

*На правах рукописи*

КАРПИЧЕВА

Ольга Евгеньевна

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРОПОМИОЗИНОМ  
АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

03.00.25 – Гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институт цитологии РАН.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, проф.  
**Юрий Сергеевич Боровиков**  
Институт цитологии РАН

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, проф.  
**Владимир Иосифович Воробьев**  
Институт цитологии РАН

доктор биологических наук, проф.  
**Дмитрий Иванович Левицкий**  
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

**Ведущая организация:** Институт биологии моря  
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Защита состоится 18 декабря 2009 года в 15 ч. на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт института: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)

Адрес электронной почты института: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института цитологии РАН.

Автореферат разослан 17 ноября 2009 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования.

Молекулярные механизмы мышечного сокращения являются предметом интенсивных исследований многих лабораторий. Актуальность этих исследований обусловлена тем, что, несмотря на огромный объем имеющихся данных, многие фундаментальные аспекты мышечного сокращения и его регуляции остаются до сих пор невыясненными. Кроме того, при различных заболеваниях сердечных и скелетных мышц, таких как дилатационная и гипертрофическая кардиомиопатии, немалиновая миопатия, обнаружены мутации в генах сократительных и регуляторных белков, приводящие к серьезным функциональным нарушениям. Выяснение молекулярных механизмов нарушения сократительной функции мышц может иметь существенное значение для ранней диагностики и генной терапии мышечных болезней.

Известно, что в основе мышечного сокращения лежит циклическое взаимодействие головок миозина с актином, сопровождаемое гидролизом аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). В скелетных и сердечных мышцах основная регуляция взаимодействия миозина с актином осуществляется  $Ca^{2+}$ -зависимым образом тропонин-тропомиозиновым комплексом (ТН-ТМ), расположенным на актиновой нити. Наиболее популярная в настоящее время модель стерического блокирования предполагает, что регуляция мышечного сокращения осуществляется движением тропомиозина по поверхности актиновой нити относительно областей взаимодействия миозина с актином [1, 2]. Считается, что связывание ионов  $Ca^{2+}$  тропонином индуцирует структурные перестройки ТН-ТМ, вследствие которых тропомиозин смещаясь к центру тонкой нити открывает области взаимодействия миозина с актином. В гладких мышцах функцию тропонина, вероятно, выполняют кальдесмон (CaD) и  $Ca^{2+}$ -связывающие белки [3, 4]. Активация сокращения гладких мышц, также как и поперечно-полосатых мышц, сопровождается движением тропомиозина на тонкой нити. Однако в гладких мышцах при ингибировании АТФазы миозина тропомиозин не закрывает потенциальные области связывания миозина на актиновой нити [5]. Различие в расположении тропомиозиновой молекулы относительно актина в разных мышечных системах становится не столь существенным, если предположить, что кальдесмон в гладких мышцах и тропонин в поперечно-полосатых мышцах во взаимодействии с тропомиозином способны изменять структурное состояние актина [6]. Возможно, что регуляция тонкой нити осуществляется не только в результате механического блокирования тропомиозином областей взаимодействия миозина с акти-

ном, но также аллостерически – вследствие сложных конформационных изменений всего ансамбля мышечных белков. Возможность такого способа регуляции поддерживается биохимическими данными (см. обзор: [7]) и может разрешить многие противоречия модели стерического блокирования актин-миозинового взаимодействия. Однако механизмы аллостерической регуляции мышечного сокращения остаются малоизученными. Таким образом, актуальность изучения молекулярных механизмов регуляции тропомиозином актин-миозинового взаимодействия, и, в частности, конформационных изменений сократительных и регуляторных белков, не вызывает сомнений.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы состояла в изучении молекулярных механизмов регуляции скелетным и гладкомышечным тропомиозином актин-миозинового взаимодействия. В задачи исследования входило:

1. Исследовать конформационные перестройки актина и миозина, происходящие в мышечном волокне в цикле гидролиза АТФ.
2. Изучить молекулярные механизмы регуляции тропонин-тропомиозиновой и кальдесмон-тропомиозиновой регуляторными системами актин-миозинового взаимодействия.
3. Исследовать влияние точечных мутаций Glu117Lys и Gln147Pro тропомиозина, связанных с немалиновой миопатией, на регуляцию взаимодействия миозина с актином в АТФазном цикле.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В цикле гидролиза АТФ существует несколько промежуточных структурных состояний ансамбля мышечных белков (актина, миозина и тропомиозина), находящихся в динамическом равновесии. Эти состояния отличаются друг от друга конформацией головок миозина и мономеров актина, характеризующейся различной пространственной организацией и подвижностью SH1 спирали миозина и субдомена 1 актина. Каждому промежуточному состоянию актомиозина соответствует определенное структурное состояние тропомиозина, характеризующееся различной позицией и подвижностью этого белка на поверхности актиновой нити.
2. Регуляция актин-миозинового взаимодействия ТН-ТМ может осуществляться взаимозависимыми конформационными перестройками актина, миозина и тропомиозина. При низкой концентрации  $Ca^{2+}$  ТН-ТМ ингибирует АТФазный цикл актомиозина, смещая тропомиозин к периферии тонкой нити, ограничивая миозин-зависимые движения тропомиозина и фиксируя актин в «выключенном» состоянии, при котором

миозиновые головки, связанные с актином, не способны генерировать силу. При высокой концентрации  $Ca^{2+}$  тропонин сдвигает тропомиозин ближе к центру тонкой нити при формировании сильной формы связывания миозина с актином и дальше к периферии тонкой нити при слабом связывании этих белков, таким способом увеличивая амплитуду внутримолекулярных движений тропомиозина и актомиозина в цикле гидролиза АТФ, что может приводить к увеличению эффективности работы поперечных мостиков.

3. В гладкомышечной регуляторной системе дефосфорилированный кальдесмон ингибирует АТФазный цикл актомиозина, сдвигая тропомиозин к периферии тонкой нити, ограничивая миозин-зависимые движения тропомиозина и фиксируя конформацию актина в «выключенном» состоянии.

