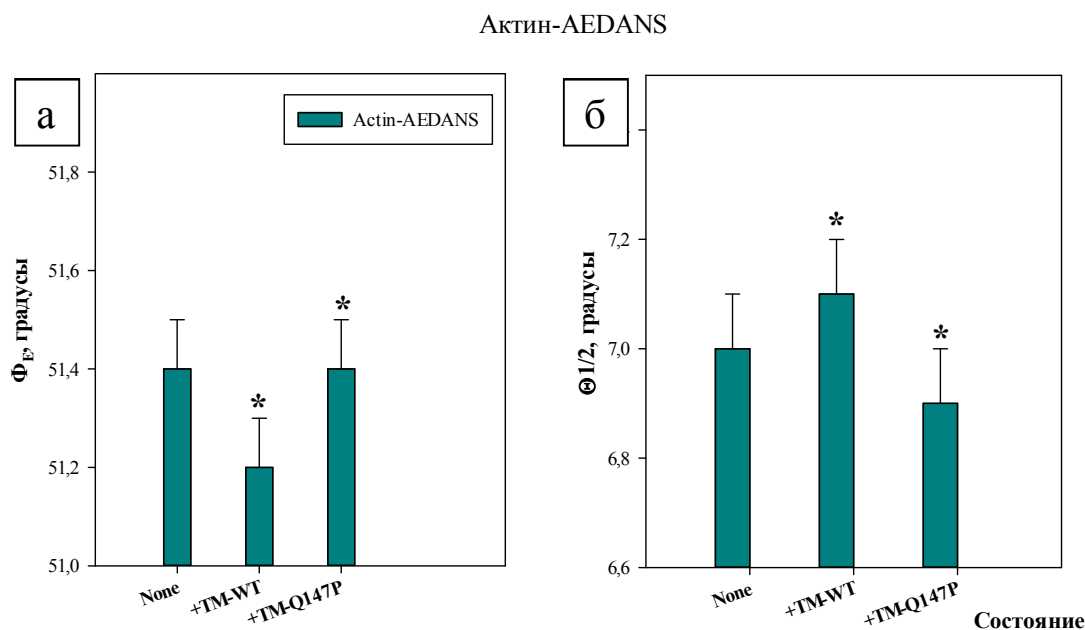


Рисунок 24. Приведены значения угла Φ_E (а) и показателя гибкости $\theta_{1/2}$ (б) для актин-AEDANS в отсутствие и в присутствии тропомиозинов дикого типа (TM-WT) или с мутацией Glu147Pro (TM-Q147P) ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Для понимания этих эффектов оценим изменения значения угла Φ_E зонда 1,5-IAEDANS, связанного с актином, на моделируемых стадиях АТФазного цикла. Как видно из рисунка 24, а и б, в отсутствие головок миозина и нуклеотидов величины угла Φ_E и показателя гибкости $\theta_{1/2}$ для актин-AEDANS в присутствии TM-Gln147Pro достоверно не отличаются от тех же величин в присутствии TM-WT. Связывание головок миозина также не обнаружило достоверной разницы углов Φ_E в присутствии обоих тропомиозинов (рис. 25, а), однако обнаружило уменьшение гибкости актиновой нити в присутствии мутанта относительно контроля (рис. 25, б).

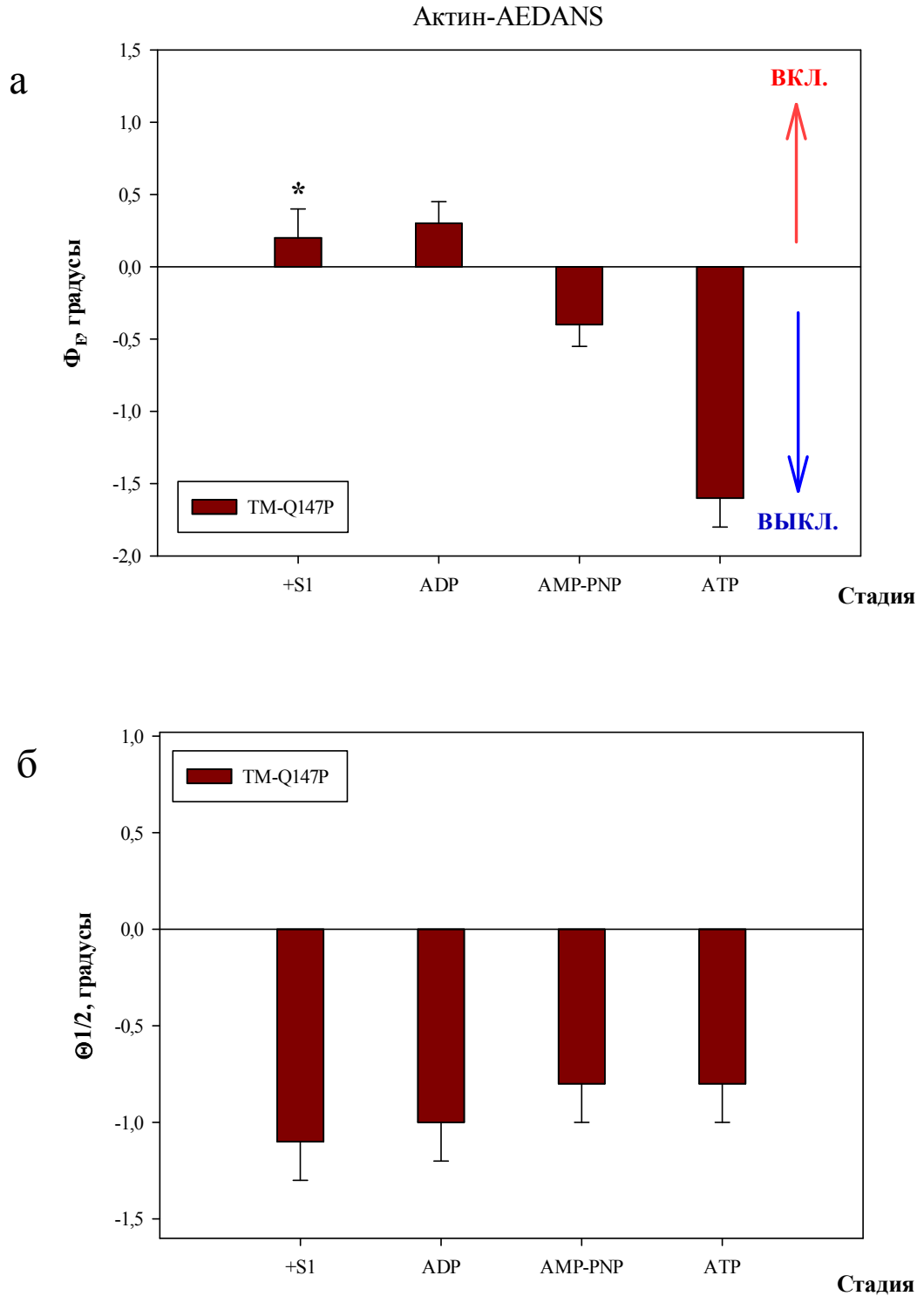


Рисунок 25. Влияние мутации Gln147Pro (Q147P) в β -тропомиозине на величину угла Φ_E (**а**) и $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 374 субдомена 1 актина, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для актина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие включение (красная) и выключение (синяя) доли актиновых мономеров в F-актине ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Разница между значениями угла Φ_E в присутствии тропомиозинов начинает проявляться при моделировании сильной и слабой форм связывания миозина с актином, с использованием нуклеотидов. Так, в присутствии S1 и АДФ значение угла Φ_E для актин-AEDANS в присутствии мутанта выше, чем в контроле (рис. 25, а). Это предполагает, что доля включенных мономеров актина в присутствии TM-Gln147Pro выше, чем в присутствии TM-WT.

При моделировании слабых форм связывания актомиозина (стадии “AMP-PNP” и “ATP”) значения угла Φ_E для актин-AEDANS в присутствии мутантного тропомиозина достоверно меньше, чем в присутствии тропомиозина дикого типа (рис. 25, а). Такой эффект свидетельствует об увеличении доли выключенных мономеров актина, вызванного точечной мутацией Gln147Pro в тропомиозине. Выключенные мономеры актина неспособны активировать головку миозина, для проявления АТФазной активности последней (Borovikov et al., 2004). В оценке гибкости актиновой нити в присутствии тропомиозина с мутацией Gln147Pro необходимо отметить, что гибкость нитей актина в присутствии мутанта была ниже контрольных результатов при всех смоделированных стадиях АТФазного цикла (рис. 25, б). Скорее всего, последнее связано с тем, что изменения в жёсткости мутантного тропомиозина (см. следующий раздел) влияют на жёсткость актиновых нитей, связанных с этим мутантом.

3.2.2 Влияние мутации Gln147Pro в β -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле

Мы исследовали эффекты мутации Gln147Pro в β -тропомиозине на позицию головок миозина и тропомиозина на актине при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТФ. К тому же, нами было изучено влияние данной мутации на подвижность головок миозина и на гибкость тропомиозиновых тяжей на актине в отсутствие или присутствии нуклеотидов.

Для оценки расположения головок миозина в теневых волокнах в присутствии тропомиозина дикого типа и с мутацией Gln147Pro рассмотрим значения степеней поляризации зонда 1,5-IAEDANS, связанного с остатком цистеина 707 S1 миозина, параллельно и перпендикулярно оси волокна. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, на актине в отсутствие и в присутствии ТМ(WT/Gln147Pro) и нуклеотидов.

Нуклеотид	ТМ-WT	ТМ-Gln147Pro	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	-	0.349 ± 0.002	-0.024 ± 0.002
-	+	-	0.357 ± 0.002	-0.037 ± 0.003
-	-	+	0.343 ± 0.003	-0.022 ± 0.001
ADP	+	-	0.350 ± 0.002	0.020 ± 0.002
	-	+	0.366 ± 0.002	-0.025 ± 0.001
AMP-PNP	+	-	0.239 ± 0.002	0.102 ± 0.002
	-	+	0.233 ± 0.002	0.106 ± 0.001
ATP	+	-	0.227 ± 0.003	0.154 ± 0.005
	-	+	0.241 ± 0.003	0.128 ± 0.006

В отсутствие нуклеотидов и тропомиозина бóльшая доля диполей излучения зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с остатком цистеина 707 миозиновой головки, преимущественно занимает расположение, параллельное к оси волокна (значение P_{\parallel} больше значения P_{\perp}). Присоединение тропомиозина дикого типа к актину приводит к достоверному увеличению доли диполей излучения зонда, ориентированных параллельно (P_{\parallel}) и перпендикулярно (P_{\perp}) оси теневого мышечного волокна. В противоположность этому, присоединение мутантного тропомиозина выражается в более низких, по сравнению с контролем, величинах степеней поляризации. В этом смысле величины степеней поляризации в обоих направлениях похожи на величины значения P_{\parallel} и P_{\perp} для диполей S1-AEDANS в отсутствие тропомиозина. Видимо, посадка мутантного тропомиозина происходит в позиции на актине, существенно не влияющей на расположение миозиновых головок. Добавление АДФ достоверно уменьшает долю параллельно и перпендикулярно ориентированных диполей в присутствии ТМ-WT и увеличивает долю параллельно и перпендикулярно ориентированных в присутствии мутанта. При моделировании промежуточной стадии актин-миозинового взаимодействия с использованием негидролизуемого аналога АТФ – AMP-PNP, значительной разницы между степенями поляризации в присутствии ТМ-WT и ТМ-Gln147Pro не наблюдается. Разница наблюдается в присутствии АТФ: доля параллельно ориентированных диполей в присутствии мутанта больше, тогда как доля перпендикулярно ориентированных к оси волокна меньше, чем в присутствии ТМ-WT.

В соответствии с анализом результатов в предыдущих разделах, изучим влияние точечной мутации Gln147Pro в β -ТМ на величины угла Φ_E и показателя подвижности N для S1-AEDANS, связанного с актином в теневом мышечном волокне, на различных стадиях АТФазного цикла. Результаты представлены в виде гистограмм на рисунке 26, а и б.

S1-AEDANS

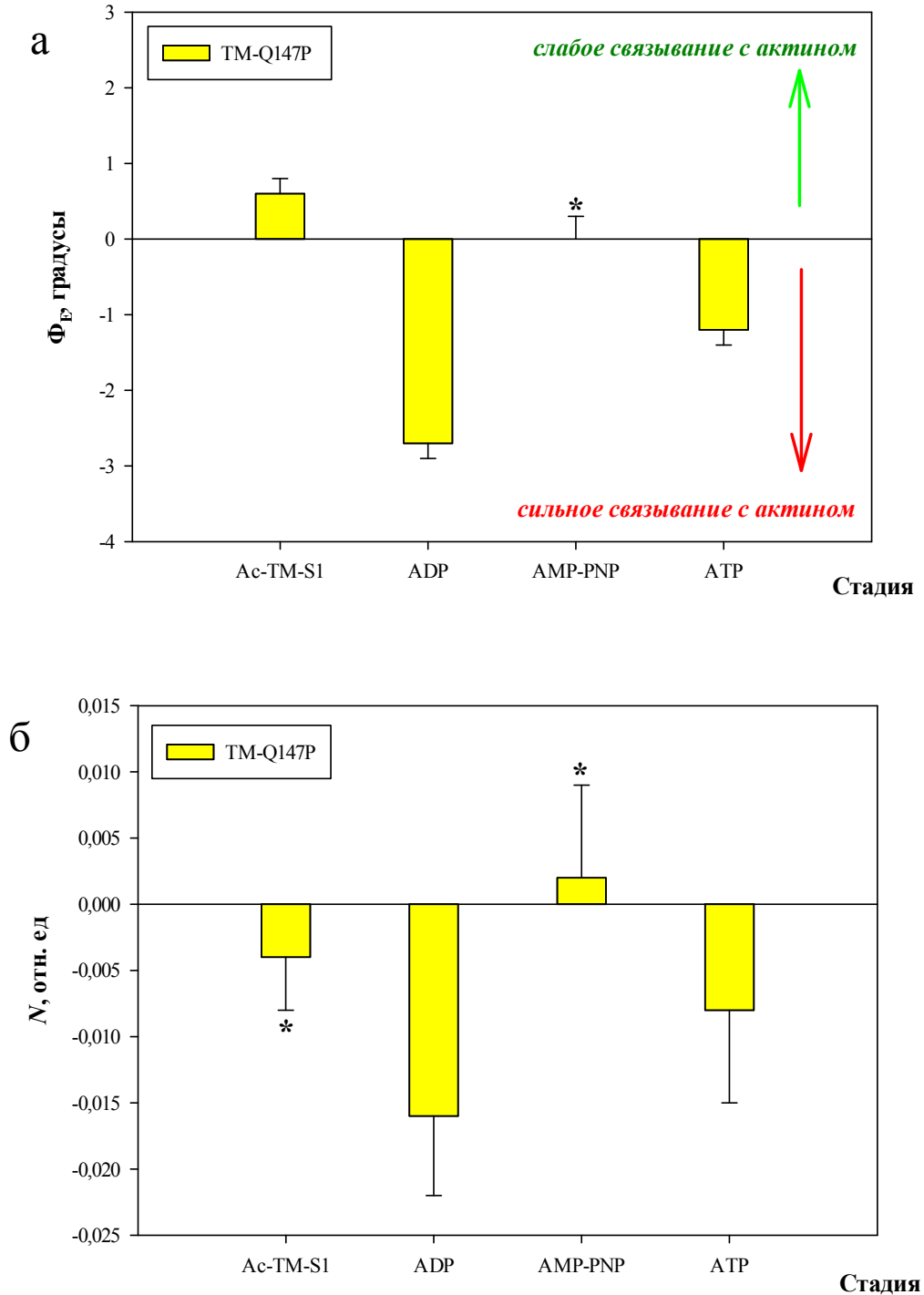


Рисунок 26. Влияние мутации Gln147Pro (Q147P) в β -тропомиозине скелетных мышц на величину угла Φ_E (**а**) и показатель подвижности N (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и N для головки миозина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие изменения доли сильно (красная) и слабо (зеленая) связанных головок миозина с актином ($P < 0.05$). Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

В отсутствие нуклеотидов величина угла Φ_E для S1-AEDANS в присутствии мутантного тропомиозина на $\sim 0.6^\circ$ больше, чем величина Φ_E в контроле (рис. 26, а). При этом доля хаотически ориентированных флуорофоров N , используемая в наших экспериментах в качестве показателя подвижности головок миозина, для S1-AEDANS не показала достоверного отличия в присутствии обоих тропомиозинов (рис. 26, б). Подобный эффект согласуется с увеличением пропорции головок миозина, находящихся в состоянии ригорного связывания с актином, в присутствии исследуемого мутанта тропомиозина. Добавление АДФ кардинально меняет картину предыдущего смоделированного состояния. В присутствии этого нуклеотида и мутанта тропомиозина величина угла Φ_E для S1-AEDANS, связанного с актином, оказалась меньше на $\sim 2.5^\circ$, чем в контроле (т.е. в присутствии ТМ-WT; рис. 26, а); достоверно меньше и количество дезориентированных флуорофоров в присутствии ТМ-Gln147Pro, что свидетельствует о высокой, по сравнению с контролем, организованности головок миозина относительно оси волокна (рис. 26, б). Анализируя эти результаты, можно предположить, что в присутствии ТМ-Gln147Pro и АДФ существует высокая доля головок миозина, находящихся в сильно связанном структурном состоянии с актином, по сравнению с долей S1 в присутствии ТМ-WT.

Моделирование слабого структурного состояния миозиновой головки с актином показывает, что в присутствии АТФ и ТМ-Gln147Pro величина угла Φ_E для S1-AEDANS на актине меньше на $\sim 1.2^\circ$ по сравнению с Φ_E в контроле. Доля дезориентированных флуорофоров при этом достоверно не изменяется (рис. 26, б). Следовательно, пропорция S1, сильно связанных с актином, в присутствии мутантного тропомиозина выше, чем в присутствии тропомиозина дикого типа. Чтобы оценить, каким образом вызываются такие нарушения в позиции головок миозина на актине на различных стадиях цикла гидролиза АТФ, мы изучили позиционирование мутантного тропомиозина на актине и оценили гибкость тяжелой тропомиозина на моделируемых этапах АТФазного цикла.

Итак, в отсутствие головок миозина и нуклеотидов степени поляризации P_{\parallel} и P_{\perp} диполей зонда 5-IAF, связанного с остатками цистеина 36 и 190 мутантного тропомиозина, достоверно меньше, чем в контроле (таблица 7). Скорее всего, позиция тяжелой тропомиозина на актине (называемая «Апо»-состоянием; Li et al., 2011) нарушается в случае возникшей мутации Gln147Pro. Как видно из таблицы 7 при связывании субфрагмента-1 миозина в присутствии или отсутствии нуклеотидов происходят изменения в значениях степеней поляризации, и эти изменения различаются для тропомиозинов дикого типа и с мутацией Gln147Pro во всех смоделированных стадиях АТФазного цикла.

Таблица 7. Показаны значения степеней поляризации ($P_{||}$ и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 5-IAF, специфически связанного с цистеинами 36 и 190 в β -TM (WT/Gln147Pro), в присутствии актина, S1 и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM- Gln147Pro	$P_{ } \pm SEM$	$P_{\perp} \pm SEM$
-	-	+	-	-0.055 ± 0.003	0.221 ± 0.003
-	-	-	+	0.045 ± 0.002	0.103 ± 0.002
-	+	+	-	-0.025 ± 0.003	-0.185 ± 0.002
-	+	-	+	0.030 ± 0.002	0.137 ± 0.003
ADP	+	+	-	0.001 ± 0.002	0.166 ± 0.003
	+	-	+	0.019 ± 0.002	0.122 ± 0.002
AMP-PNP	+	+	-	-0.029 ± 0.002	0.152 ± 0.002
	+	-	+	0.030 ± 0.002	0.077 ± 0.002
ATP	+	+	-	-0.026 ± 0.002	0.137 ± 0.002
	+	-	+	0.057 ± 0.002	0.058 ± 0.002

В отсутствие нуклеотидов и S1 значение скорректированного угла Φ_E для TM-Gln147Pro-AF меньше на $\sim 3.2^0$ от значения Φ_E для TM-WT (рис. 27, а). Такой эффект предполагает наличие доли тяжелой мутантного тропомиозина, расположенных ближе к центру актиновой нити, т.е. в состоянии открытой позиции на актине, характерном в присутствии субфрагмента-1 миозина (Lehman, Craig, 2008).

Связывание субфрагмента-1 уменьшает значение скорректированного угла Φ_E для TM-WT-AF (Rysev et al., 2012; Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2015), характеризуя индуцированный головкой миозина сдвиг тропомиозина в направлении центра тонкой нити – в открытую позицию, открывая еще больше сайтов связывания миозина на актине (McKillop, Geeves, 1993). Результаты наших исследований показывают, что в присутствии S1 тропомиозин с мутацией Gln147Pro сдвигается еще далее, чем TM-WT, в направлении открытой позиции на актине (рис. 27, а). В аденозиндифосфатной среде в присутствии S1 величина угла Φ_E для TM-Gln147Pro-AF сохраняется ниже, чем для TM-WT (на $\sim 1.2^0$). По-видимому, в последнем случае, доля тяжелой мутантного тропомиозина, находящегося в единицу времени в открытом состоянии, выше, чем у TM-WT, что скорее всего и приводит к высокой доле сильно-связанных головок миозина в присутствии мутанта (стадия “ADP” на рис. 27, а).

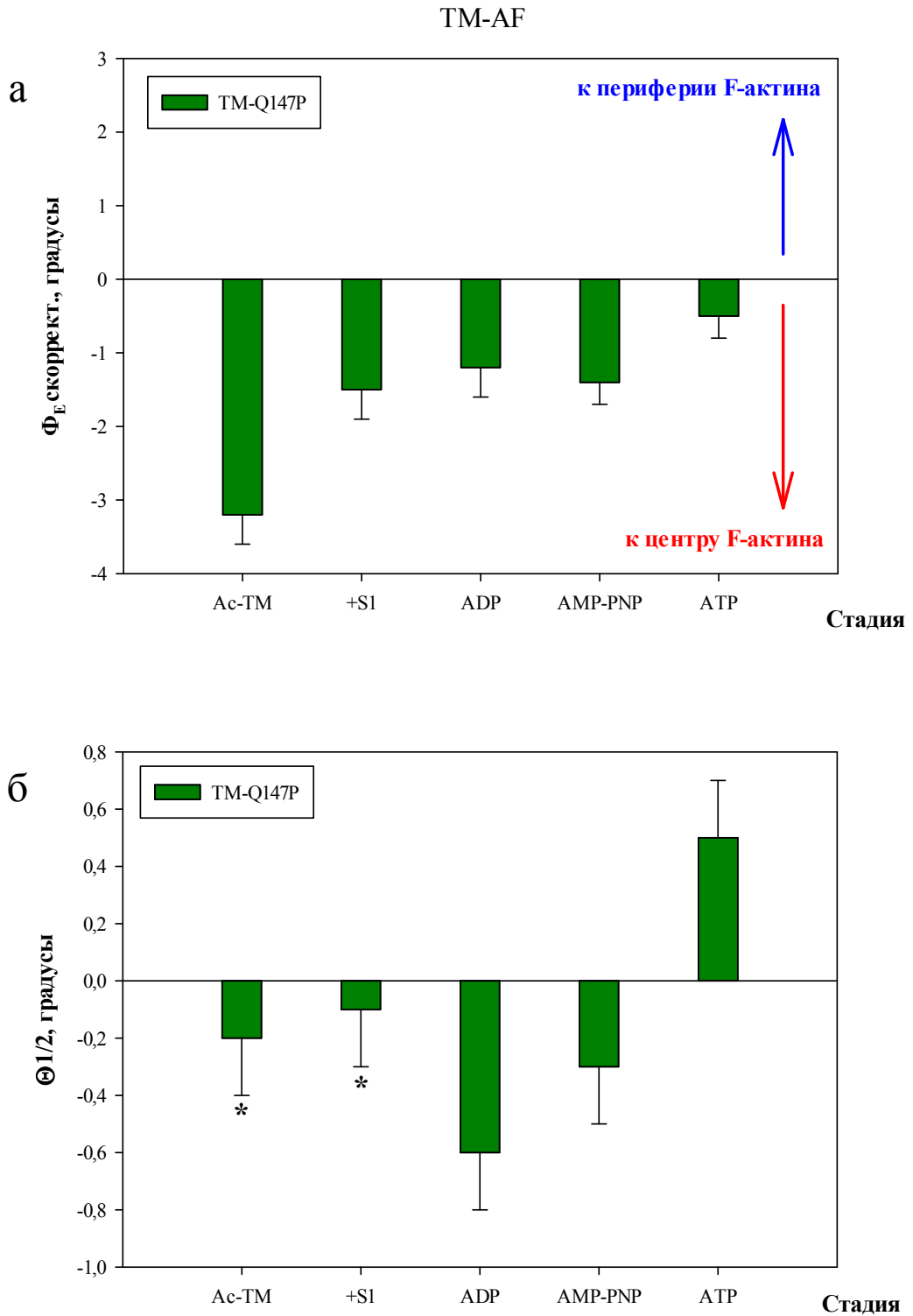


Рисунок 27. Влияние мутации Gln147Pro (Q147P) в β -тропомиозине скелетных мышц на величину скорректированного с движением актин-AEDANS угла Φ_E (**а**) и $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда 5-IAF, специфически связанного с двумя остатками цистеина в тропомиозине, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие движение тропомиозина к периферии (синяя) и к центру (красная) актиновой нити ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

В аденозинтрифосфатной среде в присутствии S1 наблюдается постепенное увеличение угла Φ_E для TM-AF (Rysev et al., 2012; Karpicheva et al., 2013; Borovikov et al., 2015), свидетельствуя о сдвиге тропомиозинового тяжа в направлении к периферии тонкой нити – в закрытую позицию, с закрыванием сайтов сильного связывания миозина с актином. При моделировании состояния слабого связывания тяжи тропомиозина мутацией Gln147Pro полностью не сдвигаются в позицию, характерной для тропомиозина дикого типа, тем самым отображая меньшие значения угла Φ_E , чем в контроле.

При оценке гибкости тяжей мутантного тропомиозина на актине, необходимо отметить, что мутант “вел себя” более жёстко, чем дикий тип, в присутствии S1 и АДФ, и более гибко в присутствии S1 и АТФ (рис. 27, б).

3.2.3 Обсуждение результатов по исследованию β -тропомиозина с мутацией Gln147Pro.

Интересно, что пролин не встречается ни в каком-либо из известных изоформ тропомиозина. На это обстоятельство справедливо акцентировали внимание первооткрыватели мутации (Donner et al., 2002). 147-ая позиция соответствует *g* позиции гептапептидного повтора тропомиозина, входящей в образование солевых мостиков с остатком в *e* позиции соседнего мономера тропомиозина. Пролином богат коллаген, придающий жёсткость клеткам, в которых он изобильно экспрессирован (напр. клетки кости, сухожилия), и этот белок является резервуаром пролина (Phang et al., 2008). Известно, что олигомеры пролина в водной среде образуют левозакрученную спираль (Isemura et al., 1968), тогда как α -спирали тропомиозиновой суперспирали являются правозакрученными (см. обзор Perгу, 2001). К тому же, аминокислотный остаток, предшествующий пролину в белках, главным образом, находится в цис-конфигурации, которая имеет на 8 кДж/моль больше энергии, чем транс-конфигурация (Belitz et al., 2009). Этот факт скорее всего влияет на димеризацию тропомиозина при возникновении мутации Gln147Pro.

Действительно, исследование структуры тропомиозина с мутацией Gln147Pro с использованием программного обеспечения “COILS” показало, что точечная мутация может приводить к нарушению спирали тропомиозина (Lehtokari et al., 2007). Данные по круговому дихроизму не выявили существенного нарушения в α -спиральном содержании мутанта при температуре 20⁰С, тогда как при физиологической температуре 37⁰С нарушения были очевидные (Marttila et al., 2012). Соосаждения с актином показало, что тропомиозин с мутацией Gln147Pro практически не связывается с F-актином (Marttila et al., 2012). Отметим, что величины регистрируемых интенсивностей ($\parallel I_L$, $\parallel I_{\parallel}$, $\perp I_{\parallel}$, $\perp I_L$) зонда 5-IAF, связанного с остатками цистеина в тропомиозине, существенно не отличались среди TM-WT и TM-Gln147Pro. По-видимому, факт

плохого связывания связан с экспериментальными условиями, в которых происходила оценка связывания мутантного тропомиозина с актином. Марттила с сотрудниками оценивали сродство TM-Gln147Pro к актину в растворе, тогда как наши эксперименты проводились в моделях мышечных волокон, которые по биофизическим характеристикам ближе к физиологическим условиям, чем раствор. Наши эксперименты с использованием методов сканирующей микроскопии, ПААГ-электрофореза показали связывание мутанта с актином, хотя и с ослабленным сродством (Karpicheva et al., 2016).

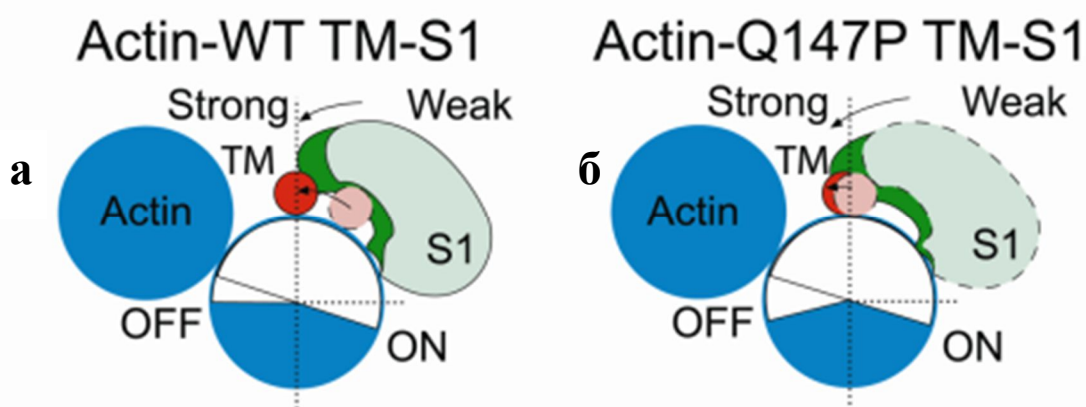


Рисунок 28. Схематическая модель работы актин-тропомиозин-миозинового комплекса в присутствии тропомиозина дикого типа (а) и тропомиозина с мутацией Gln147Pro (Q147P) (б) при моделировании перехода актомиозина от слабой (Weak) к сильной (Strong) форме связывания.

К сожалению, работ по изучению влияния мутации Gln147Pro на подвижность актина, миозина и тропомиозина в цикле работы поперечного мостика выполнено не было. Наши результаты, приведенные в разделах 3.2.1 и 3.2.2 настоящей главы, по исследованию перечисленных свойств актин-тропомиозин-миозиновой системы на стадиях АТФазного цикла в моделях мышечных волокон выявили следующие особенности функционирования этой системы в присутствии тропомиозина с мутацией Gln147Pro:

1. В присутствии TM-Gln147Pro и головок миозина, при моделировании слабого связывания S1 с актином, наблюдается высокая доля выключенных мономеров актина, неспособных активировать АТФазу миозина, чем в тех же экспериментальных условиях в присутствии TM-WT.
2. При моделировании некоторых стадий АТФазного цикла головки миозина в присутствии TM-Gln147Pro обнаружили нарушение способности переходить в слабое связывание с актином, существенное для генерации силы.

3. В течение АТФазного цикла ТМ-Gln147Pro выявил нарушение способности переходить в закрытую позицию на актиновых нитях, способствующую слабому связыванию миозина с актином.

На основании этих выводов можно предложить модель (схематически приведенную на рис. 28) работы актин-тропомиозин-миозиновой системы в присутствии тропомиозина с мутацией Gln147Pro при переходе актин-миозинового комплекса от слабой к сильной форме связывания.

В отличие от остатка Arg91, который так же, как остаток Gln147, вовлечен в образование солевого мостика с остатком из соседней цепи ТМ, мутация в остатке Gln147 выявила молекулярный фенотип с утерей функциональности (loss-of-function; Marttila et al., 2014). Как и в случае с мутацией Arg91Gly при мутации Gln147Pro также происходит нарушение структуры тропомиозина, вызванное разрывом солевого мостика между *e* и *g* позициями, в которых остатки Arg91 и Gln147 соответственно находятся. Предложенная нами модель объясняет, как разрыв солевого мостика и в том, и в другом случае приводит к противоположным фенотипам на молекулярном уровне. Сравнивая модели на рис. 23, б, и 28, б, становится очевидным, что потеря функциональности актин-миозиновой системы при мутации Gln147Pro связана с неспособностью тропомиозина переходить в закрытую позицию, способствующую образованию слабого связывания миозина с актином, и исключением высокой доли актиновых мономеров в F-актине при моделировании слабого состояния. Видимо это обстоятельство может служить одной из причин развития мышечной слабости.

3.3 Исследование α -тропомиозина с мутацией Glu240Lys

3.3.1 Влияние мутации Glu240Lys в α -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле

Мутация Glu240Lys¹¹ в α -ТМ медленных скелетных мышц (продукт гена *TPM3*) была идентифицирована у пациента с ВДТВ (Lawlor et al., 2010). Для исследования влияния этой мутации на актин-миозиновое взаимодействие, а также роли глутамата 240 в структуре тропомиозина нашими коллегами (см. «Материалы и методы») была введена замена 240-ого

¹¹ Здесь необходимо сделать некоторое уточнение. α -Тропомиозины медленных скелетных мышц (продукт гена *TPM3*) и быстрых скелетных мышц (продукт гена *TPM1*) состоят из 284 а.к. остатков (см. Perry, 2001). Мутация Glu240Lys в статье Lawlor et al., 2010 (и в последующих за ней статьях) представлена как Glu241Lys. После трансляции α -ТМ медл. ск. мышц, представленного 285 а.к. остатками, происходит расщепление N-концевого метионина, в результате чего остается белок из 284 а.к. остатков (Pato et al., 1981; Smillie, 1996; UniProtKB - P06753). Поэтому остаток Glu241 у Lawlor et al., 2010 соответствует Glu240 в зрелом α -ТМ медл. ск. мышц.

отрицательно заряженного глутамата на положительно заряженный лизин в наиболее изученный α -ТМ быстрых скелетных мышц (продукт гена *TPM1*). α -Тропомиозины быстрых и медленных скелетных мышц отличаются по 26 аминокислотным остаткам (сравните структуры [P06753](#) и [P09493](#) в базе данных «UniProt»). Можно утверждать, что разница в 26 аминокислот достаточно велика, чтобы вызвать существенное функциональное несоответствие между этими тропомиозинами. С другой стороны, в обеих изоформах последовательности участков, которые несут мутации Glu240Lys и Arg244Gly, являются консервативными. Это предполагает, что независимо от изоформы они являются важными для тропомиозина при выполнении базовых регуляторных функций. Таким образом, можно ожидать аналогичные эффекты мутаций в обеих изоформах тропомиозина. Такие ожидания частично подтверждаются тем фактом, что все исследованные мутации с гипосократительным молекулярным фенотипом, обнаруженные в α -ТМ быстрых скелетных мышц, также вызывают утерю функциональности в присутствии α -ТМ медленных скелетных мышц (Robaszkiewicz et al., 2012, 2015).

Результаты исследования влияния мутации Glu240Lys в α -ТМ быстрых скелетных мышц на степени поляризации зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 374 актина, при моделировании стадий АТФазного цикла представлены в таблице 8. Как видно из таблицы значения степеней поляризации для актин-AEDANS в присутствии ТМ-Glu240Lys и в отсутствие нуклеотидов достоверно не отличаются от значений тех же параметров для актин-AEDANS в присутствии ТМ-WT. Различия становятся достоверными при моделировании сильной и слабой форм связывания миозина с актином. Так, в присутствии АДФ значение P_{\perp} для декорированного актин-AEDANS в присутствии мутанта тропомиозина достоверно меньше значения P_{\perp} для контрольной группы. Такой результат можно интерпретировать как существование доли актиновых мономеров в F-актине, не способных переходить во включенное структурное состояние, характеризующееся величиной перпендикулярно ориентированных зондов с актином. В присутствии АТФ (при моделировании слабого связывания головки миозина с актином) сохраняется низкая по сравнению с контролем доля перпендикулярно ориентированных к оси волокна диполей излучения зонда 1,5-IAEDANS, связанного с актином, в присутствии тропомиозина с мутацией Glu240Lys.

Таблица 8. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного красителя 1,5-IAEDANS, специфически связанного с остатком цистеина 374 актина, в отсутствие или в присутствии S1, TM(WT/ Glu240Lys) и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM- Glu240Lys	$P_{\parallel} \pm SEM$	$P_{\perp} \pm SEM$
-	-	+	-	0.265 ± 0.004	0.183 ± 0.004
-	-	-	+	$*0.265 \pm 0.003$	$*0.189 \pm 0.002$
-	+	+	-	0.198 ± 0.004	0.232 ± 0.004
-	+	-	+	$*0.191 \pm 0.003$	$*0.236 \pm 0.002$
ADP	+	+	-	0.184 ± 0.003	0.242 ± 0.002
	+	-	+	$*0.188 \pm 0.003$	0.232 ± 0.002
AMP-PNP	+	+	-	0.210 ± 0.002	0.214 ± 0.002
	+	-	+	0.215 ± 0.001	0.199 ± 0.003
ATP	+	+	-	0.246 ± 0.003	0.181 ± 0.002
	+	-	+	$*0.249 \pm 0.003$	0.165 ± 0.003

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

Рассмотрим поведение мономеров актина в составе F-актина, а также гибкость последнего, в присутствии мутантного тропомиозина на моделируемых этапах АТФазного цикла, оценивая изменения значений угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для актин-AEDANS (рис. 29, а и б).

В отсутствие головок миозина и нуклеотидов величина угла Φ_E для актин-AEDANS в присутствии тропомиозина с мутацией Glu240Lys (TM- Glu240Lys) на 1.2° больше значения того же угла в присутствии тропомиозина дикого типа (рис. 27, а). В соответствии с ранее опубликованными данными (Borovikov et al., 2004, 2009a, 2015) увеличение угла Φ_E свидетельствует об увеличении доли мономеров актина в составе F-актина, находящихся во включенном структурном состоянии (Gordon et al., 2000).

В присутствии S1 миозина, S1 миозина и нуклеотида АДФ, моделирующих сильное связывание головок миозина с актином, величины угла Φ_E достоверно не отличалась от величин угла Φ_E контрольных экспериментов. Таким образом, в наших экспериментальных условиях достоверного нарушения работы мономеров актина в присутствии TM- Glu240Lys на моделируемых этапах сильного актин-миозинового связывания обнаружено не было. В присутствии аналога АТФ – AMP-PNP наблюдается похожая картина в сравнении значений угла Φ_E комплекса Ac-AEDANS-TM-Glu240Lys-S1 с контрольным значением (Ac-AEDANS-TM-WT-S1).

Актин-АЕDANS

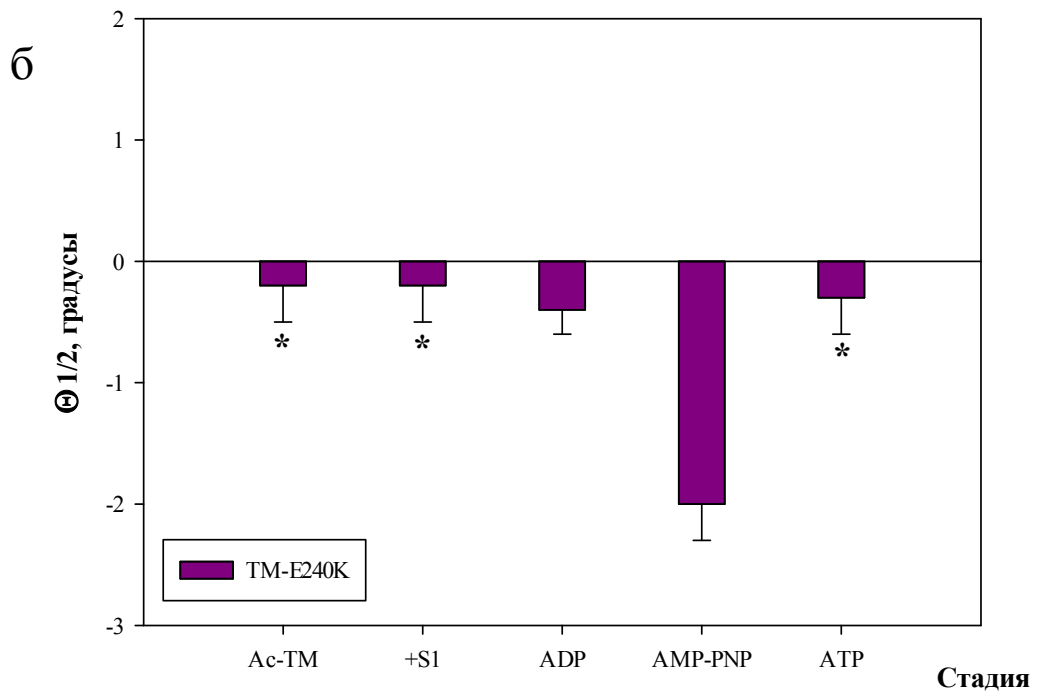
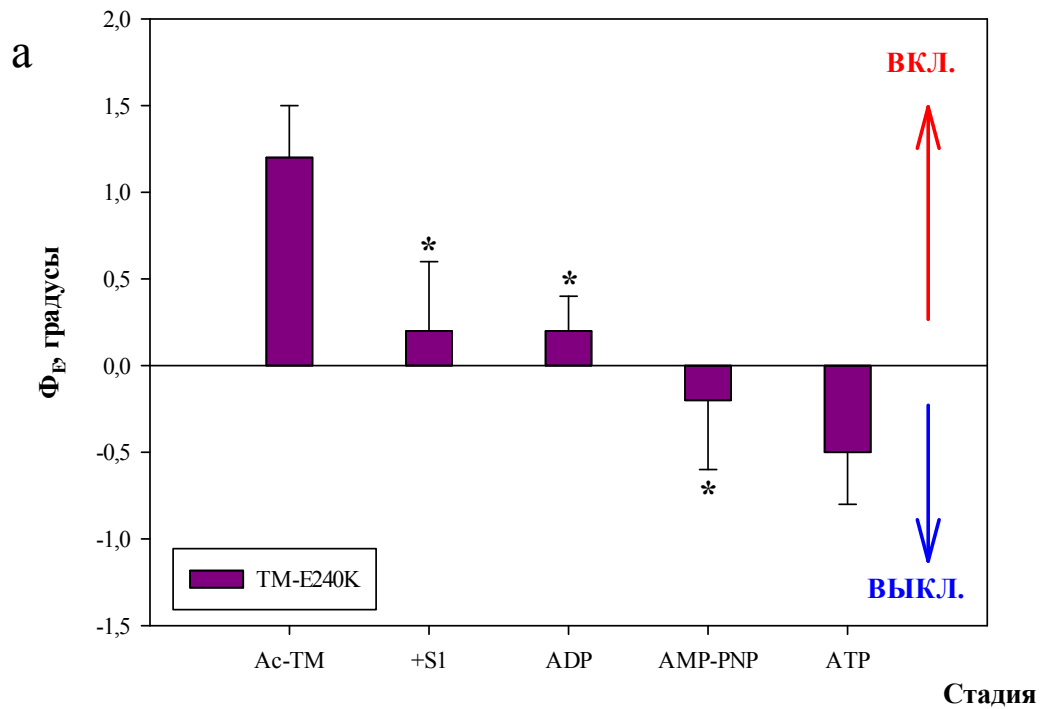


Рисунок 29. Влияние мутации Glu240Lys (E240K) в α -тропомиозине на величины угла Φ_E (**а**) и показателя гибкости $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 374 субдомена 1 актина, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для актина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие включение (красная) и выключение (синяя) доли актиновых мономеров в F-актине ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Однако, в присутствии аналога АТФ, наблюдается увеличение жёсткости (уменьшение гибкости) актиновой нити в присутствии мутанта тропомиозина по сравнению с жёсткостью актиновой нити в контроле (рис. 29, б). В присутствии АТФ, моделирующего слабое связывание миозина с актином, значение угла Φ_E для актин-AEDANS в присутствии мутанта меньше на полградуса, по сравнению с контролем. Этот результат коррелирует с увеличением доли выключенных мономеров актина в присутствии мутанта (Borovikov et al., 2015; Rysev et al., 2012, Karpicheva et al., 2013, 2014).

Относительно оценки гибкости актиновой нити в присутствии мутанта тропомиозина необходимо отметить, что явных изменений в гибкости нити не наблюдалось. Скорее всего, мутация существенно не влияет на гибкость актиновых филаментов.

3.3.2 Влияние мутации Glu240Lys в α -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле

Исследование эффекта мутации Glu240Lys в α -ТМ на поведение головок миозина на моделируемых стадиях АТФазного цикла выявило определённые различия работы S1 в присутствии этого мутанта, чем в присутствии тропомиозина дикого типа. Эти различия проявлялись изменениями параметров поляризации флуоресценции. Детально рассмотрим эти изменения, чтобы глубже оценить механизм, в основе которого лежит функционирование актин-миозиновой системы в присутствии ТМ-Glu240Lys.