4. Мутации Glu117Lys и Gln147Pro тропомиозина, связанные с наследственной немалиновой миопатией, вызывают смещение тропомиозинового тяжа к периферии тонкой нити и ингибируют движения тропомиозина на поверхности актина в цикле гидролиза АТФ, что может вызвать нарушение согласованной работы ансамбля мышечных белков, сдвигая равновесие сократительной системы к слабосвязанному структурному состоянию.

**Научная новизна исследований.** Впервые показано, что в мышечном волокне в АТФазном цикле существует несколько структурных состояний актомиозиновой системы, отличающихся друг от друга подвижностью и пространственной организацией SH1 спирали миозина и субдомена 1 актина. Каждому промежуточному состоянию актомиозина соответствует определенное структурное состояние тропомиозина, характеризующееся различной подвижностью и позицией этого белка на поверхности актиновой нити. Получены приоритетные данные о том, что регуляция актин-миозинового взаимодействия в скелетных и гладких мышцах может осуществляться взаимозависимыми конформационными перестройками актина, миозина и тропомиозина. Показано, что тропонин и  $Ca^{2+}$  способны модифицировать влияние нуклеотидов на структурное состояние ансамбля актина, миозина и тропомиозина, что может быть причиной активации гидролиза АТФ при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  и ингибирования гидролиза при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ . Обнаружено, что дефосфорилированный кальдесмон, фиксируя тропомиозин на периферии тонкой нити, ингибирует смещение субдомена 1 актина и SH1 спирали миозина к периферии тонкой нити и подавляет формирование сильных форм связывания актомиозина, что может приводить к ингибированию гидролиза АТФ. Впервые показано, что одной из причин

ослабления сократительной функции скелетных мышц при немалиновой миопатии является ингибирование движения тропомиозина по поверхности тонкой нити в цикле гидролиза АТФ.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные данные расширяют и углубляют представления о молекулярных механизмах клеточной подвижности и могут быть использованы при чтении курсов лекций по цитологии, клеточной биологии, биофизике, биохимии и физиологии. Впервые обнаруженное нами ингибирование движения скелетного тропомиозина по поверхности тонкой нити в цикле гидролиза АТФ, вызванное мутациями Glu117Lys и Gln147Pro тропомиозина, имеет большое значение для выяснения молекулярных механизмов ослабления сократительной функции скелетных мышц при наследственной немалиновой миопатии. Результаты работы могут быть полезны при разработке методов диагностики некоторых болезней мышечной ткани.

**Апробация работы.** По теме диссертации опубликовано **9** статей в рецензируемых изданиях и **13** тезисов. Материалы диссертации были представлены на Европейских мышечных конференциях (Монпелье, Франция, 2003; о. Эльба, Италия, 2004; Хортобадь, Венгрия, 2005; Стокгольм, Швеция, 2007; Оксфорд, Великобритания, 2008), на международном симпозиуме “Биологическая подвижность” (Пушино, 2004) и на научных семинарах лаборатории Молекулярных основ клеточной подвижности ИИЦ РАН.

**Финансовая поддержка работы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 01-04-49310, № 05-04-48812а, № 08-04-00960), Программы «Ведущие научные школы РФ» (НШ-9396.2006.4; НШ-1961.2008.4), ФАНИ (Госконтракты № 02.445.11.7338 от 09.06.2006 и № 02.512.11. 2108 от 01.06.2007 г.), ИНТАС (проект 01-0516), стипендии Федерации Европейских биохимических обществ (FEBS) и гранта Администрации г. Санкт-Петербурга.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на страницах машинописного текста и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 249 источников. Иллюстративный материал представлен 25 рисунками и 4 таблицами.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе рассмотрены структура и функции мышечных белков: актина, миозина, тропомиозина и кальдесмона. Особое внимание уделено описанию имеющихся в литературе данных о молекулярных механизмах регуляции тропомиозином актин-миозинового взаимодействия в скелетных и гладких мышцах. Приведены данные исследований влияния точечных мутаций в тропомиозине, связанных с различными наследственными заболеваниями, на структуру и функцию этого регуляторного белка. В заключение представлены результаты изучения механизмов мышечного сокращения, полученные с помощью метода поляризационной флуориметрии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** Работа выполнена на одиночных «теневых» мышечных волокнах скелетных мышц кролика, в которые были инкорпорированы скелетный тропомиозин и тропонин или гладкомышечный тропомиозин и кальдесмон и субфрагмент-1 миозина [8, 9]. В некоторых экспериментах в теневые волокна инкорпорировали G-актин. Гладкомышечный тропомиозин и кальдесмон получали из мускулатуры желудка утки или курицы [10]. Миозин и актин выделяли из скелетных мышц кролика [11, 12]. Субфрагмент-1 миозина получали перевариванием миозина  $\alpha$ -химотрипсином в весовом соотношении 1:300 [13]. Концентрацию белков определяли с помощью спектрофотометра СФ-46, используя известные коэффициенты поглощения. Тропомиозин и тропонин скелетных мышц человека экспрессировали в клетках BL21(DE3)pLysS *Escherichia coli* (Novagen®) [14]. Точечные мутации Glu117Lys и Gln147Pro встраивали в нормальную последовательность ДНК тропомиозина методом сайт-направленного мутагенеза. Образцы ДНК были сиквенированы в Отделе биохимии Университета г. Оксфорда. Белки очищали методом ионообменной хроматографии. Для реконструкции тропонинового комплекса субъединицы С, Т и И смешивали в равном молярном соотношении и диализовали в несколько этапов с постепенным снижением ионной силы. Полученные препараты мышечных белков визуализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) [15].

**Окрашивание мышечных белков флуоресцентными красителями.** Цис707 субфрагмента-1 миозина и Цис374 G-актина специфически окрашивали N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)этилен-диамином (1,5-IAEDANS) [16, 17]. F-актин теневых волокон метили с помощью фаллоидина, связанного с флуоресцеин-5-

изотиоцианатом (FITC) или тетраметилпродамин-изотиоцианатом (TRITC) [18]. Кальдесмон окрашивали акрилоданом по Цис580 [19]. Связывание TRITC-фаллоидина к актину теневого волокна контролировали с помощью конфокального микроскопа TSC2 (Leica). Рекомбинантный  $\beta$ -тропомиозин, содержащий в своей структуре один цистеиновый остаток Цис36, окрашивали 5-йодоацетоамидо-флуоресцеином (5-IAF) [20]. Мечение Цис36 и Цис190 гладкомышечного тропомиозина осуществляли без диссоциации  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц с помощью 1,5-IAEDANS и 5-IAF, соответственно. Специфичность окрашивания препаратов определяли методом SDS-электрофореза в ПААГ с последующей визуализацией гелей в ультрафиолетовом свете.