Итак, в отсутствие тропомиозина и нуклеотидов головки миозина организуются параллельно оси мышечного волокна, что отображается высокой степенью поляризации диполей излучения зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 конвертерного участка головки миозина, параллельно к оси волокна (таблица 9). Присоединение тропомиозина дикого типа с актином достоверно увеличивает значение $P_{||}$, предполагая увеличение доли S1-AEDANS, организованных вдоль нити актина. Связывание мутантного тропомиозина (ТМ-Glu240Lys) с актином еще больше увеличивает долю S1-AEDANS, организованных параллельно актиновой нити, по сравнению с контролем.

Таблица 9. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, на актине в отсутствие и в присутствии ТМ(WT/Glu240Lys) и нуклеотидов.

Нуклеотид	ТМ-WT	ТМ- Glu240Lys	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	-	0.394 ± 0.001	-0.043 ± 0.004
-	+	-	0.400 ± 0.002	-0.038 ± 0.004
-	-	+	0.408 ± 0.001	-0.029 ± 0.002
ADP	+	-	0.417 ± 0.004	-0.002 ± 0.004
	-	+	0.427 ± 0.001	-0.016 ± 0.005
AMP-PNP	+	-	0.395 ± 0.004	0.049 ± 0.005
	-	+	$*0.396 \pm 0.005$	0.033 ± 0.005
АТР	+	-	0.375 ± 0.006	0.128 ± 0.006
	-	+	0.414 ± 0.006	0.013 ± 0.006

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

Добавление аденозиндифосфата к комплексам актин-ТМ-WT-S1-AEDANS и актин-ТМ-Glu240Lys-S1-AEDANS в теновом мышечном волокне индуцирует увеличение доли параллельно ориентированных к оси волокна головок миозина, причем эта доля в комплексе актин-ТМ-Glu240Lys-S1-AEDANS достоверно выше, чем в актин-ТМ-WT-S1-AEDANS. В присутствии AMP-PNP достоверных различий в доле параллельно ориентированных диполей S1-AEDANS в контроле и в присутствии исследуемого мутанта не обнаруживается; обнаруживаются отличия исключительно в доле флуорофоров, ориентированных перпендикулярно к оси мышечного волокна – в присутствии мутанта их доля ниже, чем в присутствии ТМ-WT. При моделировании слабой формы связывания миозиновой головки с актином (“АТР” в таблице 9) значения P_{\parallel} и P_{\perp} для S1-AEDANS в присутствии ТМ-Glu240Lys соответственно больше и меньше значений P_{\parallel} и P_{\perp} контрольного эксперимента. Эти несоответствия в степенях поляризации S1-AEDANS в присутствии тропомиозинов дикого типа и с мутацией Glu240Lys свидетельствуют о нарушении взаимодействия этой сложной актин-миозин-тропомиозиновой системы.

Для исследования молекулярных механизмов нарушения работы миозиновой головки в присутствии мутантного тропомиозина, сравним изменения в значениях угла Φ_E и количестве хаотически ориентированных флуорофоров N для S1-AEDANS на актине в присутствии мутанта и в присутствии тропомиозина дикого типа.

S1-AEDANS

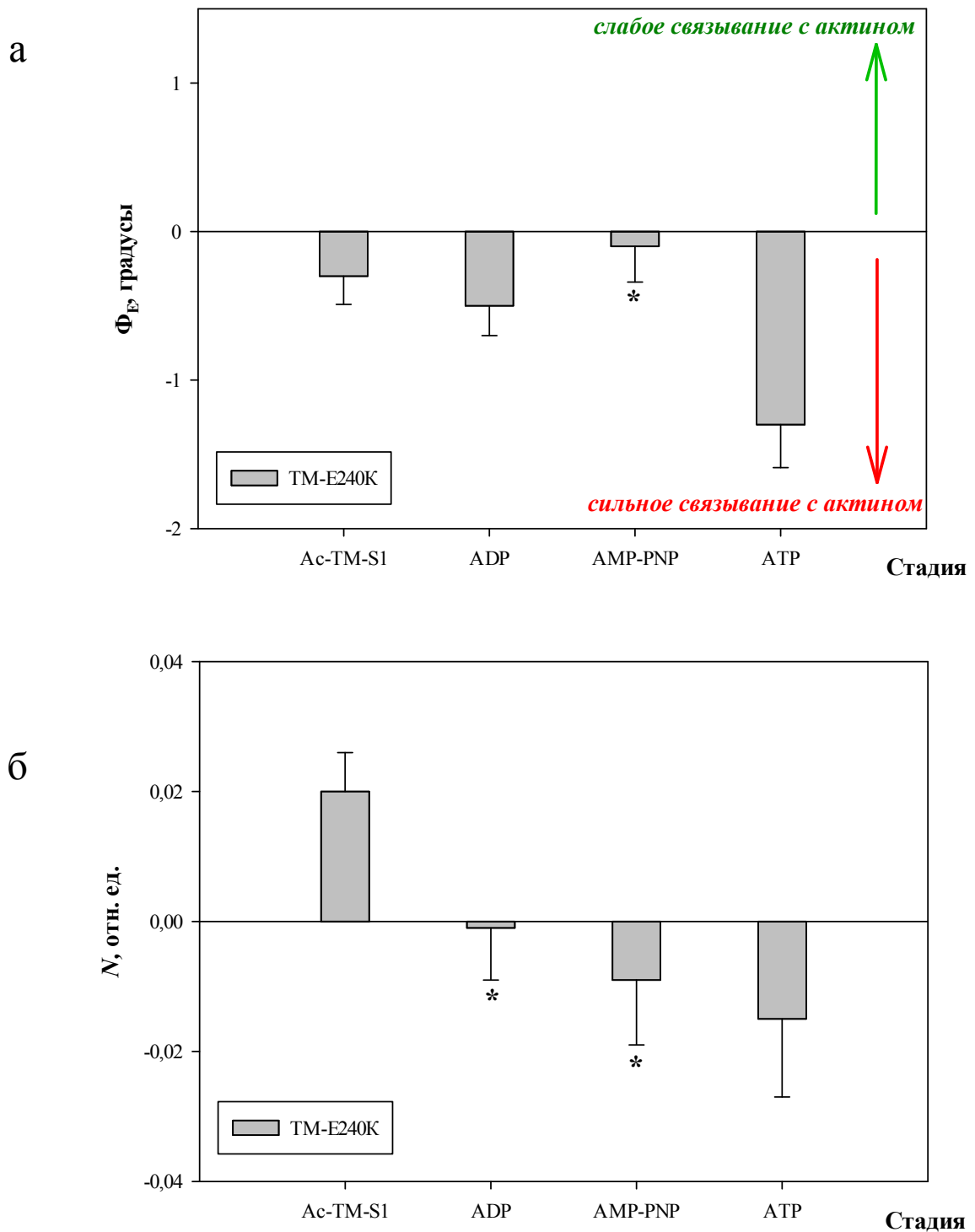


Рисунок 30. Влияние мутации Glu240Lys (E240K) в α -тропомиозине скелетных мышц на величину угла Φ_E (**а**) и показатель подвижности N (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и N для головки миозина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие изменения доли сильно (красная) и слабо (зеленая) связанных головок миозина с актином ($P < 0.05$). Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

В отсутствие нуклеотидов величина угла Φ_E для S1-AEDANS, связанных с комплексом актин-ТМ-Glu240Lys, достоверно меньше (на 0.3^0) величины Φ_E для контрольных экспериментов (рис. 30, а). В соответствии с вышеизложенной интерпретацией результатов при исследовании других мутаций такой эффект свидетельствует о более высокой доле головок миозина, сильно связанных с мономерами актина, в присутствии ТМ-Glu240Lys, чем в контроле, что также согласуется с более высокой долей параллельно ориентированных к оси волокна флуорофоров S1-AEDANS (таблица 9). В аденозиндифосфатной среде доля головок миозина, находящихся в сильно связанном с актином состоянии, оказалась достоверно больше в присутствии ТМ-Glu240Lys, чем в присутствии ТМ-WT. В этом состоянии в присутствии ТМ-Glu240Lys наблюдалось статистически достоверное увеличение, относительно контроля, доли сильно связанных головок миозина с актином (рис. 30, а). При моделировании слабой формы связывания миозиновой головки с актином обнаруживается более высокая, чем в контроле, доля сильно связанных головок миозина с актином, характеризующаяся значением угла Φ_E для S1-AEDANS в присутствии ТМ-Glu240Lys на 1.3^0 меньшим, чем в присутствии ТМ-WT.

Таблица 10. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 5-IAF, специфически связанного с цистеинами 36 и 190 в β -ТМ (WT/Glu240Lys), в присутствии актина, S1 и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	ТМ-WT	ТМ-Glu240Lys	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	+	-	0.130 ± 0.001	0.206 ± 0.002
-	-	-	+	0.107 ± 0.001	* 0.202 ± 0.002
-	+	+	-	0.104 ± 0.002	0.198 ± 0.001
-	+	-	+	0.093 ± 0.001	0.195 ± 0.001
ADP	+	+	-	0.095 ± 0.001	0.159 ± 0.001
	+	-	+	* 0.094 ± 0.001	0.162 ± 0.001
AMP-PNP	+	+	-	0.099 ± 0.002	0.140 ± 0.001
	+	-	+	* 0.099 ± 0.001	* 0.142 ± 0.001
ATP	+	+	-	0.118 ± 0.003	0.200 ± 0.002
	+	-	+	0.098 ± 0.003	0.226 ± 0.003

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

В отсутствие S1 и нуклеотидов значение P_{\parallel} для ТМ-Glu240Lys-AF достоверно меньше значения P_{\parallel} для ТМ-WT-AF на актине. Присоединение S1 к актину уменьшает долю флуорофоров, параллельных и перпендикулярных к оси волокна; причем для ТМ-Glu240Lys-AF эта доля ниже, чем для ТМ-WT-AF. В присутствии нуклеотидов АДФ и АМР-РНР не выявилось заметной разницы в степенях поляризации P_{\parallel} и P_{\perp} между ТМ-Glu240Lys-AF и ТМ-WT-AF.

Разница между степенями поляризаций этих двух комплексов становится заметной в присутствии АТФ. В присутствии АТФ значения P_{\parallel} и P_{\perp} для ТМ-WT-AF достоверно меньше и больше, соответственно, значений P_{\parallel} и P_{\perp} для ТМ-Glu240Lys-AF. Итак, сравнивая степени поляризации в таблице 10, можно заключить, что мутация Glu240Lys влияет на расположение тропомиозина в наших экспериментальных условиях. Рассмотрим изменения позиции мутанта тропомиозина и оценим гибкость его тяжей на актине на различных стадиях АТФазного цикла.

Оценка подвижности головок миозина в присутствии мутантного тропомиозина на моделируемых стадиях АТФазного цикла выявила достоверные отличия от N для S1 в присутствии ТМ-WT только в двух состояниях: в отсутствие нуклеотидов и в присутствии АТФ (рис. 30, б). Так, в отсутствие нуклеотидов или в присутствии АТФ подвижность головок миозина на актине в присутствии мутанта тропомиозина была достоверно выше или ниже, соответственно, чем в присутствии ТМ-WT. Обобщая результаты по исследованию поведения миозиновых головок в присутствии ТМ-Glu240Lys, можно отметить высокую долю миозиновых головок, сильно связанных с актином, при моделировании различных стадий АТФазного цикла.

Для получения объемлющей картины нарушения актин-миозинового взаимодействия, вызванного мутантным тропомиозином, оценим влияние мутации Glu240Lys на позицию и гибкость тропомиозиновых тяжей на моделируемых этапах цикла гидролиза АТФ, оценивая параметры поляризованной флуоресценции – степени поляризации P_{\parallel} и P_{\perp} , значения угла Φ_E и показатель гибкости $\theta_{1/2}$ – зонда 5-IAF, специфически связанного с остатком цистеина 190 тропомиозина.

Степени поляризации диполей излучения зонда 5-IAF, ковалентно связанного с остатками цистеина 190 тропомиозина дикого типа и с мутацией Glu240Lys, параллельно и перпендикулярно к оси теневого мышечного волокна на различных стадиях цикла гидролиза АТФ представлены в таблице 10.

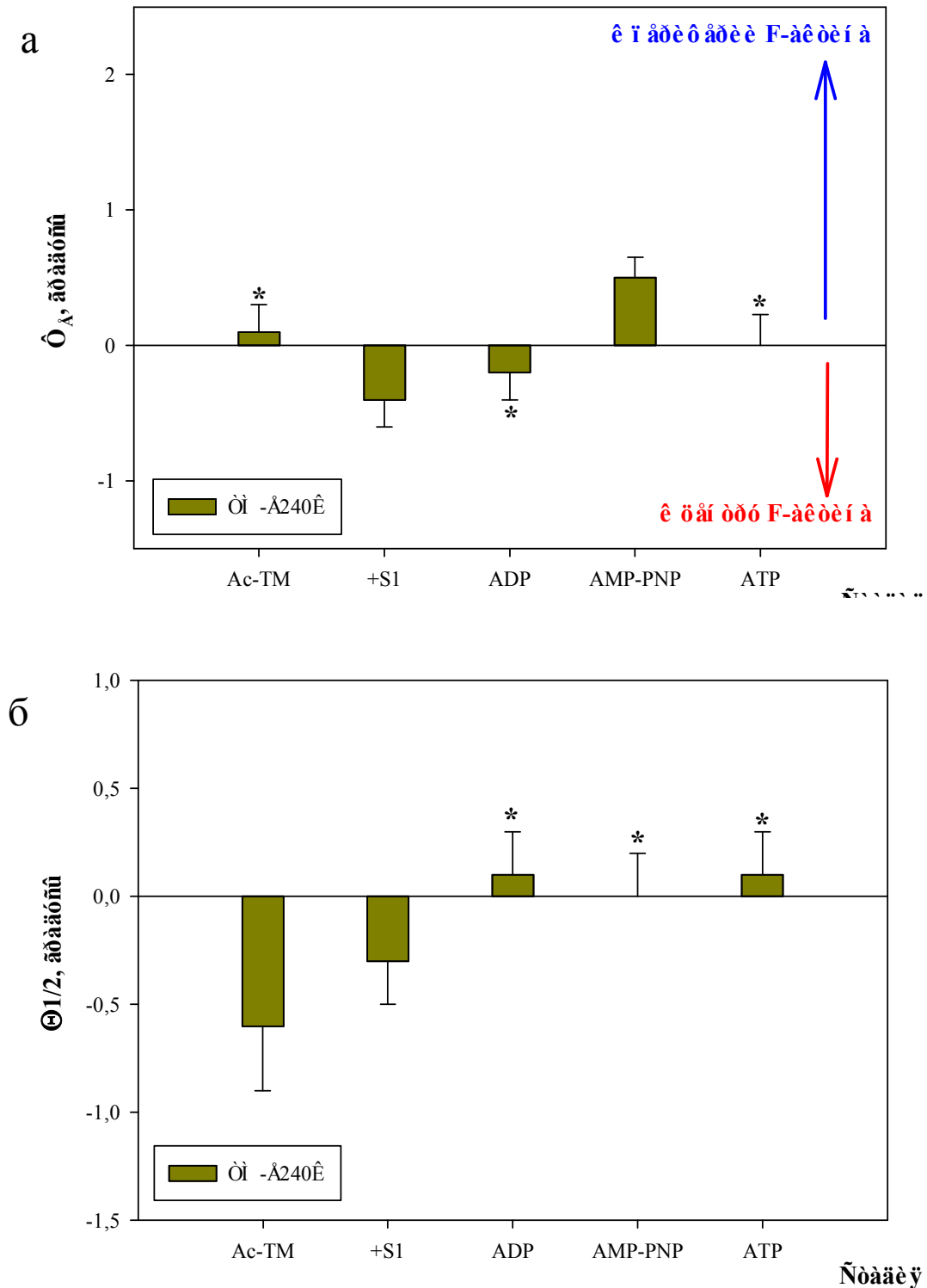


Рисунок 31. Влияние мутации Glu240Lys (E240K) в α -тропомиозине скелетных мышц на величину скорректированного с движением актин-AEDANS угла Φ_E (**а**) и $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда 5-IAF, специфически связанного с двумя остатками цистеина в тропомиозине, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие движение тропомиозина к периферии (синяя) и к центру (красная) актиновой нити ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

В отсутствие субфрагмента-1 миозина и нуклеотидов значение скорректированного угла Φ_E для TM-Glu240Lys-AF достоверно не отличается от значения Φ_E для TM-WT-AF (рис. 31, а). Однако при этом наблюдается более высокая, чем у TM-WT, жёсткость мутантного тропомиозина (рис. 31, б). Связывание S1 с актином, приводящее к миозин-индуцированному сдвигу тяжей тропомиозина в направлении центра тонкой нити (McKillop, Geeves, 1993), сопровождается уменьшением угла Φ_E для TM-AF дикого типа (Borovikov et al., 2009a). Связывание миозиновой головки в присутствии мутанта тропомиозина показало, что значение угла Φ_E для TM уменьшается на полградуса больше, чем в контроле (“+S1” на рис. 31, а) и сохраняется более высокая жёсткость тропомиозиновых тяжей с мутацией Glu240Lys на актине (рис. 31, б). При моделировании стадии перехода от слабой к сильной форме актин-миозинового связывания (AMP-PNP) наблюдалось большее значение угла Φ_E для мутантного тропомиозина по сравнению с тропомиозином дикого типа. Такой эффект коррелирует со сдвигом тропомиозинового тяжа в направлении к периферии актина – в направлении закрытой позиции TM на F-актине (Borovikov et al., 2009a; Karpicheva et al., 2013, 2014; Rysev et al., 2014). При этом жёсткость TM-Glu240Lys-AF на актине достоверно не отличается от жёсткости TM-WT-AF (рис. 31, б). В присутствии АТФ, с использованием которого моделировали слабое актин-миозиновое взаимодействие, достоверных отличий в значениях угла Φ_E для тропомиозинов дикого типа и с заменой Glu240Lys обнаружено не было.

Обобщая полученные результаты по позиционированию TM-Glu240Lys на актине в отсутствие или в присутствии S1 и нуклеотидов, можно сделать предположение, что при переходе актомиозина от слабой к сильной форме связывания происходит сдвиг мутантного тропомиозина с закрытой позиции в более открытую позицию на актине.

3.3.3 Обсуждение результатов по исследованию α -тропомиозина с мутацией Glu240Lys

α -Тропомиозин наиболее распространённая изоформа в сердечной и скелетной мышцах, нежели β -тропомиозин. Остаток Glu240 локализован в с позиции гептады в 7-ом актин-связывающем псевдоповторе тропомиозина. Непосредственного взаимодействия этого остатка с остатками актина выявлено не было (Li et al., 2011; Behrmann et al., 2012). Однако замена отрицательно заряжённого остатка глутамата на положительный лизин, как показывают наши эксперименты, влияет на характер взаимодействия тропомиозина и миозина с актином. Согласно трёхмерной модели α -TM быстрых скелетных мышц (Whitby, Phillips, 2000) остаток Glu240 располагается вблизи остатка Arg244, показавшим взаимодействие с аспаратом 25 актина (Li et al., 2011; рис. 32).

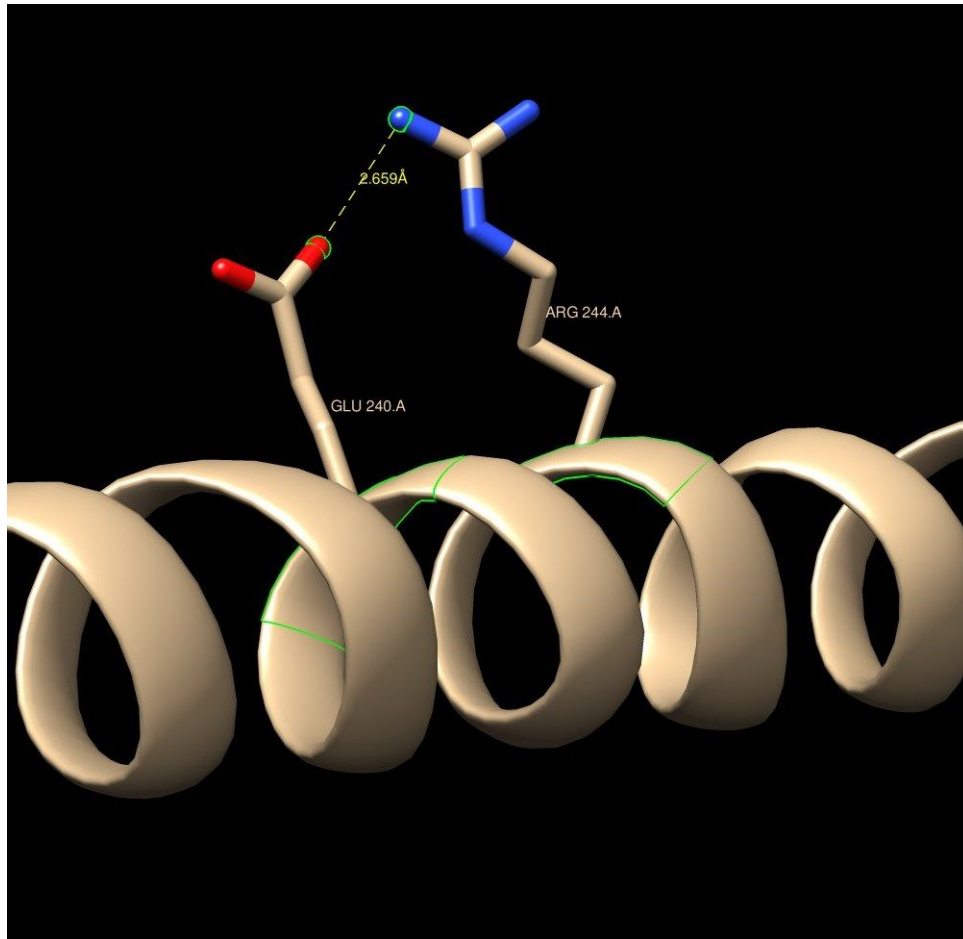


Рисунок 32. Показаны позиции остатков Glu240 (E240) и Arg244 (R244) в α -ТМ быстрых скелетных мышцы человека на основании трёхмерной модели тропомиозина (Whitby, Phillips, 2000). Изображение сгенерировано с помощью программы «Chimera» /Химера/, версия 1.10.1. Пунктирной линией обозначено расстояние между гидроксильной группой (ОН) глутамата и аминогруппой (NH₂) аргинина.

Между двумя положительными зарядами (Lys240 и Arg244) на таком близком расстоянии (рис. 32) могут возникать силы электростатического отталкивания, что может внести вклад во взаимодействие аргинина 244 с аспаратом 25 актина. Таким образом, эффект мутации Glu240Lys может быть опосредован воздействием на взаимодействие аргинина с аспаратом. Действительно, как мы увидим ниже, эффекты мутации Arg244Gly на актин-миозиновое взаимодействие и на позиционирование тропомиозина в АТФазном цикле очень похожи на эффекты, вызываемые мутацией Glu240Lys.