**Метод поляризационной микрофлуориметрии.** Флуоресцентные зонды, связанные с белками мышечного волокна, повторяют строго упорядоченное пространственное расположение этих белков и соответствующих аминокислотных остатков, с которыми они связаны. Анизотропное расположение флуорофоров приводит к появлению поляризованной флуоресценции, анализ которой позволяет выяснить, как в среднестатистической молекуле белка расположены флуоресцентные зонды и какова их подвижность. При анализе результатов настоящей работы использовали модель-зависимый метод [21-25]. Предполагали, что, элементарные акты поглощения и излучения света осуществляются линейными диполями поглощения (A) и излучения (E), жестко связанными с молекулой флуорофора. Углы ориентации диполей поглощения  $\Phi_A$  или излучения  $\Phi_E$ , а также относительное количество хаотически расположенных флуорофоров N вычисляли, измерив интенсивности четырех компонентов поляризованной флуоресценции зонда при ориентации мышечного волокна параллельно ( $|||$ ,  $||\perp$ ) и перпендикулярно ( $\perp\perp$ ,  $\perp||$ ) плоскости поляризации возбуждающего света [21, 25, 26]. Регистрацию интенсивностей поляризованной флуоресценции производили с помощью поляризационного флуориметра [27]. Флуоресценцию акрилодана, 5-IAF, FITC- и TRITC-фаллоидина регистрировали в области 500-600 нм после возбуждения при  $437 \pm 5$  нм. Для 1,5-IAEDANS длина возбуждающего света составляла  $365 \pm 5$  нм.

Поскольку поляризованная флуоресценция красителя чувствительна к изменению конформации белка, с которым он связан, а присутствие красителя не оказывает существенного влияния на свойства белка [16, 20, 28, 29], то изменения параметров поляризованной флуоресценции красителя можно рассматривать как свидетельство конформационных перестроек белка, происходящих при мышечном сокращении. Изменение значений  $\Phi_E$  (или  $\Phi_A$ ) и N интерпретировали как изменение в ори-



ентации участка полипептидной цепи относительно оси мышечного волокна в области локализации зонда и изменение подвижности этого участка, соответственно. Характер изменения  $\Phi_A$ , как правило, совпадал с характером изменения  $\Phi_E$  и поэтому при анализе результатов работы представлены значения только одной из этих величин. Изменения параметров поляризованной флуоресценции зондов были обратимы во всех экспериментах. Статистическую достоверность изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента 0,05%.

Измерения осуществляли в растворе, содержащем 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 6,7 мМ фосфатный буфер, pH 7,0, 4 мМ этиленгликольтетраацетат (EGTA) ( $pCa \geq 7$ ) или 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub> ( $pCa \leq 5$ ). Моделирование промежуточных структурных состояний актомиозинового комплекса осуществляли с помощью нуклеотидов или их аналогов: 5 мМ MgATP, 25 мМ MgATP $\gamma$ S или 15 мМ MgAMP-PNP для симуляции слабых форм связывания и 2,5 мМ MgADP или в отсутствие нуклеотида для моделирования сильных форм связывания миозина с актином [30-32].

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние скелетного тропомиозина, тропонина и Ca<sup>2+</sup> на структурное состояние субфрагмента-1 миозина и актина в АТФазном цикле.

Согласно современным представлениям, генерация силы миозиновым поперечным мостиком осуществляется при изменении ориентации регуляторного домена головки миозина в процессе гидролиза АТФ [33]. Актиновая нить рассматривается как относительно пассивный компонент сократительной системы. Результаты настоящей работы существенно дополняют эти представления, указывая на то, что в цикле гидролиза АТФ происходят многоступенчатые и взаимозависимые структурные перестройки моторного домена головки миозина и актина, которые, по видимому, определяют эффективность работы актомиозинового мотора (рис. 1). Регуляция взаимодействия миозина с актином реализуется не только стерическим блокированием тропонин-тропомиозиновым комплексом сайтов связывания миозина на актине, а также аллостерически – с помощью сложных конформационных перестроек ансамбля мышечных белков (актина, миозина и тропомиозина).

Как следует из рис. 1, а, б, каждой моделируемой стадии цикла гидролиза АТФ соответствует определенная ориентация и подвижность зондов 1,5-IAEDANS, связанных с Цис707 в области SH1 спирали субфрагмента-1 миозина (S1-AEDANS). Согласно интерпретации, предложенной ранее (см. обзоры: [34], [35]), изменение угла ориентации диполей  $\Phi_E$  S1-AEDANS свидетельствует о наклоне SH1 спирали, содержащей краситель, относительно оси волокна, а величину подвижности N можно рассматривать как показатель сродства S1 к актину. При моделировании пе-

рехода актомиозина из слабой (в присутствии АТФ) в сильную (в отсутствие нуклеотида) форму связывания значения  $\Phi_E$  и N для S1-AEDANS постепенно уменьшаются на  $6^\circ$  и 0,13 отн. ед. (на 32%), соответственно. Следовательно, в цикле гидролиза АТФ происходит многоступенчатый наклон SH1 спирали моторного домена миозина по направлению к оси тонкой нити и иммобилизация головок миозина, связанных с актином. Поскольку считается, что SH1 спираль участвует в передаче конформационных изменений от активного центра на регуляторный домен миозина [36], то наблюдаемые изменения параметров флуоресценции S1-AEDANS отражают, по видимому, конформационные перестройки всего моторного домена миозина.

Изменения в активном центре головки миозина передаются не только на SH1 спираль миозина, но также на актин, вызывая нуклеотид-зависимые изменения ориентации и подвижности субдомена 1 актина в тонких нитях (рис. 1, в, г). Изменение угла ориентации зондов 1,5-IAEDANS, связанных с Цис374 актина (актин-AEDANS), мы интерпретировали как вращение всего субдомена 1 актина, поскольку ранее было показано, что зонды, расположенные в разных областях субдомена 1, изменяют свою ориентацию относительно оси волокна одинаково, что указывает на движение всего субдомена 1 актина, как жесткого тела [27]. Переход актомиозина из слабой в сильную форму связывания вызывает увеличение  $\Phi_E$  для актин-AEDANS

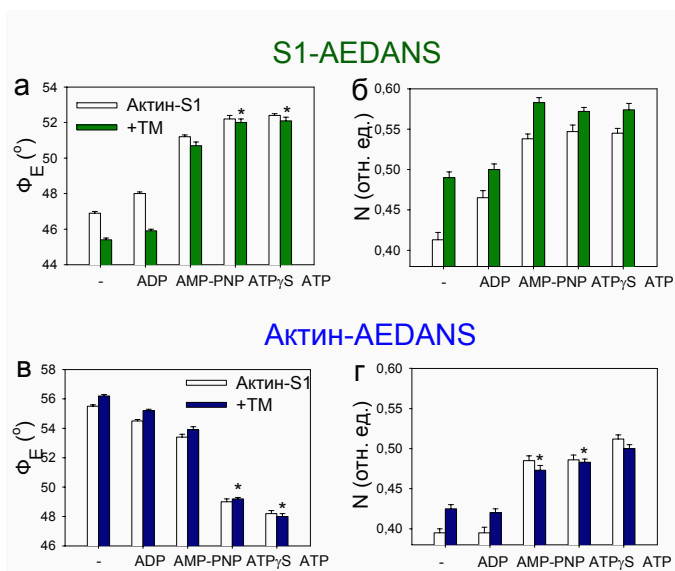


Рис. 1. Значения  $\Phi_E$  и N для S1-AEDANS (а, б) или актин-AEDANS (в, г) при моделировании в теновом волокне промежуточных стадий АТФазного цикла в отсутствие (белые колонки) и в присутствии (зеленые и синие колонки) ТМ. Символами \* показаны недостоверные изменения значений относительно данных для теновых волокон, которые не содержали ТМ (белые колонки), в остальных случаях эти изменения достоверны,  $p < 0,05$ .

на  $7^\circ$  (рис. 1, в) и снижение N на 0,12 отн.ед. (на 30%) (рис. 1, г), что свидетельствует о вращении субдомена 1 актина от оси тонкой нити и о его иммобилизации при сильном связывании S1 [27].

Таким образом, в цикле гидролиза АТФ каждому промежуточному конформационному состоянию головки миозина соответствует определенная пространственная организация и подвижность субдомена 1 актинового мономера. Самые заметные изменения ориентации и подвижности субдомена 1 актина происходят при переходе от слабой формы связывания актомиозина в присутствии AMP-PNP или АТФγS к сильной форме в присутствии ADP, то есть на тех стадиях АТФазного цикла, на которых, вероятно, происходит генерация силы [37], и соответствуют наибольшему сдвигу и изменению подвижности SH1 спирали миозина.

Присоединение скелетного тропомиозина к актину вызывает значительные изменения  $\Phi_E$  и N для S1-AEDANS или актин-AEDANS (рис. 1), что позволяет предположить, что этот регуляторный белок индуцирует изменения пространственной организации SH1 спирали миозина и субдомена 1 актина. В присутствии тропомиозина значения  $\Phi_E$  зондов, связанных с миозином или актином, в целом характерны для более сильной формы связывания миозина с актином. При этом амплитуда движения SH1 спирали и субдомена 1 актина при переходе из слабой в сильную форму связывания увеличивается соответственно на 22 и 12% (рис. 2). Поскольку считается, что изменение конформации активного центра миозина передается на регуляторный домен при участии SH1 спирали, что играет ключевую роль в развитии силы [37-39], то увеличение амплитуды движения SH1 спирали в АТФазном цикле может указывать на то, что тропомиозин увеличивает эффективность работы каждого поперечного мостика.

Тропонин  $Ca^{2+}$ -зависимым образом модифицирует влияние тропомиозина на структурное состояние S1 миозина и актина в цикле гидролиза АТФ (рис. 3).

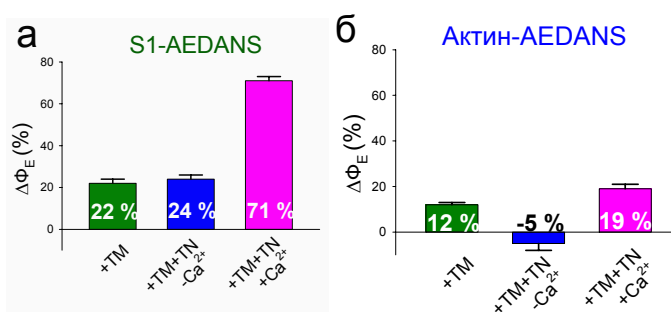


Рис. 2. Влияние скелетного ТМ, ТН и  $Ca^{2+}$  на амплитуду изменений  $\Phi_E$  для S1-AEDANS (а) или актин-AEDANS (б), наблюдаемых при моделировании перехода актомиозина из слабой в сильную форму связывания. За контроль принято значение  $\Delta\Phi_E$  при переходе актомиозина из слабой в сильную форму связывания в теновом волокне, декорированном S1 в отсутствие ТН и ТМ.