Исследование влияния мутации Glu240Lys в α -ТМ быстрых скелетных мышц на характер актин-миозинового взаимодействия и на позицию и гибкость тропомиозина на актине показало, что:

1. Связывание ТМ-Glu240Lys с актином приводит к включению высокой доли актиновых мономеров, по сравнению с тропомиозином дикого типа. В слабой форме связывания головки миозина с актином – в присутствии АТФ и ТМ-Glu240Lys –

наблюдается высокая доля выключенных мономеров актина, неспособных активировать АТФазу миозина.

2. При имитации стадий АТФазного цикла наблюдается высокая, по сравнению с контрольными экспериментами, доля головок миозина, находящихся в состоянии сильного связывания с актином в присутствии ТМ-Glu240Lys.

3. При моделировании сильной формы связывания S1 с актином ТМ-Glu240Lys располагается ближе к центру актиновой нити.

Как уже отмечалось, выделяют 3 позиции тропомиозинового тяжа на актине – блокирующую, закрытую и открытую позиции. Тропомиозин, связанный с актином, в отсутствие тропонина и S1 находится в позиции, близкой к закрытой. Такое состояние тропомиозина на актине было названо «Апо»-состоянием (Li et al., 2011). В таком состоянии тропомиозин не закрывает долю сайтов связывания миозина на актине, в связи с чем поперечный мостик может взаимодействовать с актиновой нитью.

Полученные по исследованию мутации Glu240Lys в тропомиозине результаты наших экспериментов выявили негативные воздействия мутации, преимущественно, при моделировании сильной формы актин-миозинового связывания. Одна из проблем интерпретации полученных результатов заключается в том, что при моделировании слабой формы связывания наблюдается увеличение доли сильно связанных головок миозина с актином, хотя достоверных отличий позиции мутантного тропомиозина от позиции ТМ дикого типа не было выявлено. Недавно, с использованием методов электронной микроскопии и молекулярного моделирования актин-тропомиозин-миозинового комплекса было сделано предположение, согласно которому тропомиозин, непосредственно взаимодействуя с миозином в закрытой позиции, способствует связыванию S1 с актином (Behrmann et al., 2012). Придерживаясь таких представлений, можно предположить, что позиция, в которой тропомиозин с мутацией Glu240Lys локализуется при моделировании слабого связывания миозина с актином, может способствовать сильному связыванию миозиновых головок с актином, нехарактерному для данного состояния. Большая доля сильно связанных головок миозина с актином, неспособных переходить в слабую форму связывания с актином, по-видимому, являются причиной гипосократительного молекулярного фенотипа (Ottenheijm et al., 2011), наблюдаемого при развитии мышечной слабости у больных ВДТВ при мутации Glu240Lys в α -ТМ медленных скелетных мышц (Lawlor et al., 2010).

3.4 Исследование α -тропомиозина с мутацией Arg244Gly

3.4.1 Влияние мутации Arg244Gly в α -тропомиозине на пространственную организацию и гибкость актина в АТФазном цикле

Чтобы проверить предположение, сделанное при исследовании мутации Glu240Lys, об опосредованном воздействии этой мутации в тропомиозине на взаимодействие аргинина 244 тропомиозина с аспаратом 25 актина, мы оценили эффект мутации Arg244Gly в α -тропомиозине быстрых скелетных мышц на подвижность актиновых мономеров и гибкость актиновых нитей, на позицию и подвижность головок миозина, и на позицию и гибкость мутантного тропомиозина в цикле гидролиза АТФ. В настоящем разделе рассмотрим влияние мутации Arg244Gly на подвижность и гибкость актина, специфически модифицированного по остатку цистеина 374 на С-конце актина зондом 1,5-IAEDANS.

В отсутствие головок миозина и нуклеотидов значения степеней поляризации для актин-AEDANS в присутствии мутантного Arg244Gly-тропомиозина или тропомиозина дикого типа достоверно не различались (таблица 11).

Таблица 11. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного красителя 1,5-IAEDANS, специфически связанного с остатком цистеина 374 актина, в отсутствие или в присутствии S1, TM(WT/Arg244Gly) и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM-Arg244Gly	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	+	-	0.265 ± 0.004	0.183 ± 0.004
-	-	-	+	$*0.267 \pm 0.002$	$*0.179 \pm 0.004$
-	+	+	-	0.198 ± 0.004	0.232 ± 0.004
-	+	-	+	0.169 ± 0.002	$*0.238 \pm 0.002$
ADP	+	+	-	0.184 ± 0.003	0.242 ± 0.002
	+	-	+	0.157 ± 0.003	$*0.243 \pm 0.003$
AMP-PNP	+	+	-	0.210 ± 0.002	0.214 ± 0.002
	+	-	+	0.195 ± 0.002	$*0.216 \pm 0.003$
ATP	+	+	-	0.246 ± 0.003	0.181 ± 0.002
	+	-	+	$*0.244 \pm 0.003$	$*0.178 \pm 0.003$

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

Связывание S1 миозина с актин-AEDANS в присутствии тропомиозина (Arg244Gly/WT) увеличивает долю перпендикулярно ориентированных к оси мышечного волокна флуорофоров и уменьшает долю параллельно ориентированных. Однако, в присутствии TM-Arg244Gly при связывании S1 с актин-AEDANS, доля параллельно ориентированных флуорофоров достоверно меньше, чем в присутствии TM-WT (таблица 11). По-видимому, мутация непосредственно или

опосредованно влияет на конформационные переходы доли мономеров актина в ответ на связывание головки миозина. Низкое по сравнению с контролем значение P_{\parallel} для актин-AEDANS в присутствии мутанта тропомиозина сохраняется и при моделировании сильной формы связывания (состояние “ADP” в таблице 11) и в присутствии AMP-PNP. Добавление АТФ не выявило достоверных различий в значениях P_{\parallel} и P_{\perp} для актин-AEDANS в присутствии TM-Arg244Gly и TM-WT и S1.

Рассмотрим влияние тропомиозина с мутацией Arg244Gly на позицию и гибкость актина в АТФазном цикле, оценивая изменения значений угла Φ_E и показателя гибкости $\theta_{1/2}$. Связывание α -тропомиозина дикого типа с актин-AEDANS приводит к достоверному уменьшению угла Φ_E и уменьшению гибкости актиновой нити ($\theta_{1/2}$). Такой эффект, как отмечалось выше, коррелирует с уменьшением относительного количества включённых мономеров актина в составе F-актина и переходом мономеров актина в выключенное структурное состояние (Borovikov et al., 2009a). В отличие от тропомиозина дикого типа, мутантный тропомиозин не вызывал уменьшения угла Φ_E для Ак-AEDANS, по-видимому нарушая переход доли мономеров актина в F-актине из включённого в выключенное структурное состояние, что отображается более высоким по сравнению с контролем значением угла Φ_E на рис. 33, а. Примечательно, что ровно на такую же величину (на 1.2°) было больше значение угла Φ_E для актин-AEDANS в присутствии TM-Glu240Lys и в отсутствие нуклеотидов и S1 (ср. с рис. 29, а). Следовательно, тропомиозин дикого типа уменьшает относительное количество включённых мономеров актина в актиновых нитях, приводя к ингибированию формирования сильной формы связывания головки миозина с F-актином (Gordon et al., 2000), тогда как мутантные тропомиозины (Glu240Lys и Arg244Gly) заметно утрачивают такую способность.

При связывании субфрагмента-1 миозина с актин-AEDANS статистически достоверных отличий в значениях угла Φ_E в присутствии TM-Arg244Gly и TM-WT не наблюдалось (рис. 33, а). При моделировании сильного связывания S1 с актином, в присутствии нуклеотида АДФ, величина Φ_E для актин-AEDANS в присутствии TM-Arg244Gly оказалась достоверно больше (на 0.8°) значения Φ_E для актин-AEDANS в присутствии TM-WT.

Актин-АЕDANS

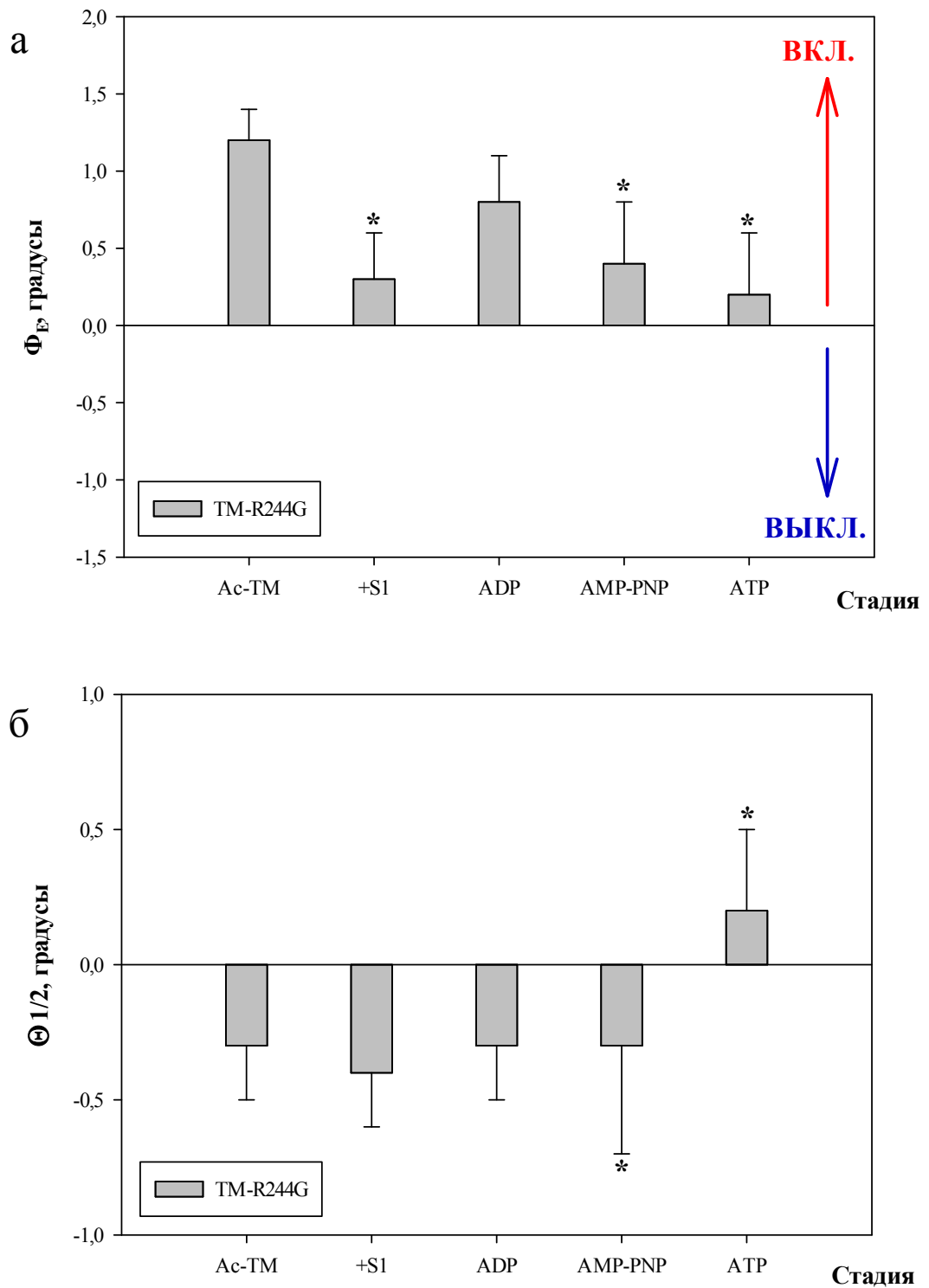


Рисунок 33. Влияние мутации Arg244Gly (R244G) в α -тропомиозине на величины угла Φ_E (**а**) и показателя гибкости $\theta_{1/2}$ (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 374 субдомена 1 актина, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для актина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие включение (красная) и выключение (синяя) доли актиновых мономеров в F-актине ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Такой эффект коррелирует с увеличением доли включённых мономеров актина в присутствии мутанта по сравнению с контрольным экспериментом. При моделировании слабого и промежуточного структурных состояний актин-миозинового связывания достоверных отличий в значениях угла Φ_E для актин-AEDANS в присутствии тропомиозина дикого типа и с мутацией Arg244Gly не наблюдалось.

Оценка гибкости актиновых нитей в присутствии мутанта тропомиозина показала, что нити актина в присутствии TM-Arg244Gly были жёстче, чем в контрольных экспериментах, на стадиях сильного актин-миозинового связывания (“+S1” и “ADP” на рис. 33, б) и в отсутствие головок миозина и нуклеотидов (“Ac-TM” на рис. 33, б), тогда как на стадиях слабого и промежуточного связывания достоверно не отличались от значений $\theta_{1/2}$ контрольных экспериментов.

В целом, можно заключить, что эффект мутации Arg244Gly в тропомиозине на движение актина в АТФазном цикле выявил сходство с эффектом мутации Glu240Lys.

3.4.2 Влияние мутации Arg244Gly в α -тропомиозине на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле

Влияние мутации Arg244Gly в α -TM на значения степеней поляризации P_{\parallel} и P_{\perp} связанного с актином S1-AEDANS представлено в таблице 12. В качестве контроля приведены те же значения для актин-S1-AEDANS в присутствии TM-WT.

В отсутствие нуклеотидов значение P_{\perp} для S1-AEDANS на актине по модулю достоверно меньше того же значения для S1-AEDANS в контрольном эксперименте. Добавление АДФ приводит к увеличению значений степени поляризации P_{\parallel} для S1-AEDANS, при этом в присутствии TM-Arg244Gly значение P_{\parallel} достоверно больше, чем в присутствии TM-WT. Значение P_{\perp} для S1-AEDANS в присутствии TM-Arg244Gly достоверно не изменяется относительно предшествующего состояния (т.е. в отсутствие АДФ). В присутствии AMP-PNP наблюдается достоверная разница среди значений степеней поляризации для S1-AEDANS в присутствии TM-WT и TM-Arg244Gly. При слабом связывании S1-AEDANS с актином значение степени поляризации в присутствии мутанта P_{\parallel} достоверно не отличалось от контрольного значения, тогда как P_{\perp} в присутствии мутанта было меньше. Такие эффекты свидетельствуют о том, что конформационные изменения в исследуемых белках – актине, головке миозина и тропомиозине, происходящие при возникновении мутации Arg244Gly в тропомиозине, носят по сравнению с нормой иной характер.

Таблица 12. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, на актине в отсутствие и в присутствии ТМ(WT/Arg244Gly) и нуклеотидов.

Нуклеотид	ТМ-WT	ТМ-Arg244Gly	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	-	0.394 ± 0.001	-0.043 ± 0.004
-	+	-	0.400 ± 0.002	-0.038 ± 0.004
-	-	+	$*0.404 \pm 0.002$	-0.018 ± 0.004
ADP	+	-	0.417 ± 0.004	-0.002 ± 0.004
	-	+	0.435 ± 0.002	-0.035 ± 0.004
AMP-PNP	+	-	0.395 ± 0.004	0.049 ± 0.005
	-	+	0.414 ± 0.004	0.013 ± 0.004
ATP	+	-	0.375 ± 0.006	0.128 ± 0.006
	-	+	$*0.383 \pm 0.005$	0.114 ± 0.004

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

Для исследования этих эффектов сравним изменения значения угла Φ_E для S1-AEDANS в присутствии мутантного тропомиозина и тропомиозина дикого типа при моделировании АТФазного цикла.

Так, в отсутствие нуклеотидов и в присутствии ТМ-Arg244Gly значение угла Φ_E для S1-AEDANS на актине достоверно не отличалась от значения Φ_E в присутствии ТМ-WT (рис. 34, а), однако головки миозина в присутствии мутанта выявили высокую, чем в контроле, подвижность (рис. 34, б). Добавление аденозиндифосфата приводит к уменьшению значения угла Φ_E для S1-AEDANS в присутствии ТМ дикого типа (Karpicheva et al., 2014). В случае с ТМ-Arg244Gly уменьшение угла Φ_E составило на 0.9° больше, чем в контроле (столбец “ADP” на рис. 34, а). В соответствии с ранее опубликованными данными (Borovikov et al., 2009a, 2015; Karpicheva et al., 2014) уменьшение угла Φ_E для S1-AEDANS согласуется с вращением SH1 спирали моторного домена миозиновой головки и увеличением доли головок миозина, образующих с актином сильную форму связывания. Негидролизуемый AMP-PNP, добавленный к комплексу актин-тропомиозин-S1, увеличивает значение угла Φ_E для S1-AEDANS (Karpicheva et al., 2014).

S1-AEDANS

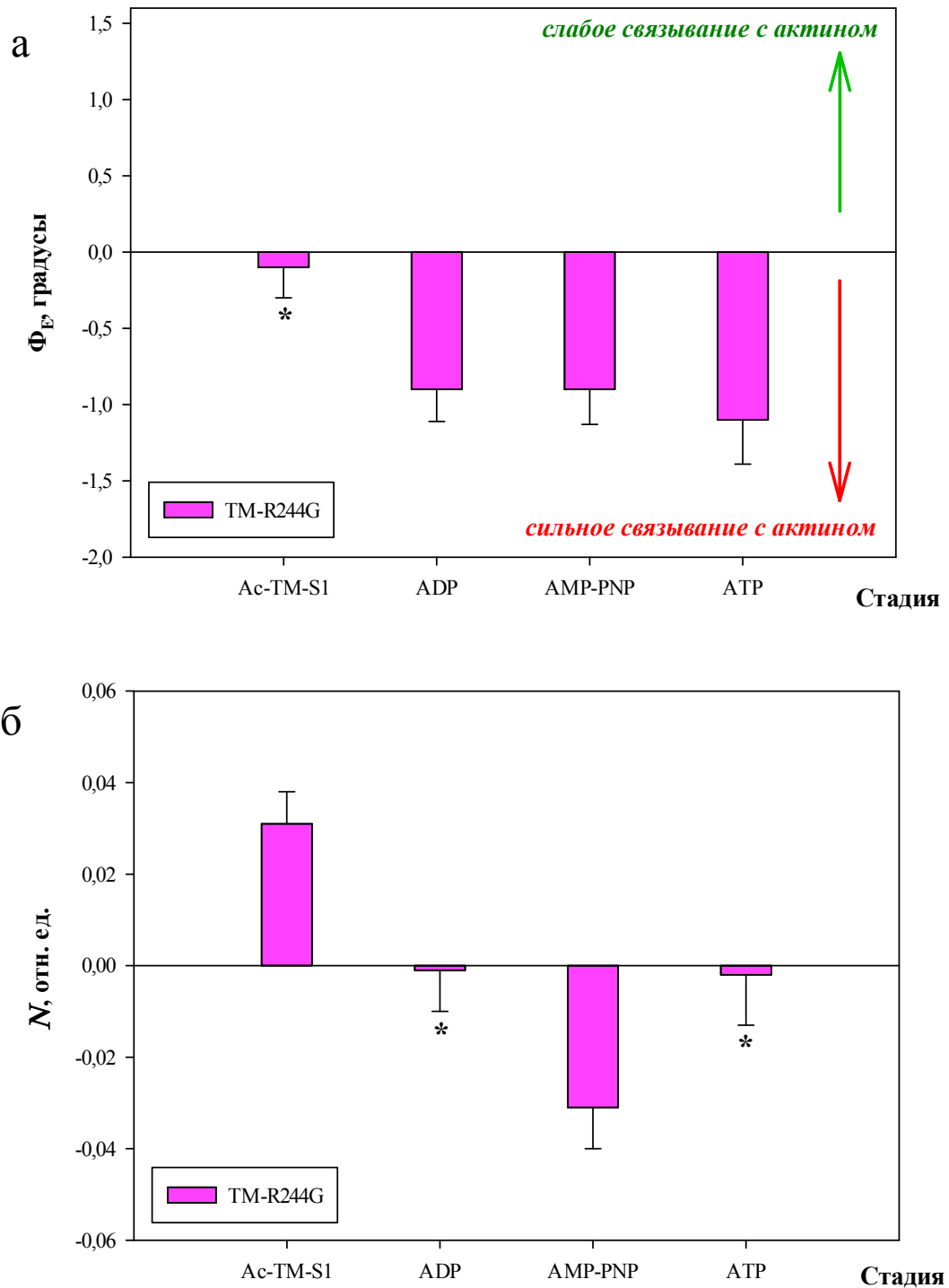


Рисунок 34. Влияние мутации Arg244Gly (R244G) в α -тропомиозине скелетных мышц на величину угла Φ_E (**а**) и показатель подвижности N (**б**) зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с цистеином 707 S1, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и N для головки миозина в присутствии тропомиозина дикого типа. На рисунке (**а**) стрелочками показаны направления, характеризующие изменения доли сильно (красная) и слабо (зеленая) связанных головок миозина с актином ($P < 0.05$). Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Увеличение угла Φ_E для S1-AEDANS в присутствии мутанта тропомиозина составило на 0.9^0 меньше, чем в присутствии TM-WT (рис. 34, а). Такой результат, скорее всего, связан с увеличением доли сильно связанных головок миозина с актином в присутствии TM-Arg244Gly.

При моделировании слабого связывания миозиновой головки с актином значение Φ_E для S1-AEDANS в присутствии TM-Arg244Gly было на 1.1^0 меньше, чем в присутствии TM-WT. Последнее свидетельствует о высокой доле сильно связанных с актином головок миозина, что, видимо, является результатом нарушения взаимодействия тропомиозина с актином, вызванного мутацией в TM.

Нарушенное взаимодействие тропомиозина с актином, безусловно, должно влиять на позицию тропомиозина на тонких нитях. Оценим эти нарушения исследованием влияния мутации Arg244Gly в тропомиозине на степени поляризации зонда 5-IAF, специфически связанного с остатком цистеина 190 в TM, на значения угла Φ_E и показатель гибкости $\theta_{1/2}$ при имитации АТФазного цикла.

Таблица 13. Показаны значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) флуоресцентного зонда 5-IAF, специфически связанного с цистеинами 36 и 190 в β -TM (WT/Arg244Gly), в присутствии актина, S1 и нуклеотидов.

Нуклеотид	S1	TM-WT	TM-Arg244Gly	$P_{\parallel} \pm SEM$	$P_{\perp} \pm SEM$
-	-	+	-	0.130 ± 0.001	0.206 ± 0.002
-	-	-	+	0.123 ± 0.001	0.212 ± 0.001
-	+	+	-	0.104 ± 0.002	0.198 ± 0.001
-	+	-	+	* 0.105 ± 0.002	0.223 ± 0.001
ADP	+	+	-	0.095 ± 0.001	0.159 ± 0.001
	+	-	+	0.099 ± 0.002	0.185 ± 0.001
AMP-PNP	+	+	-	0.099 ± 0.002	0.140 ± 0.001
	+	-	+	0.108 ± 0.002	0.168 ± 0.001
ATP	+	+	-	0.118 ± 0.003	0.200 ± 0.002
	+	-	+	0.112 ± 0.002	0.231 ± 0.003

(*) – изменения по сравнению с контролем являются недостоверными

В таблице 13 приведены значения степеней поляризации (P_{\parallel} и P_{\perp}) для зонда 5-IAF, специфически связанного с остатком цистеина 190 тропомиозина, в теневом мышечном волокне на различных имитированных стадиях АТФазного цикла. В отсутствие субфрагмента-1 миозина и нуклеотидов значения P_{\parallel} и P_{\perp} для TM-Arg244Gly-AF были соответственно меньше и больше тех же значений для TM-WT. То есть мутантный тропомиозин изначально занимает позицию на актиновой нити, отличающейся от позиции тропомиозина дикого типа. Связывание S1 миозина с актином уменьшает долю параллельно ориентированных к оси волокна флуорофоров для TM-WT и TM-Arg244Gly. Доля перпендикулярно ориентированных флуорофоров для TM-Arg244Gly

при этом увеличивается, тогда как для TM-WT наблюдается уменьшение значения P_{\perp} . В присутствии нуклеотидов наглядная разница существует между значениями P_{\perp} для TM-WT и TM-Arg244Gly. В присутствии каждого из трёх нуклеотидов (АДФ, АМР-РНР или АТФ) значение P_{\perp} для TM-Arg244Gly-AF было больше, чем для TM-WT-AF. Можно заключить, что доля TM-Arg244Gly-AF в позиции, близкой к периферии нити актина выше, чем для TM-WT-AF.

На рис. 35, а и б, представлены результаты по значениям скорректированного угла Φ_E и показателя гибкости $\theta_{1/2}$ для TM-Arg244Gly-AF относительно тех же значений для TM-WT-AF на актине в отсутствие или присутствии головок миозина и нуклеотидов на различных стадиях цикла гидролиза АТФ. В отсутствие нуклеотидов и головок миозина величина угла Φ_E для TM-Arg244Gly-AF на актине достоверно не отличалась от значения Φ_E для TM-WT (рис. 35, а), также как не отличались гибкости этих двух белков (рис. 35, б), тем самым не выявляя нарушение позиции TM-Arg244Gly при моделировании комплекса АМ-ТМ. Связывание S1 миозина с актином уменьшает угол Φ_E для TM-WT, свидетельствуя о смещении тропомиозинового тяжа в сторону внутреннего домена актина – в центр актиновой нити (Karpicheva et al., 2013; Rysev et al., 2014). Значение угла Φ_E для TM-Arg244Gly-AF в присутствии S1 миозина также достоверно не отличалось от контроля (рис. 33, а), однако наблюдалась более высокая гибкость мутантного тропомиозина на актине в присутствии миозиновой головки (значение $\theta_{1/2}$ для TM-Arg244Gly-AF на 1.1° больше значения $\theta_{1/2}$ для TM-WT; рис. 35, б). В среде АДФ значение угла Φ_E для TM-Arg244Gly-AF оказалось на 0.6° меньше, чем для TM-WT. При этом сохраняется высокая гибкость мутантного тропомиозина на актине (рис. 35, б). Меньшее, чем в контроле, значение Φ_E для TM-Arg244Gly-AF в присутствии АДФ предполагает расположение тяжей мутантного тропомиозина ближе к внутреннему домену актина – к центру актиновой нити.

TM-AF

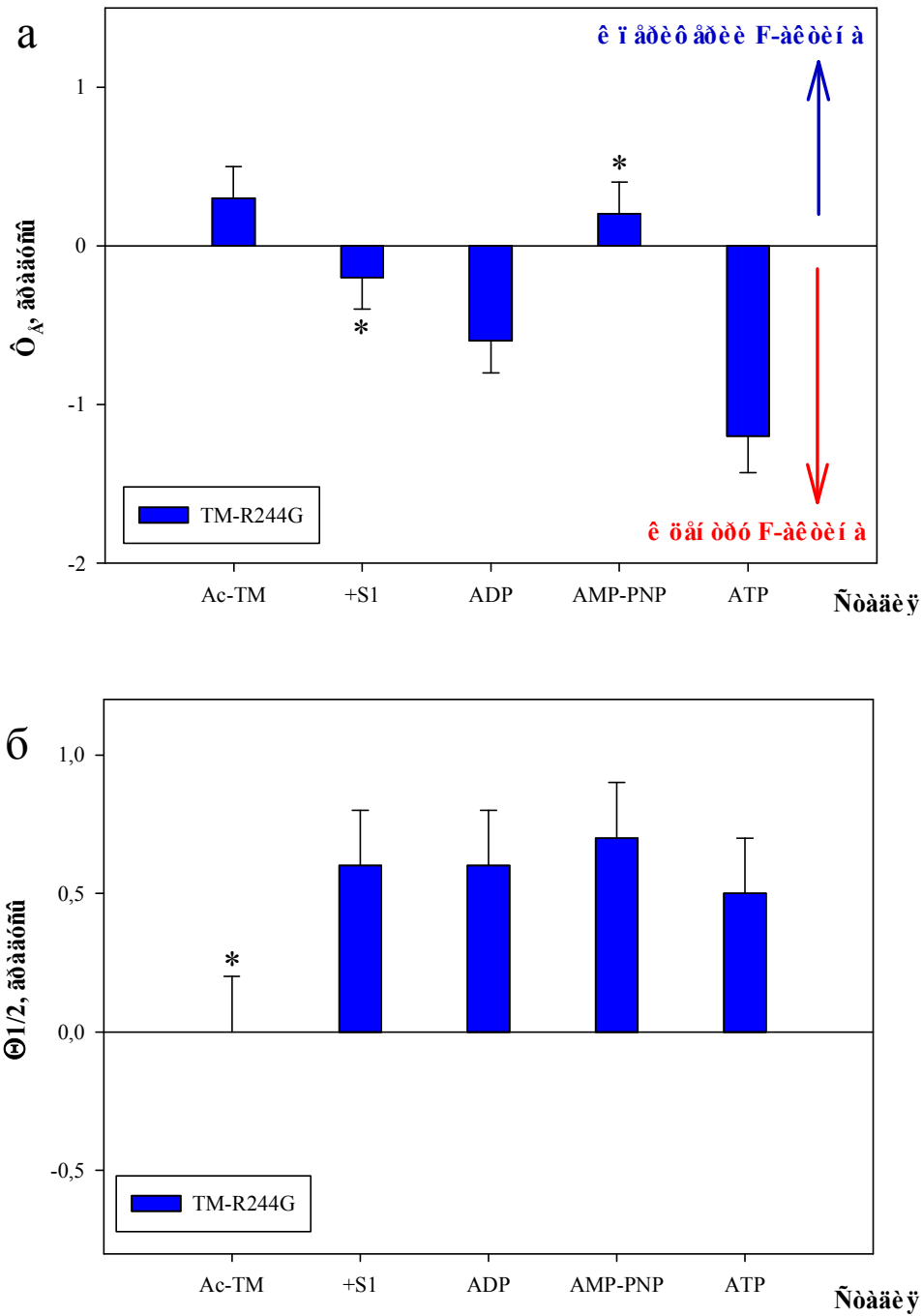


Рисунок 35. Влияние мутации Arg244Gly (R244G) в α -тропомиозине скелетных мышц на величину скорректированного с движением актин-AEDANS угла Φ_E (а) и $\theta_{1/2}$ (б) зонда 5-IAF, специфически связанного с двумя остатками цистеина в тропомиозине, в теневых мышечных волокнах на различных стадиях АТФазного цикла. В качестве нуля приняты значения угла Φ_E и $\theta_{1/2}$ для тропомиозина дикого типа. На рисунке (а) стрелочками показаны направления, характеризующие движение тропомиозина к периферии (синяя) и к центру (красная) актиновой нити ($P < 0.05$). Каждый столбец отображён со стандартной ошибкой среднего значения. Звёздочкой (*) обозначены столбцы, разница которых относительно контроля является недостоверной.

Последнее, в свою очередь, приводит к открыванию больше (по сравнению с контролем) миозин-связывающих сайтов на актине и сильному взаимодействию S1 с актином, что и наблюдается в результатах по исследованию позиции S1-AEDANS в присутствии этого мутанта (“ADP” на рис. 34, а).

В присутствии AMP-PNP достоверных отличий в значениях угла Φ_E для TM-Arg244Gly-AF и TM-WT-AF не наблюдалось, но наблюдалась по-прежнему более высокая гибкость мутантного тропомиозина (рис. 35, а и б).

При моделировании стадии AM*АТР в присутствии TM-Arg244Gly значение угла Φ_E было достоверно меньше (на 1.1^0) значения того же угла для TM-WT. Такой результат предполагает, что, тяжести мутантного тропомиозина при моделировании слабого связывании миозина с актином располагаются ближе к внутреннему домену актима – ближе к открытой позиции.

3.4.3 Обсуждение результатов по исследованию α -тропомиозина с мутацией Arg244Gly

Остаток положительно заряженного аргинина 244 находится в седьмом актив-связывающем псевдоповторе и, как считается, взаимодействует с отрицательно заряженным остатком аспартата 25 актима (Li et al., 2011). Нет сомнения, что замена положительно заряженного аргинина на незаряженный гидрофобный глицин приведет к нарушению взаимодействия с аспартатом актима. Видимо, этим и обусловлено низкое сродство TM-Arg244Gly к тропонину и актиму, наблюденное в экспериментах по соосаждению (Robaszkiewicz et al., 2012, 2015).

Исследование позиционирования TM-Arg244Gly на моделируемых этапах АТФазного цикла в присутствии S1 миозина и нуклеотидов предполагают нарушение позиции тропомиозина. Нарушения наблюдались при моделировании как сильного, так и слабого связывания головок миозина с актином. Так, относительное количество сильно связанных головок миозина в присутствии TM-Arg244Gly было больше и при слабой, и при сильной форме связывания с актином, чем в присутствии TM-WT. По-видимому, нарушение перехода актомиозина в слабое структурное состояние в присутствии этого мутанта приводит к понижению скорости гидролиза АТФ (данные не опубликованы). Результаты по позиционированию TM-Arg244Gly на актине в ходе АТФазного цикла показывают меньшее значение угла Φ_E по сравнению с контролем. Это предполагает, что мутантный тропомиозин занимает позицию ближе к центру тонкой нити, т.е. открытую позицию. По-видимому, открытая позиция тяжелей тропомиозина как при моделировании сильного, так и слабого актин-миозинового

связывания является причиной высокой доли сильно-связанных головок миозина, предполагаемых интерпретацией наших результатов.

На основании выше представленных экспериментальных данных можно выделить следующие заключения по влиянию данной мутации:

1. Связывание тропомиозина с мутацией Arg244Gly с актином приводит к нарушению способности тропомиозина выключать долю актиновых мономеров в отсутствие S1 и нуклеотидов, чем при связывании тропомиозина дикого типа. В присутствии АДФ и ТМ-Arg244Gly наблюдается высокая доля включенных мономеров актина, чем в присутствии тропомиозина дикого типа.

2. При моделировании стадий АТФазного цикла наблюдается высокая, по сравнению с контрольными экспериментами, доля головок миозина, находящихся в состоянии сильного связывания с актином в присутствии ТМ-Arg244Gly.

3. При переходе от слабой к сильной форме связывания S1 с актином ТМ-Arg244Gly наблюдается нарушение сдвига тяжей тропомиозина к периферии тонкой нити, проявляющееся центральным расположением тяжей тропомиозина на актине.

Полученные результаты по исследованию мутации Arg244Gly показывают сходства с эффектами, выявленными при исследовании мутации Glu240Lys. Аномальное функционирование актомиозинового мотора в присутствии этих двух мутантов (ТМ-Glu240Lys и ТМ-Arg244Gly), скорее всего, вызвано влиянием на взаимодействие остатка в 244 позиции тропомиозина с остатком аспартата 25 актина. В первом случае (при Glu240Lys) это воздействие опосредовано влиянием на связь тропомиозин-Arg244-актин-Asp25 (см. выше), тогда как во втором (Arg244Gly) непосредственно нарушением взаимодействия с аспартатом 25.

В связи с тем, что α -тропомиозины медленных скелетных мышц и быстрых скелетных мышц имеют высокую гомологию, можно ожидать, что похожие эффекты будут наблюдаться и при мутации Arg244Gly в α -тропомиозине медленных мышц человека, идентифицированного у больного врожденной диспропорцией типов мышечных волокон (Clarke et al., 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование влияние одиночных мутаций Arg91Gly и Gln147Pro в β -TM, Glu240Lys и Arg244Gly в α -TM показывает, что они существенно меняют характер актин-миозинового взаимодействия на моделируемых стадиях цикла гидролиза АТФ. Это влияние, главным образом, отображается в функционировании всех трёх исследованных белковых компонента – актина, миозина и тропомиозина. Несмотря на то, что эксперименты проводились в отсутствии тропонина и ионов кальция, полученные результаты проясняют некоторые эффекты, выявленные при исследовании этих мутаций в присутствии тропонина и Ca^{2+} . Так, гиперсократительный фенотип в присутствии тропомиозина с мутацией Arg91Gly (Robinson et al., 2007), как предполагают результаты наших экспериментов, скорее всего связан с аномальным позиционированием мутантного тропомиозина на актине и, как результат, дефектным ответом актина и миозина в цикле гидролиза АТФ. Высокая амплитуда азимутального колебания мутанта тропомиозина на актине в ходе АТФазного цикла способствует включению большего, чем в норме, мономеров актина и сильному связыванию большего числа головок миозина с актином, что может объяснить повышенную Ca^{2+} -чувствительность сокращения в присутствии TM-Arg91Gly (Robinson et al., 2007). Три другие мутации – Gln147Pro (β -TM), Glu240Lys и Arg244Gly (α -TM), ассоциированные с гипосократительным молекулярным фенотипом (Clarke et al., 2008; Ottenhejm et al., 2011; Marttila et al., 2014), показали отличные от TM-Arg91Gly ответы актин-миозиновой системы на аномальное позиционирование этих тропомиозинов. Так, TM-Gln147Pro в ходе АТФазного цикла, теряя способность передвигаться в закрытую позицию на актине, нарушает образование слабой формы связывания головки миозина с актином и увеличивает долю сильно-связанных головок миозина, что могло бы быть одним из объяснений пониженной Ca^{2+} -чувствительности сокращения в присутствии данного мутанта (Marttila et al., 2014). Мутанты TM-Glu240Lys и TM-Arg244Gly показали схожие эффекты на характер актин-миозинового взаимодействие и на позиционирование мутантного тропомиозина на актине. Оба мутанта при моделировании слабого и сильного актин-миозинового связывания локализуются ближе к открытой позиции на актине – к внутреннему домену актина, нарушая образование слабого связывания миозина с актином и выключая большую долю мономеров актина.

Выявленные в наших экспериментах эффекты могут быть использованы в разработке методов диагностики слабости мышц, вызываемой мутациями в тропомиозине, и терапевтических подходов к лечению миопатий.

ВЫВОДЫ

1. β -ТМ с мутацией Arg91Gly, сдвигаясь от закрытой к открытой позиции на нитях актина, демонстрирует более высокую амплитуду азимутального сдвига на актине, нежели тропомиозин дикого типа. Это приводит к связыванию большего числа головок миозина с актином и включению большего числа актиновых мономеров в F-актине. Такие изменения в поведении актин-тропомиозин-миозиновой системы могут являться одной из причин усиления функциональной активности сокращения и развития дистального артрогрипоза.

2. β -ТМ с мутацией Gln147Pro при моделировании сильной формы актин-миозинового связывания локализуется ближе к центру актиновой нити – в открытой позиции, способствуя сильному взаимодействию миозиновых головок с актином и включению большего, чем в контроле, числа мономеров актина. Однако, при моделировании слабого связывания, мутантный тропомиозин не выявил способности сдвигаться в закрытую позицию на актине, тем самым не закрывая сайты сильного связывания миозина на актине и нарушая процесс образования слабой формы связывания. Эти эффекты могут являться причиной выявленной ранее утере функциональной активности сокращения и развития немалиновой миопатии.

3. α -ТМ-ны с мутациями Glu240Lys и Arg244Gly при переходе от слабой к сильной форме актин-миозинового связывания сдвигаются к центру актиновой нити, способствуя сильному связыванию головок миозина с актином и препятствуя образованию слабой формы связывания, и выявляют большую, чем в норме, долю включённых мономеров актина. Эти результаты свидетельствуют о нарушении нормального функционирования актин-миозин-тропомиозиновой системы и могут быть одной из причин утери функциональной активности сокращения при врождённой диспропорции типов мышечных волокон.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровиков Ю.С., Добровольский З., Дабровска Р. Тропомиозин и субфрагмент-1 миозина индуцируют в тонких нитях мышечного волокна разные по характеру конформационные перестройки С-концевого участка полипептидной цепи актина // Цитология. – 1988. – Т. 30. – № 8. – С.1014-1018.
2. Боровиков Ю.С., Карпичева О.Е., Рысев Н.А., Рэдвуд Ч.С. Аномальное поведение тропомиозина в АТФазном цикле при дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т. 99. - № 1. – С. 73-80.
3. Иванов И.И., Юрьев В.А. Биохимия и патобиохимия мышц. - Л. : Медгиз, Ленигр. отд-ние, 1961. - 274 с.
4. Иоффе В.А., Боровиков Ю.С., Барский И.Я., Розанов Ю.М. Двухканальный поляризационный микрофлуориметр // Цитология. – 1974. – Т. 16. – № 1. – С. 112–116.
5. Каулин А.Б. Поляризованная флуоресценция акридинового оранжевого в мышечных волокнах в норме и при повреждении // Цитология. – 1968. – Т. 10. – С. 123-125.
6. Невзоров И.А., Левицкий Д.И. Тропомиозин: двойная спираль из мира белков // Успехи биологической химии. – 2011. – Т. 51. – С. 283-334.
7. Невзоров И.А., Редвуд Ч.С., Левицкий Д.И. Влияние мутации Arg91Gly на термостабильность β -тропомиозина // Биофизика. – 2008. – Т. 53. – № 6. – С. 917-921.
8. Розанов Ю.М., Барский И.Я., Боровиков Ю.С., Шудель М.С., Черногрядская Н.А. Исследование поляризованной ультрафиолетовой флуоресценции одиночных мышечных волокон // Доклады академии наук СССР. – 1971. – Т. 197. - № 1. – С. 212-215.
9. Хорошев М.И., Боровиков Ю.С. Теневое мышечное волокно с реконструированными из немышечного актина тонкими нитями – модель для изучения цитоскелета с помощью поляризационной микрофлуориметрии // Цитология. – 1991. – Т. 33. – № 3. – С. 76-79.
10. Abdul-Hussein, S., Rahl, K., Moslemi, A.R., Tajsharghi, H. Phenotypes of myopathy-related beta-tropomyosin mutants in human and mouse tissue cultures // PloS One. – 2013. – V. 8. – No. 9. – e72396.
11. Adelman, M.R., Taylor, E.W. Isolation of an actomyosin-like protein complex from slime mold plasmodium and the separation of the complex into actin- and myosin-like fractions // Biochemistry. – 1969. – V. 8. – No. 12. – P. 4964-4975.
12. Ajtai, K., Toft, D.J., Burghardt, T.P. Path and extent of cross-bridge rotation during muscle contraction // Biochemistry. – 1994. – V. 33. – No. 18. – P. 5382-5391.

13. al-Khayat, H.A., Yagi, N., Squire, J.M. Structural changes in actin-tropomyosin during muscle regulation: computer modelling of low-angle X-ray diffraction data // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 252. – No. 5. – P. 611-632.
14. Andreev, O.A., Takashi, R., Borejdo, J. Fluorescence polarization study of the rigor complexes formed at different degrees of saturation of actin filaments with myosin subfragment-1 // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1995. – V. 16. – No. 4. – P. 353-367.
15. Anson, M., Geeves, M.A., Kurzawa, S.E., Manstein, D.J. Myosin motors with artificial lever arms // *The EMBO Journal*. – 1996. – V. 15. – No. 22. – P. 6069-6074.
16. Anyanful, A., Sakube, Y., Takuwa, K., Kagawa, H. The third and fourth tropomyosin isoforms of *Caenorhabditis elegans* are expressed in the pharynx and intestines and are essential for development and morphology // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – V. 313. – No. 3. – P. 525-537.
17. Applegate, D., Reisler, E. Nucleotide-induced changes in the proteolytically sensitive regions of myosin subfragment 1 // *Biochemistry*. – 1984. – V. 23. – No. 20. – P. 4779-4784.
18. Astbury, W.T. Croonian lecture: On the structure of biological fibres and the problem of muscle // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 1947. – V. 134. – No. 876. – P. 303-328.
19. Astbury, W.T., Reed, R., Spark, L.C. An X-ray and electron microscope study of tropomyosin // *The Biochemical Journal*. – 1948. – V. 43. – No. 2. – P. 282-287.
20. Bagshaw, C.R. Myosin mechanochemistry // *Structure*. – 2007. – V. 15. – No. 5. – P. 511-512.
21. Bailey, K. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of muscle // *Nature*. – 1946. – V. 157. – No. 3986. – P. 368.
22. Balasubramanian, M.K., Helfman, D.M., Hemmingsen, S.M. A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe* // *Nature*. – 1992. – V. 360. – No. 6399. – P. 84-87.
23. Bálint, M., Wolf, I., Tarcsafalvi, A., Gergely, J., Sréter, F.A. Location of SH-1 and SH-2 in the heavy chain segment of heavy meromyosin // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1978. – V. 190. – No. 2. – P. 793-799.
24. Banwell, B.L., Becker, L.E., Jay, V., Taylor, G.P., Vajsar, J. Cardiac manifestations of congenital fiber-type disproportion myopathy // *Journal of Child Neurology*. – 1999. – V. 14. – No. 2. – P. 83-87.
25. Behrmann, E., Müller, M., Penczek, P.A., Mannherz, H.G., Manstein, D.J., Raunser, S. Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex // *Cell*. – 2012. – V. 150. – No. 2. – P. 327-338.