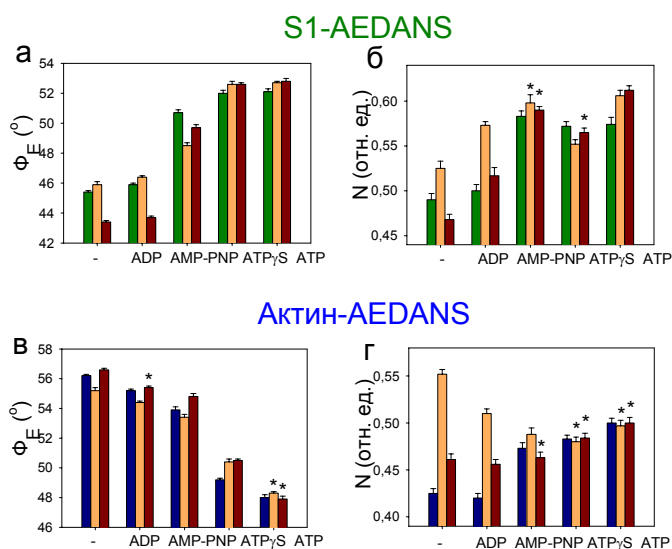


Рис. 3. Влияние ТН и  $Ca^{2+}$  на значения  $\Phi_E$  и  $N$  для S1-AEDANS (а, б) или актин-AEDANS (в, г) при моделировании промежуточных стадий АТФазного цикла в теневом волокне, содержащем ТМ и S1 (зеленые и синие колонки) или ТМ, S1 и ТН при низкой и высокой концентрации  $Ca^{2+}$  (соответственно оранжевые и бордовые колонки). Символами \* показаны недостоверные изменения значений относительно тонких нитей, не содержащих ТН (зеленые, синие или красные колонки), в остальных случаях эти изменения достоверны,  $p < 0,05$ .

ответственно (рис. 2). Наоборот, при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  ( $pCa \geq 7$ ) тропонин оказывает противоположное влияние на  $\Phi_E$  и  $N$  для S1-AEDANS и актин-AEDANS, что свидетельствует, по-видимому, об ослаблении актин-миозинового взаимодействия. Интересно отметить, что амплитуда движений SH1 спирали при трансформации актомиозина из слабой в сильную форму связывания не изменяется (рис. 2, а), тогда как амплитуда движения субдомена 1 актина ингибирована на 5% (рис. 2, б). Это указывает на то, что тропомиозин и тропонин при низких концентрациях  $Ca^{2+}$  способны разобщить согласованные конформационные изменения головки миозина и актина в АТФазном цикле. Похожие нарушения согласованной работы актина и миозина обнаружены нами при исследовании механизмов регуляции АТФазного цикла гладкомышечным тропомиозином и кальдесмоном (см. раздел 2).

## 2. Влияние гладкомышечного тропомиозина и кальдесмона на структурное состояние субфрагмента-1 миозина и актина в АТФазном цикле.

Достаточно оснований считать, что кальдесмон играет важную роль в регуляции сокращения гладких мышц, связанной с тонкими нитями [4, 9, 41, Pronina (Karpina

При моделировании сильных форм связывания миозина с актином в присутствии  $Ca^{2+}$  ( $pCa \leq 5$ ) тропонин усиливает влияние тропомиозина на взаимодействие актина с миозином, стимулируя формирование более сильных структурных состояний актомиозина. Это, по-видимому, обусловлено увеличением стереоспецифичности взаимодействий между актином и миозином вследствие

изменения позиции тропомиозина на тонкой нити (см. раздел 3). При этом амплитуда движений SH1 спирали и субдомена 1 актина при переходе из слабой в сильную форму связывания увеличивается на 71% и 19%, соот-

cheva) et al., 2007a]. В настоящей работе мы показали, что актиновые нити, содержащие дефосфорилированный кальдесмон, практически теряют свою способность изменять структурное состояние в цикле гидролиза АТФ (рис. 5, а, б), в то время как S1 миозина в этих экспериментальных условиях сохраняет способность изменять свою конформацию (рис. 5, в, г).

Чтобы продемонстрировать влияние кальдесмона на структурное состояние актина, мы окрашивали актин теневых волокон FITC-фаллоидином, который связывается с тремя соседними мономерами актина [42]. Специфичность связывания красителя к актину демонстрирует фотография теневого волокна, содержащего меченый актин (рис. 4), на которой можно наблюдать избирательное окрашивание красителем тонких нитей [Pronina (Karpicheva) et al., 2007a].

Согласно интерпретации, предложенной ранее [43], изменения  $\Phi_E$  и N актин-FITC-фаллоидина свидетельствуют соответственно об аксиальном вращении актиновых мономеров относительно оси волокна и об изменении их подвижности. Связывание тропомиозина и S1 с актином в отсутствие нуклеотида вызывает уменьшение  $\Phi_E$  и увеличение N для актин-FITC-фаллоидина (рис. 5, в, г), что можно интерпретировать как поворот актиновых

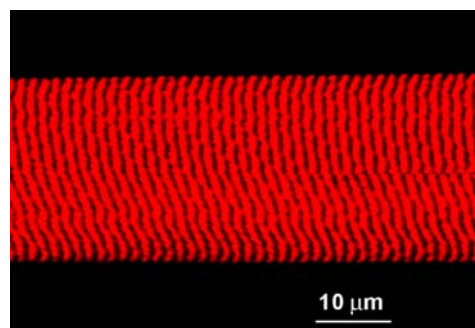


Рис. 4. Фотография теневого волокна, содержащего актин, окрашенный TRITC-фаллоидином.

мономеров по направлению к оси волокна и увеличение их подвижности [Bogovikov, Pronina (Karpicheva) et al., 2006]. В присутствии ADP этот эффект усиливается. В противоположность этому, при моделировании слабых форм связывания миозина с актином происходит увеличение  $\Phi_E$ , что указывает на вращение актиновых мономеров от оси мышечного волокна. Похожие изменения мы наблюдали для SH1 спирали миозина, окрашенной 1,5-IAEDANS (рис. 5, а). Данные показывают, что активация актиновой нити при сильном связывании S1 сопровождается синхронным однонаправленным аксиальным вращением SH1 спирали миозина (рис. 5, а) и мономеров актина (рис. 5, в) к оси мышечного волокна. При этом субдомен 1 актина движется в противоположном направлении – от оси мышечного волокна (рис. 1, в).