26. Beisel, K.W., Kennedy, J.E. Identification of novel alternatively spliced isoforms of the tropomyosin-encoding gene, TMnm, in the rat cochlea // *Gene*. – 1994. – V. 143. – No. 2. – P. 251-256.
27. Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food chemistry* // Springer Berlin Heidelberg. – 2009. – 891 pp.
28. Berg, J.S., Powell, B.C., Cheney, R.E. A millennial myosin census // *Molecular Biology of the Cell*. – 2001. – V. 12. – No. 4. – P. 780-794.
29. Betteridge, D.R., Lehrer, S.S. Two conformational states of didansylcystine-labeled rabbit cardiac tropomyosin // *Journal of Molecular Biology*. – 1983. – V. 167. – No. 2. – P. 481-496.
30. Bing, W., Knott, A., Redwood, C., Esposito, G., Purcell, I., Watkins, H., Marston, S. Effect of hypertrophic cardiomyopathy mutations in human cardiac muscle alpha -tropomyosin (Asp175Asn and Glu180Gly) on the regulatory properties of human cardiac troponin determined by in vitro motility assay // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2000. – V. 32. – No. 8. – P. 1489-1498.
31. Bobkov, A.A., Bobkova, E.A., Homsher, E., Reisler, E. Activation of regulated actin by SH1-modified myosin subfragment 1 // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – No. 25. – P. 7733-7738.
32. Borejdo, J., Putnam, S. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibers in rigor and relaxation // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1977. – V. 459. – No. 3. – P. 578-595.
33. Borejdo, J., Putnam, S., Morales, M.F. Fluctuations in polarized fluorescence: evidence that muscle cross bridges rotate repetitively during contraction // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1979. – V. 76. – No. 12. – P. 6346-6350.
34. Borovikov, Y.S., Avrova, S.V., Karpicheva, O.E., Robinson, P., Redwood, C.S. The effect of the dilated cardiomyopathy-causing Glu40Lys TPM1 mutation on actin-myosin interactions during the ATPase cycle // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011a. – V. 411. – No. 3. – P. 496-500.
35. 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. Aberrant movement of β -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – V. 577-578. – P. 11-23.
36. 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. Fluorescence depolarization of actin filaments in reconstructed myofibers: the effect of S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 86. – No. – P. 3020-3029.

37. Borovikov, Y.S., Gusev, N.B. Effect of troponin-tropomyosin complex and Ca²⁺ on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment-1 // *European Journal of Biochemistry (FEBS)*. – 1983. – V. – 136. – No. 2. – P. 363-369.
38. Borovikov, Y.S., Karpicheva, O.E., Avrova, S.V., Redwood, C.S. Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and Ca²⁺ // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009a. – V. 1794. – No. 7. – P. 985-994.
39. Borovikov, Y.S., Karpicheva, O.E., Avrova, S.V., Robinson, P., Redwood, C.S. The effect of the dilated cardiomyopathy-causing mutation Glu54Lys of alpha-tropomyosin on actin-myosin interactions during the ATPase cycle // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2009b. – V. 489 – No. 1-2. – P. 20-24.
40. Borovikov, Y.S., Karpicheva, O.E., Chudakova, G.A., Robinson, P., Redwood, C.S. Dilated cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin inhibit its movement during the ATPase cycle // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2009c. – V. 381. – No. 3. – P. 403-406.
41. Borovikov, Y.S., Levitskii, D.I., Kirillina, V.P., Poglazov, B.F. Effect of Ca²⁺ binding to 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) light chains on conformational changes of F-actin caused by myosin subfragment-1 // *European Journal of Biochemistry (FEBS)*. – 1982. – V. 125. – No. 2. – 343-347.
42. Borovikov, Y.S., Nowak, E., Khoroshev, M.I., Dabrowska, R. The effect of Ca²⁺ on the conformation of tropomyosin and actin in regulated actin filaments with or without bound myosin subfragment 1 // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1993. – V. 1163. – No. 3. – P. 280-286.
43. Borovikov, Y.S., Rysev, N.A., Karpicheva, O.E., Redwood, C.S. Hypertrophic cardiomyopathy-causing Asp175asn and Glu180gly Tpm1 mutations shift tropomyosin strands further towards the open position during the ATPase cycle // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011b. – V. 407. – No. 1. – P. 197-201.
44. Brandis, A., Aronica, E., Goebel, H.H. TPM2 mutation // *Neuromuscular Disorders*. – 2008. – V. 18. – No. 12. – P. 1005.
45. Brooke, M.H., Engel, W.K. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 4. Children's biopsies // *Neurology*. – 1969. – V. 19. – No. 6. – P. 591-605.
46. Brown, J.H., Cohen, C. Regulation of muscle contraction by tropomyosin and troponin: how structure illuminates function // *Advances in Protein Chemistry*. – 2005. – V. 71. – P. 121-159.
47. Brown, J.H., Kim, K.H., Jun, G., Greenfield, N.J., Dominguez, R., Volkman, N., Hitchcock-DeGregori, S.E., Cohen, C. Deciphering the design of the tropomyosin molecule // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – V. 98. – No. 15. – P. 8496-8501.
48. Brown, J.H., Zhou, Z., Reshetnikova, L., Robinson, H., Yammani, R.D., Tobacman, L.S., Cohen, C. Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin // *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – V. 102. – No. 52. – P. 18878-18883.

49. Bukatina, A.E., Fuchs, F. Effect of phalloidin on the ATPase activity of striated muscle myofibrils // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1994. – V. 15. – No. 1. – P. 29-36.

50. Cheney, R.E., Mooseker, M.S. Unconventional myosins // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1992. – V. 4. – No. 1. – P. 27-35.

51. Chik, J.K., Lindberg, U., Schutt, C.E. The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution // *Journal of Molecular Biology*. – 1996. – V. 263. – No. 4. – P. 607-623.

52. Cho, Y.J., Liu, J., Hitchcock-DeGregori, S.E. The amino terminus of muscle tropomyosin is a major determinant for function // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – No. 1. – P. 538-545.

53. Clarke, N.F., Domazetovska, A., Waddell, L., Kornberg, A., McLean, C., North, K.N. Cap disease due to mutation of the beta-tropomyosin gene (TPM2) // *Neuromuscular Disorders*. – 2009. – V. 19. – No. 5. – P. 348-351.

54. Clarke, N.F., North, K.N. Congenital fiber type disproportion--30 years on // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2003. – V. 62. – No. 10. – P. 977-989.

55. Clarke, N.F., Waddell, L.B., Sie, L.T., van Bon, B.W., McLean, C., Clark, D., Kornberg, A., Lammens, M., North, K.N. Mutations in TPM2 and congenital fibre type disproportion // *Neuromuscular Disorders*. – 2012. – V. 22. – No. 11. – P. 955-958.

56. Clayton, L., Reinach, F.C., Chumbley, G.M., MacLeod, A.R. Organization of the hTMnm gene. Implications for the evolution of muscle and non-muscle tropomyosins // *Journal of Molecular Biology*. – 1988. – V. 201. – No. 3. – P. 507-515.

57. Conway, J.F., Parry, D.A. Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1990. – V. 12. – No. 5. – P. 328-334.

58. Cooke, R. The mechanism of muscle contraction // *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. – 1986. – V. 21. – No. 1. – P. 53-118.

59. Cooley, B.C., Bergtrom, G. Multiple combinations of alternatively spliced exons in rat tropomyosin-alpha gene mRNA: evidence for 20 new isoforms in adult tissues and cultured cells // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2001. – V. 390. – No. 1. – P. 71-77.

60. Coureux, P.D., Sweeney, H.L., Houdusse, A. Three myosin V structures delineate essential features of chemo-mechanical transduction // *The EMBO Journal*. – 2004. – V. 23. – No. 23. – P. 4527-4537.

61. Coureux, P.D., Wells, A.L., Ménétrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L., Houdusse, A. A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide // *Nature*. – 2003. – V. 425. – P. 6956. – P. 419-423.
62. Craig, R., Lehman, W. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – V. 311. – No. 5. – P. 1027-1036.
63. Crick, F.H.C. The packing of α -helices: simple coiled-coils // *Acta Crystallographica*. – 1953. – V. 6. – P. 689-697.
64. Cuisset, J.M., Maurage, C.A., Pellissier, J.F., Barois, A., Urtizbera, J.A., Laing, N., Tajsharghi, H., Vallée, L. 'Cap myopathy': case report of a family // *Neuromuscular Disorders*. – 2006. – V. 16. – No. 4. – P. 277-281.
65. Dancker, P., Löw, I., Hasselbach, W., Wieland, T. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1975. – V. 400. – No. 2. – P. 407-414.
66. Davidson, A.E., Siddiqui, F.M., Lopez, M.A., Lunt, P., Carlson, H.A., Moore, B.E., Love, S., Born, D.E., Roper, H., Majumdar, A., Jayadev, S., Underhill, H.R., Smith, C.O., von der Hagen, M., Hubner, A., Jardine, P., Merrison, A., Curtis, E., Cullup, T., Jungbluth, H., Cox, M.O., Winder, T.L., Abdel Salam, H., Li, J.Z., Moore, S.A., Dowling, J.J. Novel deletion of lysine 7 expands the clinical, histopathological and genetic spectrum of TPM2-related myopathies // *Brain*. – 2013. – V. 136. – No. 2. – P. 508-521.
67. De Paula, A.M., Franques, J., Fernandez, C., Monnier, N., Lunardi, J., Pellissier, J.F., Figarella-Branger, D., Pouget, J. A TPM3 mutation causing cap myopathy // *Neuromuscular Disorders*. – 2009. – V. 19. – No. 10. – P. 685-688.
68. De Rosier, D.J., Klug, A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs // *Nature*. – 1968. – V. 217. – No. 5124. – P. 130-134.
69. Denz, C.R., Narshi, A., Zajdel, R.W., Dube, D.K. Expression of a novel cardiac-specific tropomyosin isoform in humans // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – V. 320. – No. 4. – P. 1291-1297.
70. Dobrowolski, Z., Borovikov, Y.S., Nowak, E., Gałazkiewicz, B., Dabrowska, R. Comparison of Ca²⁺-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 // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1988. – V. 956. – No. 2. – P. 140-150.
71. Donkervoort, S., Papadaki, M., de Winter, J.M., Neu, M.B., Kirschner, J., Bolduc, V., Yang, M.L., Gibbons, M.A., Hu, Y., Dastgir, J., Leach, M.E., Rutkowski, A., Foley, A.R., Krüger, M., Wartchow, E.P., McNamara, E., Ong, R., Nowak, K.J., Laing, N.G., Clarke, N.F., Ottenheijm, C.A.,

Marston, S.B., Bönnemann, C.G. TPM3 deletions cause a hypercontractile congenital muscle stiffness phenotype // *Annals of Neurology*. – 2015. – V. 78. – No. 6. – P. 982-994.

72. Donner, K., Ollikainen, M., Ridanpää, M., Christen, H.J., Goebel, H.H., de Visser, M., Pelin, K., Wallgren-Pettersson, C. Mutations in the beta-tropomyosin (TPM2) gene--a rare cause of nemaline myopathy // *Neuromuscular Disorders*. – 2002. – V. 12. – No. 2. – P. 151-158.

73. Doolittle, R.F. The origins and evolution of eukaryotic proteins // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 1995. – V. 349. – No. 1329. – P. 235-240.

74. Drees, B., Brown, C., Barrell, B.G., Bretscher, A. Tropomyosin is essential in yeast, yet the TPM1 and TPM2 products perform distinct functions // *The Journal of Cell Biology*. – 1995. – V. 128. – No. 3. – P. 383-392.

75. Dufour, C., Weinberger, R.P., Schevzov, G., Jeffrey, P.L., Gunning, P. Splicing of two internal and four carboxyl-terminal alternative exons in nonmuscle tropomyosin 5 pre-mRNA is independently regulated during development // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – No. 29. – P. 18547-18555.

76. Eaton, B.L., Kominz, D.R., Eisenberg, E. Correlation between the inhibition of the acto-heavy meromyosin ATPase and the binding of tropomyosin to F-actin: effects of Mg²⁺, KCl, troponin I, and troponin C // *Biochemistry*. – 1975. – V. 14. – No. 12. – P. 2718-2725.

77. Ebashi, S. Third component participating in the super precipitation of 'natural actomyosin' // *Nature*. – 1963. – V. 200. – No. 4910. – P.1010.

78. Ebashi, S., Ebashi, F. A new protein component participating in the superprecipitation of myosin B // *The Journal of Biochemistry*. – 1964. – V. 55. – No. 6. – P. 604-613.

79. Ebashi, S., Endo, M. Calcium ion and muscle contraction // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 1968. – V. 18. – P. 123-183.

80. Egelman, E.H. Actin allostery again? // *Nature Structural Biology*. – 2001. – V. 8. – No. 9. – P. 735-736.

81. Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M., Adelstein, R.S. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1973. – V. 70. – No. 9. – P. 2687-2691.

82. Engelhardt, W.A., Ljubimowa, M.N. Myosine and adenosinetriphosphatase // *Nature*. – 1939. – V. 144. – No. 3650. – P. 668-669.

83. Feng, L., Kim, E., Lee, W.L., Miller, C.J., Kuang, B., Reisler, E., Rubenstein, P.A. Fluorescence probing of yeast actin subdomain 3/4 hydrophobic loop 262-274. Actin-actin and actin-myosin interactions in actin filaments // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – No. 27. – P. 16829-16837.

84. Fidziańska, A. "Cap disease"--a failure in the correct muscle fibre formation // *Journal of Neurological Sciences*. – 2002. – V. 201. – No. 1-2. – P. 27-31.
85. Fidzianska, A., Badurska, B., Ryniewicz, B., Dembek, I. "Cap disease": new congenital myopathy // *Neurology*. – 1981. – V. 31. – No. 9. – P. 1113-1120.
86. Forry-Schaudies, S., Hughes, S.H. The chicken tropomyosin 1 gene generates nine mRNAs by alternative splicing // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – V. 266. – No. 21. – P. 13821-13827.
87. Foth, B.J., Goedecke, M.C., Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – V. 103. – No. 10. – P. 3681-3686.
88. Frye, J., Klenchin, V.A., Rayment, I. Structure of the tropomyosin overlap complex from chicken smooth muscle: insight into the diversity of N-terminal recognition // *Biochemistry*. – 2010. – V. 49. – No. 23. – P. 4908-4920.
89. Fujita-Becker, S., Tsiavaliaris, G., Ohkura, R., Shimada, T., Manstein, D.J., Sutoh, K. Functional characterization of the N-terminal region of myosin-2 // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – No. 47. – P. 36102-36109.
90. Furuhashi, K., Hatano, S., Ando, S., Nishizawa, K., Inagaki, M. Phosphorylation by actin kinase of the pointed end domain on the actin molecule // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – No. 13. – P. 9326-9330.
91. Gaillard, C., Thézé, N., Lerivray, H., Hardy, S., Lepetit, D., Thiébaud, P. A novel tropomyosin isoform encoded by the *Xenopus laevis* alpha-TM gene is expressed in the brain // *Gene*. – 1998. – V. 207. – No. 2. – P. 235-239.
92. Galkin, V.E., Orlova, A., Lukoyanova, N., Wriggers, W., Egelman, E.H. Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits // *The Journal of Cell Biology*. – 2001. – V. 153. – No. 1. – P. 75-86.
93. Galkin, V.E., Orlova, A., Schröder, G.F., Egelman, E.H. Structural polymorphism in F-actin // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2010. – V. 17. – No. 11. – P. 1318-1323.
94. Galkin, V.E., VanLoock, M.S., Orlova, A., Egelman, E.H. A new internal mode in F-actin helps explain the remarkable evolutionary conservation of actin's sequence and structure // *Current Biology*. – 2002. – V. 12. – No. 7. – P. 570-575.
95. Geeves, M.A., Holmes, K.C. The molecular mechanism of muscle contraction // *Advances in Protein Chemistry*. – 2005. – V. 71. – P. 161-193.
96. Goodson, H.V., Spudich, J.A. Molecular evolution of the myosin family: relationships derived from comparisons of amino acid sequences // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – V. 90. – No. 2. – P. 659-663.

97. Goodwin, L.O., Lees-Miller, J.P., Leonard, M.A., Cheley, S.B., Helfman, D.M. Four fibroblast tropomyosin isoforms are expressed from the rat alpha-tropomyosin gene via alternative RNA splicing and the use of two promoters // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – V. 266. – No. 13. – P. 8408-8415.
98. Goody, R.S., Hofmann, W. Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1980. – V. 1. – No. 1. – P. 101-115.
99. Gordon, A.M., Homsher, E., Regnier, M. Regulation of contraction in striated muscle // *Physiological Reviews*. – 2000. – V. 80. – No. 2. – P. 853-924.
100. Graceffa, P., Lehrer, S.S. The excimer fluorescence of pyrene-labeled tropomyosin. A probe of conformational dynamics // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1980. – V. 255. – No. 23. – P. 11296-11300.
101. Greenfield, N.J., Huang, Y.J., Swapna, G.V., Bhattacharya, A., Rapp, B., Singh, A., Montelione, G.T., Hitchcock-DeGregori, S.E. Solution NMR structure of the junction between tropomyosin molecules: implications for actin binding and regulation // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – V. 364. – No. 1. – P. 80-96.
102. Greenfield, N.J., Kotlyanskaya, L., Hitchcock-DeGregori, S.E. Structure of the N terminus of a nonmuscle alpha-tropomyosin in complex with the C terminus: implications for actin binding // *Biochemistry*. – 2009. – V. 48. – No. 6. – P. 1272-1283.
103. Greenfield, N.J., Montelione, G.T., Farid, R.S., Hitchcock-DeGregori, S.E. The structure of the N-terminus of striated muscle alpha-tropomyosin in a chimeric peptide: nuclear magnetic resonance structure and circular dichroism studies // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – No. 21. – P. 7834-7843.
104. Greenfield, N.J., Palm, T., Hitchcock-DeGregori, S.E. Structure and interactions of the carboxyl terminus of striated muscle alpha-tropomyosin: it is important to be flexible // *Biophysical Journal*. – 2002. – V. 83. – No. 5. – P. 2754-2766.
105. Greenfield, N.J., Swapna, G.V., Huang, Y., Palm, T., Graboski, S., Montelione, G.T., Hitchcock-DeGregori, S.E. The structure of the carboxyl terminus of striated alpha-tropomyosin in solution reveals an unusual parallel arrangement of interacting alpha-helices // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – No. 3. – P. 614-619.
106. Gunning, P., Ponte, P., Okayama, H., Engel, J., Blau, H., Kedes, L. Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human alpha-, beta-, and gamma-actin mRNAs: skeletal but not cytoplasmic actins have an amino-terminal cysteine that is subsequently removed // *Molecular and Cellular Biology*. – 1983. – V. 3. – No. 5. – P. 787-795.

107. Gunning, P.W., Schevzov, G., Kee, A.J., Hardeman, E.C. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function // *Trends in Cell Biology*. – 2005. – V. 15 – No. 6. – P. 331-341.
108. Halliburton, W.D. On muscle-plasma // *The Journal of Physiology*. – 1887. – V. 8. – No. 3-4. – P. 133-202.
109. Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T. Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gen // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – V. 79. – No. 19. – P. 5901-5905.
110. Hanke, P.D., Storti, R.V. The *Drosophila melanogaster* tropomyosin II gene produces multiple proteins by use of alternative tissue-specific promoters and alternative splicing // *Molecular and Cellular Biology*. – 1988. – V. 8. – No. 9. – P. 3591-3602.
111. Hanson, J., Huxley, H.E. Structural basis of cross-striations in muscle // *Nature*. – 1953. – V. 172. – No. 4377. – P. 530-532.
112. Hanson, J., Lowy, J. The structure of actin filaments and the origin of the axial periodicity in the I-substance of vertebrate striated muscle // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 1964. – V. 160. – P. 449-460.
113. Hardy, S., Fiszman, M.Y., Osborne, H.B., Thiebaud, P. Characterization of muscle and non muscle *Xenopus laevis* tropomyosin mRNAs transcribed from the same gene. Developmental and tissue-specific expression // *European Journal of Biochemistry (FEBS)*. – 1991. – V. 202. – No. 2. – P. 431-440.
114. Hardy, S., Thézé, N., Lepetit, D., Allo, M.R., Thiebaud, P. The *Xenopus laevis* TM-4 gene encodes non-muscle and cardiac tropomyosin isoforms through alternative splicing // *Gene*. – 1995. – V. 156. – No. 2. – P. 265-270.
115. Hardy, S., Thiebaud, P. Isolation and characterization of cDNA clones encoding the skeletal and smooth muscle *Xenopus laevis* beta tropomyosin isoforms // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1992. – V. 1131. – No. 2. – P. 239-242.
116. Haselgrove, J.C. X-ray evidence for a conformational change in actin-containing filaments of vertebrate striated muscle // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 1973. – V. 37. – P. 341-352.
117. Hasselbach, W. Elektronmikroskopische untersuchungen an muskelfibrillen bei totaler und partieller extraktion des L-myosins // *Zeitschrift für Naturforschung B* – 1953. – V. 8. – No. 9. – P. 449-454.
118. Hill, L.E., Mehegan, J.P., Butters, C.A., Tobacman, L.S. Analysis of troponin-tropomyosin binding to actin. Troponin does not promote interactions between tropomyosin molecules // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – No. 23. – P. 16106-16113.

119. Hitchcock-DeGregori, S.E. Tropomyosin: function follows structure // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 60-72.
120. Hitchcock-DeGregori, S.E., An, Y. Integral repeats and a continuous coiled coil are required for binding of striated muscle tropomyosin to the regulated actin filament // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – V. 271. – No. 7. – P. 3600-3603.
121. Hitchcock-DeGregori, S.E., Song, Y., Greenfield, N.J. Functions of tropomyosin's periodic repeats // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – No. 50. – P. 15036-15044.
122. Hitchcock-DeGregori, S.E., Song, Y., Moraczewska, J. Importance of internal regions and the overall length of tropomyosin for actin binding and regulatory function // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – No. 7. – P. 2104-2112.
123. Hodges, R.S, Smillie, L.B. Cysteine sequences of rabbit skeletal tropomyosin // *Canadian Journal of Biochemistrty*. – 1972a. – V. 50. – No. 3. – P. 330-343. b.
124. Hodges, R.S., Smillie, L.B. The histidine and methionine sequences of rabbit skeletal tropomyosin // *Canadian Journal of Biochemistrty*. – 1972b. – V. 50. – No. 3. – P. 312-329. a.
125. Holmes, K.C. Structural biology: actin in a twist // *Nature*. – 2009. – V. 457. – No. 7228. – P. 389-390.
126. Holmes, K.C. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction // *Current Biology*. – 1997. – V. 7. – No. 2. – P. R112-R118.
127. Holmes, K.C., Angert, I., Kull, F.J., Jahn, W., Schröder, R.R. Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide // *Nature*. – 2003. – V. 425. – No. 6956. – 423-427.
128. Holmes, K.C., Lehman, W. Gestalt-binding of tropomyosin to actin filaments // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2008. – V. 29. – No. 6-8. – P. 213-219.
129. Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. Atomic model of the actin filament // *Nature*. – 1990. – V. 347. – P. 44-49.
130. Holmes, K.C., Schröder, R.R., Sweeney, H.L., Houdusse, A. The structure of the rigor complex and its implications for the power stroke // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 2004. – V. 349. – No. 1452. – P. 1819-1828.
131. Hozumi, T., Muhlrud, A. Reactive lysyl of myosin subfragment 1: location on the 27K fragment and labeling properties // *Biochemistry*. – 1981. – V. 20. – No. 10. – P. 2945-2950.
132. Hudson, E.N., Weber, G. Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents // *Biochemistry*. – 1973. – V. 12. – No. 21. – P. 4154-4161.
133. Hung, R.M., Yoon, G., Hawkins, C.E., Halliday, W., Biggar, D., Vajsar, J. Cap myopathy caused by a mutation of the skeletal alpha-actin gene ACTA1 // *Neuromuscular Disorders*. – 2010. – V. 20. – No. 4. – P. 238-240.