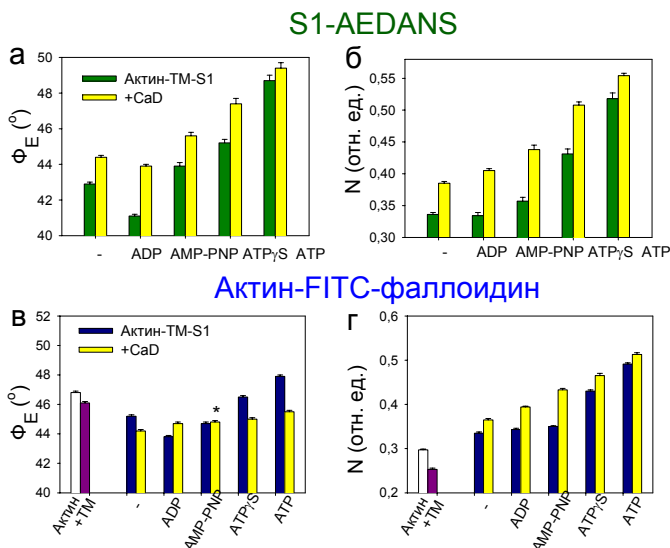


Рис. 5. Значения  $\Phi_E$  и N для S1-AEDANS (а, б) или актин-FITC-фаллоидина (в, г) при моделировании промежуточных стадий АТФазного цикла в теневом волокне, содержащем ТМ и S1, в отсутствие (зеленые и синие колонки) и в присутствии (желтые колонки) CaD. Белые и бордовые колонки представляют значения для тонких нитей в отсутствие и в присутствии ТМ, соответственно. Символами \* показаны недостоверные изменения значений относительно данных для тонких нитей, не содержащих CaD (зеленые или синие колонки), в остальных случаях эти изменения достоверны,  $p < 0,05$ .

Способность изменять структурное состояние при связывании S1 с различными нуклеотидами. Амплитуда изменений  $\Phi_E$  актин-FITC-фаллоидина при переходе из слабой в сильную форму связывания актомиозина в присутствии кальдесмона снижается на 52%. Следовательно, кальдесмон переводит актин в состояние, при котором резко ингибируется способность актина к конформационным перестройкам [Borovikov, Prokina (Karpicheva) et al., 2006].

В противоположность актину, S1 миозина в присутствии кальдесмона сохраняет в значительной степени способность изменять свою конформацию при моделировании промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ. Согласно рис. 5, а, связывание кальдесмона к актину вызывает увеличение  $\Phi_E$  S1-AEDANS на каждой моделируемой стадии АТФазного цикла, что характерно для перехода структурного состояния головки миозина в слабую форму связывания с актином. Кальдесмон уменьшает амплитуду изменений  $\Phi_E$  S1-AEDANS при переходе из слабой в сильную форму связывания актомиозина на 14%. Увеличение N в присутствии кальдесмона для S1-AEDANS и актин-FITC-фаллоидина также указывает на то, что свойства актин-миозинового комплекса в присутствии кальдесмона близки к свойствам, характер-

Связывание кальдесмона с тонкой нитью оказывает заметное влияние на значения  $\Phi_E$  и N зондов, связанных с актином или S1 миозина (рис. 5). При этом характер этих изменений в АТФазном цикле для S1-AEDANS и актин-FITC-фаллоидина различается. Параметры флуоресценции актин-FITC-фаллоидина при моделировании АТФазного цикла в присутствии кальдесмона изменяются слабо. Если в отсутствие кальдесмона наблюдали многоступенчатые изменения наклона и подвижности актиновых мономеров, то актиновые нити, содержащие кальдесмон, практически теряют свою спо-

ным для слабой формы связывания миозина с актином, и отражает, по нашему мнению, снижение сродства S1 к актину, которое, в свою очередь, может являться следствием уменьшения области контакта головки миозина с актиновой нитью [38].

Поскольку актин и головка миозина испытывают согласованные и взаимосвязанные конформационные изменения (рис. 5), то эффект кальдесмона на структурное состояние S1 можно объяснить стабилизацией структуры актина в выключенном состоянии, при котором нарушается согласованность конформационных перестроек миозина и актина и головка миозина в АТФазном цикле работает неэффективно. Тропомиозин в этом случае, по-видимому, играет важную роль в передаче конформационных изменений мономеров актина вдоль тонкой нити. Подобное разобщение работы актомиозина мы наблюдали в теновом волокне, содержащем S1, ТМ и ТН при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  (рис. 3). Возможно, что для различных мышечных тканей существует похожий аллостерический механизм регуляции актомиозинового мотора в цикле гидролиза АТФ.

### 3. Конформационные перестройки скелетного и гладкомышечного тропомиозинов в цикле гидролиза АТФ.

Ранее было предположено, что тропомиозин изменяет свою позицию относительно актина, сдвигаясь или «перекатываясь» по поверхности тонкой нити при её активации [44]. Данные, полученные в настоящей работе с использованием скелетного и гладкомышечного тропомиозинов, меченных флуоресцентными зондами, указывают на то, что тропомиозин действительно изменяет свою позицию на актине, «перекатываясь» по поверхности тонкой нити в АТФазном цикле [Kulikova, Pronina (Karpicheva) et al., 2006].

Согласно рис. 6, каждому структурному состоянию миозинового поперечного мостика соответствует определенное значение  $\Phi_E$  и N для зондов 5-IAF, связанных с Цис36 скелетного тропомиозина (ТМ-АФ).

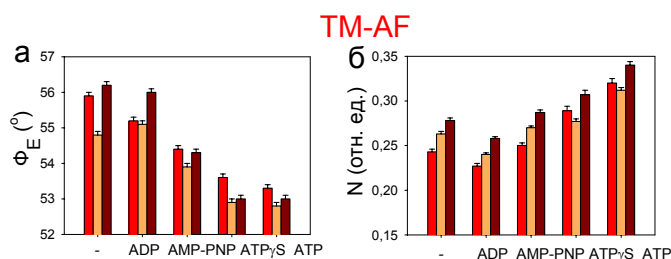


Рис. 6. Влияние ТН и  $Ca^{2+}$  на значения  $\Phi_E$  (а) и N (б) для ТМ-АФ при моделировании в теновом волокне промежуточных стадий АТФазного цикла. Красные колонки показывают данные для тонких нитей, содержащих ТМ и S1. Оранжевые и бордовые колонки показывают данные для тонких нитей, содержащих ТМ, S1 и ТН при низкой и высокой концентрации  $Ca^{2+}$ , соответственно. Символами \* показаны недостоверные изменения значений относительно данных для тонких нитей, не содержащих ТН (красные колонки), в остальных случаях эти изменения достоверны,  $p < 0,05$ .