134. Huxley, A.F. Interpretation of muscle striation: evidence from visible light microscopy // *British medical bulletin*. – 1956. – V. 12. – No. 3. – P. 167-170.
135. Huxley, A.F., Niedergerke, R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres // *Nature*. – 1954. – V. 173. – No. 4412. – P. 971-973.
136. Huxley, H., Hanson, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation // *Nature*. – 1954. – V. 173. – No. 4412. – P. 973-976.
137. Huxley, H.E. Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 1973. – V. 37. – P. 361-376.
138. Huxley, H.E. The double array of filaments in cross-striated muscle // *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. – 1957. – V. 3. – No. 5. – P. 631-648.
139. Ilkovski, B., Cooper, S.T., Nowak, K., Ryan, M.M., Yang, N., Schnell, C., Durling, H.J., Roddick, L.G., Wilkinson, I., Kornberg, A.J., Collins, K.J., Wallace, G., Gunning, P., Hardeman, E.C., Laing, N.G., North, K.N. Nemaline myopathy caused by mutations in the muscle alpha-skeletal-actin gene // *American Journal of Human Genetics*. – 2001. – V. 68. – No. 6. – P. 1333-1343.
140. Ilkovski, B., Mokbel, N., Lewis, R.A., Walker, K., Nowak, K.J., Domazetovska, A., Laing, N.G., Fowler, V.M., North, K.N., Cooper, S.T. Disease severity and thin filament regulation in M9R TPM3 nemaline myopathy // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2008. – V. 67. – No. 9. – P. 867-877.
141. Irving, M. Steady-state polarization from cylindrically symmetric fluorophores undergoing rapid restricted motion // *Biophysical Journal*. – 1996. – V. 70. – No. 4. – P. 1830-1835.
142. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., Carlier, M.F. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270. – No. 19. – P. 11437-11444.
143. Isemura, T., Okabayashi, H., Sakakibara, S. Steric structure of L-proline oligopeptides. I. Infrared absorption spectra of the oligopeptides and poly-L-proline // *Biopolymers*. – 1968. – V. 6. – No. 3. – P. 307-321.
144. Ishii, Y., Hitchcock-DeGregori, S., Mabuchi, K., Lehrer, S.S. Unfolding domains of recombinant fusion alpha alpha-tropomyosin // *Protein Science*. – 1992. – V. 1. – No. 10. – P. 1319-1325.
145. Ishii, Y., Lehrer, S.S. Fluorescence studies of the conformation of pyrene-labeled tropomyosin: effects of F-actin and myosin subfragment 1 // *Biochemistry*. – 1985. – V. 24. – No. 23. – P. 6631-6638.

146. Iwasa, M., Maeda, K., Narita, A., Maéda, Y., Oda, T. Dual roles of Gln137 of actin revealed by recombinant human cardiac muscle alpha-actin mutants // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – No. 30. – P. 21045-21053.
147. Jarraya, M., Quijano-Roy, S., Monnier, N., Béhin, A., Avila-Smirnov, D., Romero, N.B., Allamand, V., Richard, P., Barois, A., May, A., Estournet, B., Mercuri, E., Carlier, P.G., Carlier, R.Y. Whole-Body muscle MRI in a series of patients with congenital myopathy related to TPM2 gene mutations // *Neuromuscular Disorders*. – 2012. – V. 22. – S. 1. – P. S137-147.
148. Joel, P.B., Fagnant, P.M., Trybus, K.M. Expression of a nonpolymerizable actin mutant in Sf9 cells // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – No. 36. – P. 11554-11559.
149. Johnson, P., Smillie, L.B. Polymerizability of rabbit skeletal tropomyosin: effects of enzymic and chemical modifications // *Biochemistry*. – 1977. – V. 16. – No. 10. – P. 2264-2269.
150. Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C. Atomic structure of the actin: DNase I complex // *Nature*. – 1990. – V. 347. – No. 6288. – P. 37-44.
151. Kagawa, H., Sugimoto, K., Matsumoto, H., Inoue, T., Imadzu, H., Takuwa, K., Sakube, Y. Genome structure, mapping and expression of the tropomyosin gene tmy-1 of *Caenorhabditis elegans* // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 251. – No. 5. – P. 603-613.
152. Kakol, I., Borovikov, Y.S., Szczesna, D., Kirillina, V.P., Levitsky, D.I. Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost single fibre induced by either phosphorylated or dephosphorylated heavy meromyosin // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1987. – V. 913. – No. 1. – P. 1-9.
153. Karasoy H., Ozbay O.E., Yuceyar A.N. G.P.7.11 Central core and cap disease in a case of congenital myopathy // *Neuromuscular Disorders*. – 2009. – V. 19. – No. 8-9. – P. 590.
154. Karlik, C.C., Fyrberg, E.A. Two *Drosophila melanogaster* tropomyosin genes: structural and functional aspects // *Molecular and Cellular Biology*. – 1986. – V. 6. – No. 6. – P. 1965-1973.
155. Karpicheva, O.E., Redwood, C.S., Borovikov, Y.S. The E117K mutation in β -tropomyosin disturbs concerted conformational changes of actomyosin in muscle fibers // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – V. 549. – P. 12-16.
156. Karpicheva, O.E., Robinson, P., Piers, A., Borovikov, Y.S., Redwood, C.S. The nemaline myopathy-causing E117K mutation in β -tropomyosin reduces thin filament activation // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2013. – V. 536. – No. 1. – P. 25-30.
157. Karpicheva, O.E., Simonyan, A.O., Kuleva, N.V., Redwood, C.S., Borovikov, Yu. S. Myopathy-causing Q147P TPM2 mutation shifts tropomyosin strands further towards the open position and increases the proportion of strong-binding cross-bridges during the ATPase cycle // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2016. – V. 1864. – No. 3. – P. 260-267.

158. Kasai, M., Oosawa, F. The exchangeability of actin-bound calcium with various divalent cations // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1968. – V. 154. – No. 3. – P. 520-528.
159. Kim, E., Bobkova, E., Miller, C.J., Orlova, A., Hegyi, G., Egelman, E.H., Muhrad, A., Reisler, E. Intrastrand cross-linked actin between Gln-41 and Cys-374. III. Inhibition of motion and force generation with myosin // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – No. 51. – P. 17801-17809.
160. Kim, E., Miller, C.J., Reisler, E. Polymerization and in vitro motility properties of yeast actin: a comparison with rabbit skeletal alpha-actin // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – No. 51. – P. 16566-16572.
161. Kiphuth, I.C., Krause, S., Huttner, H.B., Dekomien, G., Struffert, T., Schröder, R. Autosomal dominant nemaline myopathy caused by a novel alpha-tropomyosin 3 mutation // *Journal of Neurology*. – 2010. – V. 257. – No. 4. – P. 658-660.
162. Kollmar, M., Dürrwang, U., Kliche, W., Manstein, D.J., Kull, F.J. Crystal structure of the motor domain of a class-I myosin // *The EMBO Journal*. – 2002. – V. 21. – No. 11. – P. 2517-2525.
163. Kostyukova, A.S. Capping complex formation at the slow-growing end of the actin filament // *Biochemistry (Moscow)*. – 2008. – V. 73. – No. 13. – P. 1467-1472.
164. Kovar, D.R., Pollard, T.D. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – V. 101. – No. 41. – P. 14725-14730.
165. Kudryashov, D.S., Sawaya, M.R., Adisetiyo, H., Norcross, T., Hegyi, G., Reisler, E., Yeates, T.O. The crystal structure of a cross-linked actin dimer suggests a detailed molecular interface in F-actin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – V. 102. – No. 37. – P. 13105-13110.
166. Kühne, W. Untersuchungen über bewegungen und veränderungen der contractilen substanzen // *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin Jahrgang*. – 1858. – P. 748-835.
167. Kwok, S.C., Hodges, R.S. Stabilizing and destabilizing clusters in the hydrophobic core of long two-stranded alpha-helical coiled-coils // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – No. 20. – P. 21576-21588.
168. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – No. 5259. – P. 680-685.
169. Laing, G.N., Wilton, S.D., Akkari, P.A., Dorosz, S., Boundy, K., Kneebone, C., Blumbergs, P., White, S., Watkins, H., Love, D.R., Haan, E. A mutation in the alpha tropomyosin gene TPM3 associated with autosomal dominant nemaline myopathy // *Nature Genetics*. – 1995. – V. 9. – P. 75-79.

170. Lamkin, M., Tao, T., Lehrer, S.S. Tropomyosin-troponin and tropomyosin-actin interactions: a fluorescence quenching study // *Biochemistry*. – 1983. – V. 22. – No. 13. – P. 3053-3058.
171. Landis, C., Back, N., Homsher, E., Tobacman, L.S. Effects of tropomyosin internal deletions on thin filament function // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – No. 44. – P. 31279-31285.
172. Landis, C.A., Bobkova, A., Homsher, E., Tobacman, L.S. The active state of the thin filament is destabilized by an internal deletion in tropomyosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – No. 22. – P. 14051-14056.
173. Lawlor, M.W., Dechene, E.T., Roumm, E., Geggel, A.S., Moghadaszadeh, B., Beggs, A.H. Mutations of tropomyosin 3 (TPM3) are common and associated with type 1 myofiber hypotrophy in congenital fiber type disproportion // *Human Mutation*. – 2010. – V. 31. – No. 2. – P. 176-183.
174. Lees-Miller, J.P., Goodwin, L.O., Helfman, D.M. Three novel brain tropomyosin isoforms are expressed from the rat alpha-tropomyosin gene through the use of alternative promoters and alternative RNA processing // *Molecular and Cellular Biology*. – 1990. – V. 10. – No. 4. – P. 1729-1742.
175. Lees-Miller, J.P., Yan, A., Helfman, D.M. Structure and complete nucleotide sequence of the gene encoding rat fibroblast tropomyosin 4 // *Journal of Molecular Biology*. – 1990. – V. 213. – No. 3. – P. 399-405.
176. Lehman, W., Craig, R. Tropomyosin and the steric mechanism of muscle regulation // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 95-109.
177. Lehman, W., Craig, R., Vibert, P. Ca(2+)-induced tropomyosin movement in *Limulus* thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction // *Nature*. – 1994. – V. 368. – No. 6466. – P. 65-67.
178. Lehman, W., Hatch, V., Korman, V., Rosol, M., Thomas, L., Maytum, R., Geeves, M.A., Van Eyk, J.E., Tobacman, L.S., Craig, R. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – V. 302. – No. 3. – P. 593-606.
179. Lehman, W., Orzechowski, M., Li, X.E., Fischer, S., Raunser, S. Gestalt-binding of tropomyosin on actin during thin filament activation // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2013. – V. 34. – No. 3-4. – P. 155-163.
180. Lehman, W., Vibert, P., Uman, P., Craig, R. Steric-blocking by tropomyosin visualized in relaxed vertebrate muscle thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 251. – No. 2. – P. 191-196.
181. Lehrer, S.S., Geeves, M.A. The muscle thin filament as a classical cooperative/allosteric regulatory system // *Journal of Molecular Biology*. – 1998. – V. 277. – No. 5. – P. 1081-1089.

182. Lehrer, S.S., Morris, E.P. Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – V. 257. – No. 14. – P. 8073-8080.
183. Lehtokari, V.L., Ceuterick-de Groote, C., de Jonghe, P., Marttila, M., Laing, N.G., Pelin, K., Wallgren-Pettersson, C. Cap disease caused by heterozygous deletion of the beta-tropomyosin gene TPM2 // *Neuromuscular Disorders*. – 2007. – V. 17. – No. 6. – P. 433-442.
184. Lehtokari, V.L., Pelin, K., Sandbacka, M., Ranta, S., Donner, K., Muntoni, F., Sewry, C., Angelini, C., Bushby, K., Van den Bergh, P., Iannaccone, S., Laing, N.G., Wallgren-Pettersson, C. Identification of 45 novel mutations in the nebulin gene associated with autosomal recessive nemaline myopathy // *Human Mutation*. – 2006. – V. 27. – No. 9. – P. 946-956.
185. Li, X.E., Lehman, W., Fischer, S., Holmes, K.C. Curvature variation along the tropomyosin molecule // *Journal of Structural Biology*. – 2010a. – V. 170. – No. 2. – P. 307-312.
186. Li, X.E., Lehman, W., Fischer, S. The relationship between curvature, flexibility and persistence length in the tropomyosin coiled-coil // *Journal of Structural Biology*. – 2010b. – V. 170. – No. 2. – P. 313-318.
187. Li, X.E., Orzechowski, M., Lehman, W., Fischer, S. Structure and flexibility of the tropomyosin overlap junction // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – V. 446. – No. 1. – P. 304-308.
188. Li, X.E., Tobacman, L.S., Mun, J.Y., Craig, R., Fischer, S., Lehman, W. Tropomyosin position on F-actin revealed by EM reconstruction and computational chemistry // *Biophysical Journal*. – 2011. – V. 100. – No. 4. – P. 1005-1013.
189. Libri, D., Lemonnier, M., Meinel, T., Fiszman, M.Y. A single gene codes for the beta subunits of smooth and skeletal muscle tropomyosin in the chicken // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – V. 264. – No. 5. – P. 2935-2944.
190. Libri, D., Mouly, V., Lemonnier, M., Fiszman, M.Y. A nonmuscle tropomyosin is encoded by the smooth/skeletal beta-tropomyosin gene and its RNA is transcribed from an internal promoter // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – V. 265. – No. 6. – P. 3471-3473.
191. Lorenz, M., Poole, K.J., Popp, D., Rosenbaum, G., Holmes, K.C. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels // *Journal of Molecular Biology*. – 1995. – V. 246. – No. 1. – P. 108-119.
192. Lorenz, M., Popp, D., Holmes, K.C. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm // *Journal of Molecular Biology*. – 1993. – V. 234. – No. 3. – P. 826-836.
193. Lupas, A.N., Gruber, M. The structure of alpha-helical coiled coils // *Advances in Protein Chemistry*. – 2005. – V. 70. – P. 37-78.

194. Lynn, R.W., Taylor, E.W. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin // *Biochemistry*. – 1971. – V. 10. – No. 25. – P. 4617-4624.
195. MacLeod, A.R. Distinct alpha-tropomyosin mRNA sequences in chicken skeletal muscle // *European Journal of Biochemistry (FEBS)*. – 1982. – V. 126. – No. 2. – P. 293-297.
196. MacLeod, A.R., Houliker, C., Reinach, F.C., Smillie, L.B., Talbot, K., Modi, G., Walsh, F.S. A muscle-type tropomyosin in human fibroblasts: evidence for expression by an alternative RNA splicing mechanism // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – V. 82. – No. 23. – P. 7835-7839.
197. Mak, A.S., Smillie, L.B., Stewart, G.R. A comparison of the amino acid sequences of rabbit skeletal muscle alpha- and beta-tropomyosins // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1980. – V. 255. – No. 8. – P. 3647-3655.
198. Margossian, S.S., Lowey, S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle // *Methods in Enzymology*. – 1982. – V. 85. – P. 55-71.
199. Marston, S., Memo, M., Messer, A., Papadaki, M., Nowak, K., McNamara, E., Ong, R., El-Mezgueldi, M., Li, X., Lehman, W. Mutations in repeating structural motifs of tropomyosin cause gain of function in skeletal muscle myopathy patients // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – V. 22. – No. 24. – P. 4978-4987.
200. Marttila, M., Lehtokari, V.L., Marston, S., Nyman, T.A., Barnerias, C., Beggs, A.H., Bertini, E., Ceyhan-Birsoy, O., Cintas, P., Gerard, M., Gilbert-Dussardier, B., Hogue, J.S., Longman, C., Eymard, B., Frydman, M., Kang, P.B., Klinge, L., Kolski, H., Lochmüller, H., Magy, L., Manel, V., Mayer, M., Mercuri, E., North, K.N., Peudenier-Robert, S., Pihko, H., Probst, F.J., Reisin, R., Stewart, W., Taratuto, A.L., de Visser, M., Wilichowski, E., Winer, J., Nowak, K., Laing, N.G., Winder, T.L., Monnier, N., Clarke, N.F., Pelin, K., Grönholm, M., Wallgren-Pettersson, C. Mutation update and genotype-phenotype correlations of novel and previously described mutations in TPM2 and TPM3 causing congenital myopathies // *Human Mutation*. – 2014. – V. 35. – No. 7. – P. 779-790.
201. Marttila, M., Lemola, E., Wallefeld, W., Memo, M., Donner, K., Laing, N.G., Marston, S., Grönholm, M., Wallgren-Pettersson, C. Abnormal actin binding of aberrant β -tropomyosins is a molecular cause of muscle weakness in TPM2-related nemaline and cap myopathy // *The Biochemical Journal*. – 2012. – V. 442. – No. 1. – P. 231-239.
202. Maytum, R., Hatch, V., Konrad, M., Lehman, W., Geeves, M.A. Ultra short yeast tropomyosins show novel myosin regulation // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – No. 4. – P. 1902-1910.
203. McKane, M., Wen, K.K., Meyer, A., Rubenstein, P.A. Effect of the substitution of muscle actin-specific subdomain 1 and 2 residues in yeast actin on actin function // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – No. 40. – P. 29916-29928.

204. McKillop, D.F., Geeves, M.A. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament // *Biophysical Journal*. – 1993. – V. 65. – No. 2. – P. 693-701.
205. McLachlan, A.D., Stewart, M. The 14-fold periodicity in alpha-tropomyosin and the interaction with actin // *Journal of Molecular Biology*. – 1976. – V. 103. – No. 2. – P. 271-298.
206. McLachlan, A.D., Stewart, M. Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – V. 98. – No. 2. – P. 293-304.
207. McLachlan, A.D., Stewart, M., Smillie, L.B. Sequence repeats in alpha-tropomyosin // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – V. 98. – No. 2. – P. 281-291.
208. Meedel, T.H., Hastings, K.E. Striated muscle-type tropomyosin in a chordate smooth muscle, ascidian body-wall muscle // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – V. 268. – No. 9. – P. 6755-6764.
209. Memo, M., Marston, S. Skeletal muscle myopathy mutations at the actin tropomyosin interface that cause gain- or loss-of-function // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2013. – V. 34. – No. 3-4. – P. 165-169.
210. Michele, D.E., Albayya, F.P., Metzger, J.M. A nemaline myopathy mutation in alpha-tropomyosin causes defective regulation of striated muscle force production // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1999. – V. 104. – No. 11. – P. 1575-1581.
211. Milligan, R.A., Whittaker, M., Safer, D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites // *Nature*. – 1990. – V. 348. – No. 6298. – P. 217-221.
212. Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Wakabayashi, K., Nitandai, Y., Maéda, Y. Two-crystal structures of tropomyosin C-terminal fragment 176-273: exposure of the hydrophobic core to the solvent destabilizes the tropomyosin molecule // *Biophysical Journal*. – 2008. – V. 95. – No. 2. – P. 710-719.
213. Mirza, M., Marston, S., Willott, R., Ashley, C., Mogensen, J., McKenna, W., Robinson, P., Redwood, C., Watkins, H. Dilated cardiomyopathy mutations in three thin filament regulatory proteins result in a common functional phenotype // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – No. 31. – P. 28498-28506.
214. Miwa, T., Manabe, Y., Kurokawa, K., Kamada, S., Kanda, N., Bruns, G., Ueyama, H., Kakunaga, T. Structure, chromosome location, and expression of the human smooth muscle (enteric type) gamma-actin gene: evolution of six human actin genes // *Molecular and Cellular Biology*. – 1991. – V. 11. – No. 6. – P. 3296-3306.
215. Mokbel, N., Ilkovski, B., Kreissl, M., Memo, M., Jeffries, C.M., Marttila, M., Lehtokari, V.L., Lemola, E., Grönholm, M., Yang, N., Menard, D., Marcorelles, P., Echaniz-Laguna, A., Reimann, J., Vainzof, M., Monnier, N., Ravenscroft, G., McNamara, E., Nowak, K.J., Laing, N.G., Wallgren-Pettersson, C., Trehwella, J., Marston, S., Ottenheijm, C., North, K.N., Clarke, N.F. K7del is a common

TPM2 gene mutation associated with nemaline myopathy and raised myofibre calcium sensitivity // *Brain*. – 2013. – V. 136. – No. 2. – P. 494-507.

216. Monnier, N., Lunardi, J., Marty, I., Mezin, P., Labarre-Vila, A., Dieterich, K., Jouk, P.S. Absence of beta-tropomyosin is a new cause of Escobar syndrome associated with nemaline myopathy // *Neuromuscular Disorders*. – 2009. – V. 19. – No. 2. – P. 118-123.

217. Moore, P.B., Huxley, H.E., DeRosier, D.J. Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 1970. – V. 50. – No. 2. – P. 279-295.

218. Moraczewska, J., Greenfield, N.J., Liu, Y., Hitchcock-DeGregori, S.E. Alteration of tropomyosin function and folding by a nemaline myopathy-causing mutation // *Biophysical Journal*. – 2000. – V. 79. – No. 6. – P. 3217-3225.

219. Morales, M.F. Calculation of the polarized fluorescence from a labeled muscle fiber // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1984. – V. 81. – No. 1. – P. 145-149.

220. Mornet, D., Bertrand, R., Pantel, P., Audemard, E., Kassab, R. Structure of the actin-myosin interface // *Nature*. – 1981. – V. 292. – No. 5821. – P. 301-306.

221. Munot, P., Lashley, D., Jungbluth, H., Feng, L., Pitt, M., Robb, S.A., Palace, J., Jayawant, S., Kennet, R., Beeson, D., Cullup, T., Abbs, S., Laing, N., Sewry, C., Muntoni, F. Congenital fibre type disproportion associated with mutations in the tropomyosin 3 (TPM3) gene mimicking congenital myasthenia // *Neuromuscular Disorders*. – 2010. – V. 20. – No. 12. – P. 796-800.

222. Nihei, T., Mendelson, R.A., Botts, J. Use of fluorescence polarization to observe changes in attitude of S-1 moieties in muscle fibers // *Biophysical Journal*. – 1974. – V. 14. – No. 3. – P. 236-242.

223. Nitanaï, Y., Minakata, S., Maeda, K., Oda, N., Maéda, Y. Crystal structures of tropomyosin: flexible coiled-coil // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2007. – V. 592. – P. 137-151.

224. North, K.N., Laing, N.G., Wallgren-Pettersson, C. Nemaline myopathy: current concepts. The ENMC International Consortium and Nemaline Myopathy // *Journal of Medical Genetics*. – 1997. – V. 34. – No. 9. – P. 705-713.

225. Ochala, J., Iwamoto, H., Larsson, L., Yagi, N. A myopathy-linked tropomyosin mutation severely alters thin filament conformational changes during activation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – V. 107. – No. 21. – P. 9807-9812.