Мы рассматривали вращение диполей красителя к оси мышечного волокна (уменьшение  $\Phi_E$ ) как сдвиг тропомиозина по поверхности тонкой нити к внешнему домену актина (на периферию), тогда как вращение зонда от оси мышечного волокна (увеличение угла  $\Phi_E$ ) как смещение тропомиозина по направлению к внутреннему домену актина (к центру нити). Такая интерпретация подтверждается корреляцией между изменениями величины  $\Phi_E$ , наблюдаемыми в наших экспериментах, и данными электронной микроскопии о движении тропомиозина по поверхности тонкой нити [45, 46].

Следовательно, трансформация актомиозина от слабой к сильной форме связывания сопровождается постепенным сдвигом тяжа тропомиозина к центру тонкой нити. При этом величина  $N$  снижается, что можно объяснить увеличением сродства тропомиозина к актину при формировании сильных форм связывания актомиозинового комплекса [Kulikova, Pronina (Karpicheva) et al., 2007].

Тропонин  $Ca^{2+}$ -зависимым образом модифицирует структурное состояние тропомиозина в АТФазном цикле. При высокой концентрации  $Ca^{2+}$  тропонин уменьшает значение  $\Phi_E$  ТМ-АФ при моделировании слабых форм связывания актомиозина, и увеличивает значение этого параметра при симуляции сильных форм. Следовательно, в присутствии тропонина и  $Ca^{2+}$  тяж тропомиозина сдвинут дальше к периферии тонкой нити при формировании слабой формы связывания актомиозина и ближе к центру нити при сильном связывании миозина с актином. При низкой концентрации  $Ca^{2+}$  тропонин инициирует снижение значений  $\Phi_E$  для ТМ-АФ на каждой стадии АТФазного цикла, указывая на смещение регуляторного белка к периферии тонкой нити. Амплитуда изменений  $\Phi_E$  для ТМ-АФ при переходе из слабой в сильную форму связывания миозина с актином снижается на 23% при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  и, наоборот, увеличивается на 23% при высокой концентрации  $Ca^{2+}$ . Мы предположили, что структурное состояние тропомиозина и его позиция на поверхности тонкой нити, обусловленная этой конформацией, играют решающую роль в ингибировании АТФазы, поскольку при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  даже при моделировании сильных форм связывания тропомиозин занимает позицию, характерную для слабо-связанного состояния (рис. 6), амплитуда движений тропомиозина снижается, а актомиозин формирует слабую форму связывания (рис. 3). По-видимому, разобщение согласованных конформационных изменений в миозине и актине и стабилизирова-



ние актомиозина в «выключенном» состоянии происходит вследствие блокирования миозин-зависимых движений тропомиозина в цикле гидролиза АТФ.

Похожее ингибирование движений тропомиозина мы наблюдали для гладкомышечной изоформы белка в присутствии кальдесмона. Оказалось, что гладкомышечный тропомиозин также изменяет свою позицию на актиновой нити в АТФазном цикле. Данные, полученные с помощью специфического окрашивания С- или N-концевых областей белка 5-IAF или 1,5-IAEDANS, соответственно, указывают на то, что тропомиозин, возможно, «перекачивается» по актиновой нити.

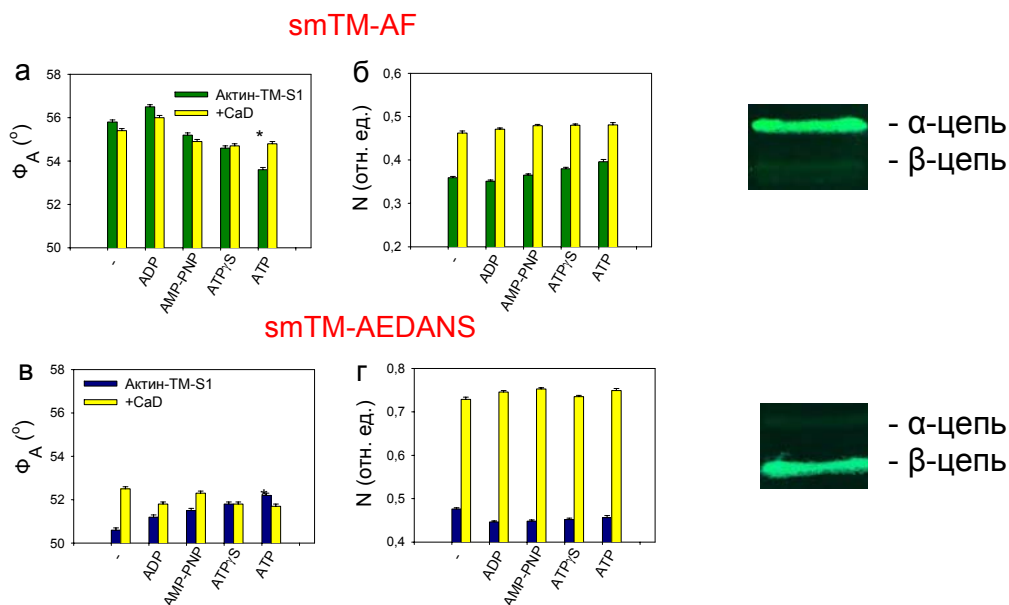


Рис. 8. Значения  $\Phi_E$  и N для S1-AEDANS (а, б) или актина-FITC-фаллоидина (в, г) в теневых волокнах, содержащих TM и S1, при моделировании промежуточных стадий АТФазного цикла в отсутствие (зеленые и синие колонки) и в присутствии (желтые колонки) CaD. Символами \* показаны недостоверные изменения значений относительно данных для теневых волокон, декорированных S1 в отсутствие CaD (зеленые или синие колонки), в остальных случаях эти изменения достоверны,  $p < 0,05$ . Справа представлены фотографии препаратов TM, полученные с помощью SDS-электрофлуоресценции в ультрафиолетовом свете.