226. Ochala, J., Li, M., Ohlsson, M., Oldfors, A., Larsson, L. Defective regulation of contractile function in muscle fibres carrying an E41K beta-tropomyosin mutation // *The Journal of Physiology*. – 2008. – V. 586. – No. 12. – P. 2993-3004.

227. Ochala, J., Li, M., Tajsharghi, H., Kimber, E., Tulinius, M., Oldfors, A., Larsson, L. Effects of a R133W beta-tropomyosin mutation on regulation of muscle contraction in single human muscle fibres // *The Journal of Physiology*. – 2007. – V. 581. – No. 3. – P. 1283-1292.
228. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., Narita, A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition // *Nature*. – 2009. – V. 457. – No. 7228. – P. 441-445.
229. Oda, T., Namba, K., Maéda, Y. Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis // *Biophysical Journal*. – 2005. – V. 88. – No. 4. – P. 2727-2736.
230. Ohlsson, M., Fidzianska, A., Tajsharghi, H., Oldfors, A. TPM3 mutation in one of the original cases of cap disease // *Neurology*. – 2009. – V. 72. – No. 22. – P. 1961-1963.
231. Ohlsson, M., Quijano-Roy, S., Darin, N., Brochier, G., Lacène, E., Avila-Smirnow, D., Fardeau, M., Oldfors, A., Tajsharghi, H. New morphologic and genetic findings in cap disease associated with beta-tropomyosin (TPM2) mutations // *Neurology*. – 2008. – V. 71. – No. 23. – P. 1896-1901.
232. Okamoto, Y., Sekine, T. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin // *Journal of Biochemistry*. – 1985. – V. 98. – No. 4. – P. 1143-1145.
233. Onishi, H., Nitani, Y. Thiol reactivity as a sensor of rotation of the converter in myosin // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – V. 369. – No. 1. – P. 115-123.
234. O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S., Alber, T. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil // *Science*. – 1991. – V. 254. – No. 5031. – P. 539-544.
235. Ottenheijm, C.A., Lawlor, M.W., Stienen, G.J., Granzier, H., Beggs, A.H. Changes in cross-bridge cycling underlie muscle weakness in patients with tropomyosin 3-based myopathy // *Human Molecular Genetics*. – 2011. – V. 20. – No. 15. – P. 2015-2025.
236. Otterbein, L.R., Graceffa, P., Dominguez, R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state // *Science*. – 2001. – V. 293. – No. 5530. – P. 708-711.
237. Owen, C.H., Morgan, D.G., DeRosier, D.J. Image analysis of helical objects: the Brandeis Helical Package // *Journal of Structural Biology*. – 1996. – V. 116. – No. 1. – P. 167-175.
238. Page, R., Lindberg, U., Schutt, C.E. Domain motions in actin // *Journal of Molecular Biology*. – 1998. – V. 280. – No. 3. – P. 463-474.
239. Parry, D.A. Analysis of the primary sequence of alpha-tropomyosin from rabbit skeletal muscle // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – V. 98. – No. 3. – P. 519-535.
240. Parry, D.A., Squire, J.M. Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles // *Journal of Molecular Biology*. – 1973. – V. 75. – No. 1. – P. 33-55.
241. Perry, S.V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2001. – V. 22. – No. 1. – P. 5-49.

242. Phang, J.M., Pandhare, J., Liu, Y. The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate // *The Journal of Nutrition*. – 2008. – V. 138. – No. 10. – P. 2008S-2015S.
243. Phillips, G.N. Jr., Chacko, S. Mechanical properties of tropomyosin and implications for muscle regulation // *Biopolymers*. – 1996. – V. 38. – No. 1. – P. 89-95.
244. Phillips, G.N. Jr., Fillers, J.P., Cohen, C. Motions of tropomyosin. Crystal as metaphor // *Biophysical Journal*. – 1980. – V. 32. – No. 1. – P. 485-502.
245. Phillips, G.N. Jr., Fillers, J.P., Cohen, C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation // *Journal of Molecular Biology*. – 1986. – V. 192. – No. 1. – P. 111-131.
246. Phillips, G.N. Jr., Lattman, E.E., Cummins, P., Lee, K.Y., Cohen, C. Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin // *Nature*. – 1979. – V. 278. – No. 5703. – P. 413-417.
247. 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. An atomic model of the thin filament in the relaxed and Ca²⁺-activated states // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – V. 357. – No. 3. – P. 707-717.
248. Pirani, A., Xu, C., Hatch, V., Craig, R., Tobacman, L.S., Lehman, W. Single particle analysis of relaxed and activated muscle thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – V. 346. – No. 3. – P. 761-772.
249. Pollard, T.D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 2007. – V. 36. – P. 451-457.
250. Pollard, T.D., Korn, E.D. Acanthamoeba myosin. II. Interaction with actin and with a new cofactor protein required for actin activation of Mg²⁺ adenosine triphosphatase activity // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1973. – V. 248. – No. 13. – P. 4691-4697.
251. Poole, K.J., Lorenz, M., Evans, G., Rosenbaum, G., Pirani, A., Craig, R., Tobacman, L.S., Lehman, W., Holmes, K.C. A comparison of muscle thin filament models obtained from electron microscopy reconstructions and low-angle X-ray fibre diagrams from non-overlap muscle // *Journal of Structural Biology*. – 2006. – V. 155. – No. 2. – P. 273-284.
252. Poole, K.J.V., Evans, G., Rosenbaum, G., Lorenz, M., Holmes, K.C. The effect of crossbridges on the calcium sensitivity of the structural change of the regulated thin filament // *Biophysical Journal*. – 1995. – V. 68. – No. 2 (part 2). – P. A365.
253. Popp, D., Lednev, V.V., Jahn, W. Methods of preparing well-orientated sols of f-actin containing filaments suitable for X-ray diffraction // *Journal of Molecular Biology*. – 1987. – V. 197. – No. 4. – P. 679-684.
254. Potekhin, S.A., Privalov, P.L. Co-operative blocks in tropomyosin // *Journal of Molecular Biology*. – 1982. – V. 159. – No. 3. – P. 519-535.

255. Prochniewicz, E., Yanagida, T. Inhibition of sliding movement of F-actin by crosslinking emphasizes the role of actin structure in the mechanism of motility // *Journal of Molecular Biology*. – 1990. – V. 216. – No. 3. – P. 761-772.
256. Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., Milligan, R.A. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction // *Science*. – 1993a. – V. 261. – No. 5117. – P. 58-65.
257. Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., Holden, H.M. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor // *Science*. – 1993b. – V. 261. – No. 5117. – P. 50-58.
258. Richards, T.A., Cavalier-Smith, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes // *Nature*. – 2005. – V. 436. – No. 7054. – P. 1113-1118.
259. Robaszkiewicz, K., Dudek, E., Kasprzak, A.A., Moraczewska, J. Functional effects of congenital myopathy-related mutations in gamma-tropomyosin gene // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1822. – No. 10. – P. 1562-1569.
260. Robaszkiewicz, K., Ostrowska, Z., Cyranka-Czaja, A., Moraczewska, J. Impaired tropomyosin-troponin interactions reduce activation of the actin thin filament // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015. – V. 1854. – No. 5. – P. 381-390.
261. Robinson, P., Lipscomb, S., Preston, L.C., Altin, E., Watkins, H., Ashley, C.C., Redwood, C.S. Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and beta-tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function // *FASEB Journal*. – 2007. – V. 21. – No. 3. – P. 896-905.
262. Roopnarine, O., Thomas, D.D. Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin-labeled myosin heads in muscle fibers // *Biophysical Journal*. – 1996. – V. 70. – No. 6. – P. 2795-2806.
263. Rosol, M., Lehman, W., Craig, R., Landis, C., Butters, C., Tobacman, L.S. Three-dimensional reconstruction of thin filaments containing mutant tropomyosin // *Biophysical Journal*. – 2000. – V. 78. – No. 2. – P. 908-917.
264. Rould, M.A., Wan, Q., Joel, P.B., Lowey, S., Trybus, K.M. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – No. 42. – P. 31909-31919.
265. Ruiz-Opazo, N., Nadal-Ginard, B. Alpha-tropomyosin gene organization. Alternative splicing of duplicated isotype-specific exons accounts for the production of smooth and striated muscle isoforms // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – V. 262. – No. 10. – P. 4755-4765.
266. Ruiz-Opazo, N., Weinberger, J., Nadal-Ginard, B. Comparison of alpha-tropomyosin sequences from smooth and striated muscle // *Nature*. – 1985. – V. 315. – No. 6014. – P. 67-70.

267. Ryan, M.M., Schnell, C., Strickland, C.D., Shield, L.K., Morgan, G., Iannaccone, S.T., Laing, N.G., Beggs, A.H., North, K.N. Nemaline myopathy: a clinical study of 143 cases // *Annals of Neurology*. – 2001. – V. 50. – No. 3. – P. 312-320.
268. Rysev, N.A., Karpicheva, O.E., Redwood, C.S., Borovikov, Y.S. The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1824. – No. 2. – P. 366-373.
269. Rysev, N.A., Nevzorov, I.A., Avrova, S.V., Karpicheva, O.E., Redwood, C.S., Levitsky, D.I., Borovikov, Y.S. Gly126Arg substitution causes anomalous behaviour of α -skeletal and β -smooth tropomyosins during the ATPase cycle // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – V. 543. – P. 57-66.
270. Sanoudou, D., Beggs, A.H. Clinical and genetic heterogeneity in nemaline myopathy--a disease of skeletal muscle thin filaments // *Trends in Molecular Medicine*. – 2001. – V. 7. – No. 8. – P. 362-368.
271. Schevzov, G., O'Neill, G. Tropomyosin gene expression in vivo and in vitro // In book: *Tropomyosin*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 43-59.
272. Schevzov, G., Vrhovski, B., Bryce, N.S., Elmir, S., Qiu, M.R., O'Neill, G.M., Yang, N., Verrills, N.M., Kavallaris, M., Gunning, P.W. Tissue-specific tropomyosin isoform composition // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 2005. – V. 53. – No. 5. – P. 557-570.
273. Schmid, M.F., Sherman, M.B., Matsudaira, P., Chiu, W. Structure of the acrosomal bundle // *Nature*. – 2004. – V. 430. – No. 7004. – P. 104-107.
274. Schnell, C., Kan, A., North, K.N. 'An artefact gone awry': identification of the first case of nemaline myopathy by Dr R.D.K. Reye // *Neurumuscular Disorders*. – 2000. – V. 10. – No. 4-5. – P. 307-312.
275. Schreckenbach, T., Schröder, J.M., Voit, T., Abicht, A., Neuen-Jacob, E., Roos, A., Bulst, S., Kuhl, C., Schulz, J.B., Weis, J., Claeys, K.G. Novel TPM3 mutation in a family with cap myopathy and review of the literature // *Neuromuscular Disorders*. – 2014. – V. 24. – No. 2. – P. 117-124.
276. Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., Lindberg, U. The structure of crystalline profilin-beta-actin // *Nature*. – 1993. – V. 365. – No. 6449. – P. 810-816.
277. Schwyter, D.H., Kron, S.J., Toyoshima, Y.Y., Spudich, J.A., Reisler, E. Subtilisin cleavage of actin inhibits in vitro sliding movement of actin filaments over myosin // *The Journal of Cell Biology*. – 1990. – V. 111. – No. 2. – P. 465-470.
278. Shy, G.M., Engel, W.K., Somers, J.E., Wanko, T. Nemaline myopathy. A new congenital myopathy // *Brain*. – 1963. – V. 86. – P. 793-810.

279. Singh, A., Hitchcock-DeGregori, S.E. Dual requirement for flexibility and specificity for binding of the coiled-coil tropomyosin to its target, actin // *Structure*. – 2006. – V. 14. – No. 1. – P. 43-50.
280. Singh, A., Hitchcock-DeGregori, S.E. Local destabilization of the tropomyosin coiled coil gives the molecular flexibility required for actin binding // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – No. 48. – P. 14114-14121.
281. Skoumpla, K., Coulton, A.T., Lehman, W., Geeves, M.A., Mulvihill, D.P. Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Journal of Cell Sciences*. – 2007. – V. 120. – No. 9. – P. 1635-1645.
282. Sleep, J.A., Hutton, R.L. Actin mediated release of ATP from a myosin-ATP complex // *Biochemistry*. – 1978. – V. 17. – No. 25. – P. 5423-5430.
283. Smith, C.A., Rayment, I. Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins // *Biophysical Journal*. – 1996. – V. 70. – No. 4. – P. 1590-1602.
284. Sodek, J., Hodges, R.S., Smillie, L.B., Jurasek, L. Amino-acid sequence of rabbit skeletal tropomyosin and its coiled-coil structure // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1972. – V. 69. – No. 12. – P. 3800-3804.
285. Sousa, D., Cammarato, A., Jang, K., Graceffa, P., Tobacman, L.S., Li, X.E., Lehman, W. Electron microscopy and persistence length analysis of semi-rigid smooth muscle tropomyosin strands // *Biophysical Journal*. – 2010. – V. 99. – No. 3. – P. 862-868.
286. Spudich, J.A., Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1971. – V. 246. – No. 15. – P. 4866-4871.
287. Squire, J. The structural basis of muscular contraction // Springer US. – 1981. – 698 pp.
288. Stewart, M., McLachlan, A.D. Fourteen actin-binding sites on tropomyosin? // *Nature*. – 1975. – V. 257. – No. 5524. – P. 331-333.
289. Stone, D., Smillie, L.B. The amino acid sequence of rabbit skeletal alpha-tropomyosin. The NH₂-terminal half and complete sequence // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1978. – V. 253. – No. 4. – P. 1137-1148.
290. Straub, F.B. Actin // *Studies from the Institute of Medical Chemistry, University of Szeged*. – 1942. – V. 2. – P. 3-15.
291. Straub, F.B. Note on the work of F. Bruno Straub concerning 'Adenosine Triphosphate. The Functional Group of Actin' // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1989. – V. 1000. – P. 179-195.
292. Sung, S.S., Brassington, A.M., Grannatt, K., Rutherford, A., Whitby, F.G., Krakowiak, P.A., Jorde, L.B., Carey, J.C., Bamshad, M. Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins

cause distal arthrogyriposis syndromes // *American Journal of Human Genetics*. – 2003. – V. 72. – No. 3. – P. 681-690.

293. Swenson, C.A., Stellwagen, N.C. Flexibility of smooth and skeletal tropomyosins // *Biopolymers*. – 1989. – V. 28. – No. 5. – P. 955-963.

294. Szent-Gyorgyi, A. Free-energy relations and contraction of actomyosin // *The Biological Bulletin*. – 1949. – V. 96. – No. 2. – P. 140-161.

295. Szent-Gyorgyi, A.G. Meromyosins, the subunits of myosin // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1953. – V. 42. – No. 2. – P. 305-320.

296. Tajsharghi, H., Ohlsson, M., Lindberg, C., Oldfors, A. Congenital myopathy with nemaline rods and cap structures caused by a mutation in the beta-tropomyosin gene (TPM2) // *Archives of Neurology*. – 2007. – V. 64. – No. 9. – P. 1334-1338.

297. Tan, P., Briner, J., Boltshauser, E., Davis, M.R., Wilton, S.D., North, K., Wallgren-Pettersson, C., Laing, N.G. Homozygosity for a nonsense mutation in the alpha-tropomyosin slow gene TPM3 in a patient with severe infantile nemaline myopathy // *Neuromuscular Disorders*. – 1999. – V. 9. – No. 8. – P. 573-579.

298. Tasca, G., Fattori, F., Ricci, E., Monforte, M., Rizzo, V., Mercuri, E., Bertini, E., Silvestri, G. Somatic mosaicism in TPM2-related myopathy with nemaline rods and cap structures // *Acta Neuropathologica*. – 2013. – V. 125. – No. 1. – P. 169-171.

299. Tilney, L.G., Egelman, E.H., DeRosier, D.J., Saunder, J.C. Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. II. Packing of actin filaments in the stereocilia and in the cuticular plate and what happens to the organization when the stereocilia are bent // *The Journal of Cell Biology*. – 1983. – V. 96. – No. 3. – P. 822-834.

300. Toutant, M., Fiszman, M.Y., Lemonnier, M. The muscle specific promoter of chick beta tropomyosin gene requires helix-loop-helix myogenic regulatory factors and ubiquitous transcription factors // *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. – 1993. – V. 316. – No. 8. – P. 711-715.

301. Tregear, R.T., Mendelson, R.A. Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle // *Biophysical Journal*. – 1975. – V. 15. – No. 5. – P. 455-467.

302. Ueno, H. Local structural changes in tropomyosin detected by a trypsin-probe method // *Biochemistry*. – 1984. – V. 23. – No. 20. – P. 4791-4798.

303. Ueyama, H., Hamada, H., Battula, N., Kakunaga, T. Structure of a human smooth muscle actin gene (aortic type) with a unique intron site // *Molecular and Cellular Biology*. – 1984. – V. 4. – No. 6. – P. 1073-1078.

304. Uyeda, T.Q., Abramson, P.D., Spudich, J.A. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – V. 93. – No. 3. – P. 4459-4464.
305. Vale, R.D., Milligan, R.A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins // *Science*. – 2000. – V. 288. – No. 5463. – P. 88-95.
306. Van den Ent, F., Amos, L.A., Löwe, J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton // *Nature*. – 2001. – V. 413. – No. 6851. – P. 39-44.
307. Vandekerckhove, J., Weber, K. Actin amino-acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin // *European Journal of Biochemistry (FEBS)*. – 1978. – V. 90. – No. 3. – P. 451-462.
308. Vibert, P., Craig, R., Lehman, W. Steric-model for activation of muscle thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 1997. – V. 266. – No. 1. – P. 8-14.
309. von der Ecken, J., Müller, M., Lehman, W., Manstein, D.J., Penczek, P.A., Raunser, S. Structure of the F-actin-tropomyosin complex // *Nature*. – 2015. – V. 519. – No. 7541. – P. 114-117.
310. Waddell, L.B., Kreissl, M., Kornberg, A., Kennedy, P., McLean, C., Labarre-Vila, A., Monnier, N., North, K.N., Clarke, N.F. Evidence for a dominant negative disease mechanism in cap myopathy due to TPM3 // *Neuromuscular Disorders*. – 2010. – V. 20. – No. 7. – P. 464-466.
311. Wallgren-Pettersson, C., Pelin, K., Hilpelä, P., Donner, K., Porfirio, B., Graziano, C., Swoboda, K.J., Fardeau, M., Urtizberea, J.A., Muntoni, F., Sewry, C., Dubowitz, V., Iannaccone, S., Minetti, C., Pedemonte, M., Seri, M., Cusano, R., Lammens, M., Castagna-Sloane, A., Beggs, A.H., Laing, N.G., de la Chapelle, A. Clinical and genetic heterogeneity in autosomal recessive nemaline myopathy // *Neuromuscular Disorders*. – 1999. – V. 9. – No. 8. – P. 564-572.
312. Weber, A., Herz, R., Reiss, I. Role of magnesium in the relaxation of myofibrils // *Biochemistry*. – 1969. – V. 8. – No. 6. – P. 2226-2271.
313. Wertman, K.F., Drubin, D.G., Botstein, D. Systematic mutational analysis of the yeast ACT1 gene // *Genetics*. – 1992. – V. 132. – No. 2. – P. 337-350.
314. Whitby, F.G., Phillips, G.N. Jr. Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution // *Proteins*. – 2000. – V. 38. – No. 1. – P. 49-59.
315. Wieczorek, D.F., Jagatheesan, G., Rajan, S. The role of tropomyosin in heart disease // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – P. 132-142.
316. Wieczorek, D.F., Smith, C.W., Nadal-Ginard, B. The rat alpha-tropomyosin gene generates a minimum of six different mRNAs coding for striated, smooth, and nonmuscle isoforms by alternative splicing // *Molecular and Cellular Biology*. – 1988. – V. 8. – No. 2. – P. 679-694.

317. Willadsen, K.A., Butters, C.A., Hill, L.E., Tobacman, L.S. Effects of the amino-terminal regions of tropomyosin and troponin T on thin filament assembly // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – No. 33. – P. 23746-23752.
318. Wilson, M.G., Mendelson, R.A. A comparison of order and orientation of crossbridges in rigor and relaxed muscle fibres using fluorescence polarization // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1983. – V. 4. – No. 6. – P. 671-693.
319. Wilton, S.D., Eyre, H., Akkari, P.A., Watkins, H.C., MacRae, C., Laing, N.G., Callen, D.C. Assignment of the human α -tropomyosin gene TPM3 to 1q22-->q23 by fluorescence in situ hybridization // *Cytogenetics and Cell Genetics*. – 1995. – V. 68. – No. 1-2. – P. 122-124.
320. Xu, C., Craig, R., Tobacman, L., Horowitz, R., Lehman, W. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy // *Biophysical Journal*. – 1999. – V. 77. – No. 2. – P. 985-992.
321. Yanagida, T., Oosawa, F. Polarized fluorescence from epsilon-ADP incorporated into F-actin in a myosin-free single fiber: conformation of F-actin and changes induced in it by heavy meromyosin // *Journal of Molecular Biology*. – 1978. – V. 126. – No. 3. – P. 507-524.
322. Yang, S., Barbu-Tudoran, L., Orzechowski, M., Craig, R., Trinick, J., White, H., Lehman, W. Three-dimensional organization of troponin on cardiac muscle thin filaments in the relaxed state // *Biophysical Journal*. – 2014. – V. 106. – No. 4. – P. 855-864.
323. Yang, Y., Gourinath, S., Kovács, M., Nyitray, L., Reutzler, R., Himmel, D.M., O'Neill-Hennessey, E., Reshetnikova, L., Szent-Györgyi, A.G., Brown, J.H., Cohen, C. Rigor-like structures from muscle myosins reveal key mechanical elements in the transduction pathways of this allosteric motor // *Structure*. – 2007. – V. 15. – No. 5. – P. 553-564.
324. Yengo, C.M., De La Cruz, E.M., Chrin, L.R., Gaffney, D.P., Berger, C.L. Actin-induced closure of the actin-binding cleft of smooth muscle myosin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – No. 27. – P. 24114-24119.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю слова искренней благодарности, в первую очередь, своему научному руководителю, заведующей кафедрой биофизики, д.б.н., профессору Зое Ириарховне Крутецкой за предоставление возможности заниматься настоящим исследованием, за ценные замечания по написанию текста диссертации и проявленное терпение.

Выражаю также благодарность за ценные замечания и неоценимый вклад в выполнении диссертационного исследования заведующему лабораторией молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН, д.б.н., профессору Юрию Сергеевичу Боровикову.

Благодарю заведующую кафедрой биохимии и клеточной биологии университета им. Казимира Великого в г. Быдгощ, доктора, Иоанну Морачевскую и профессора кафедры медицины Оксфордского университета Чарльза Рэдвуда за предоставление рекомбинантных α - и β -тропомиозинов дикого типа и с мутациями, без которых настоящая работа не состоялась бы.