Согласно рис. 8, характер изменений  $\Phi_A$  для зондов 5-IAF и 1,5-IAEDANS, связанных с гладкомышечным тропомиозином (smTM-AF и smTM-AEDANS), в АТФазном цикле различается. Так, если при переходе актомиозина из слабой в сильную форму связывания значение  $\Phi_A$  smTM-AF увеличивается, что указывает на вращение диполей красителя от оси волокна, то значение  $\Phi_A$  smTM-AEDANS, наоборот, уменьшается, что свидетельствует о наклоне диполей к оси мышечного волокна. Амплитуда изменений  $\Phi_A$  для smTM-AF и smTM-AEDANS составила соответственно  $2,2^\circ$  и  $1,6^\circ$ . Полученные данные указывают на то, что в цикле гидролиза АТФ зонды, расположенные в С- или N-концевой областях тропомиозина, движутся в противополо-

ложных направлениях. Такие изменения в ориентации зондов можно объяснить «перекачиванием» тяжа тропомиозина по поверхности актина [Kulikova, Pronina (Karpicheva) et al., 2006]. Это предположение согласуется с данными FRET, указывающими на то, что при связывании S1 расстояние между актином и красителем в N-концевой области гладкомышечного тропомиозина увеличивается, а расстояние между актином и красителем в C-концевой области тропомиозина, наоборот, уменьшается [47].

Присоединение кальдесмона к актину теневого волокна, содержащего гладкомышечный тропомиозин и S1 в отсутствие нуклеотида, вызывает уменьшение  $\Phi_A$  для smTM-AF (рис. 8, а) и увеличение  $\Phi_A$  для smTM-AEDANS (рис. 8, в). Подобные изменения ориентации зондов, связанных с C- и N-концевыми областями тропомиозина, характерны для слабого связывания миозина с актином. При этом подвижность зондов, связанных с C- и N-концевыми областями тропомиозина, значительно увеличивается соответственно на 0,10 и 0,25 отн. ед. (на 29 и 53%), что, вероятно, указывает на то, что кальдесмон уменьшает сродство тропомиозина к актину.

При переходе из слабого в сильное состояние связывания миозина с актином мы наблюдали ингибирование кальдесмоном изменений ориентации зондов, связанных с C- и N-концевыми областями тропомиозина соответственно на 73 и 50%. По-видимому, кальдесмон ограничивает движение тропомиозина, индуцируемое головкой миозина в АТФазном цикле и таким способом ингибирует актин-миозиновое взаимодействие.

Полученные данные указывают на то, что кальдесмон в гладких мышцах и тропонин в поперечно-полосатых мышцах играют важную роль в позиционировании тропомиозина на актине, что подтверждает возможность стерического блокирования взаимодействия головок миозина с актином. Вместе с тем, вышеизложенные результаты, на наш взгляд, свидетельствуют о существовании также аллостерического механизма регуляции, согласно которому во время АТФазного цикла миозин-индуцируемый сдвиг тяжей тропомиозина от периферии к центру тонкой нити, влияя на конформацию актина, увеличивает область стереоспецифических и гидрофобных связей между головкой миозина и актиновой нитью (рис. 9). Это, в свою очередь, приводит к увеличению эффективности взаимодействия миозина с актином. Тропонин модулирует этот эффект тропомиозина  $Ca^{2+}$ -зависимым образом. При высокой концентрации  $Ca^{2+}$  тропомиозин под влиянием тропонина сдвигает субдомен-1 актина к периферии тонкой нити, и, увеличивая область стереоспецифических и гидро-

фобных взаимодействий актомиозина, способствует образованию более сильных форм связывания актомиозина и таким образом увеличивает эффективность работы актомиозинового мотора. При низкой концентрации  $Ca^{2+}$  ТН-ТМ, наоборот, ингибирует работу актомиозинового мотора, ограничивая миозин-зависимые движения тропомиозина и фиксируя конформацию актина в состоянии, типичном для слабой формы актин-миозинового взаимодействия [Borovikov, Karpicheva et al., 2009]. Дефосфорилированный кальдесмон, так же, как и тропонин при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ , ингибирует внутримолекулярные движения актомиозина в АТ-Фазном цикле, ограничивая миозин-зависимые движения ТМ и фиксируя структуру актина в выключенном состоянии [Borovikov, Pronina (Karpicheva) et al., 2006; Kulikova, Pronina (Karpicheva) et al., 2006].

Определенный характер и последовательность конформационных изменений во всех компонентах ансамбля мышечных белков в цикле гидролиза АТФ, скорее всего, играют важную роль в высокоэффективном механизме работы актомиозинового мотора [Borovikov, Karpicheva et al., 2009].

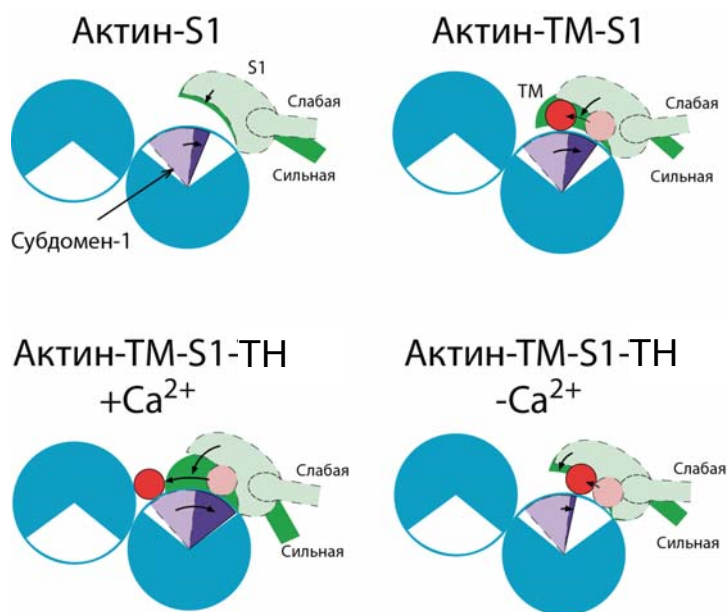


Рис. 9. Схема, показывающая изменения ориентации моторного домена миозина, субдомена 1 актина и тяжа тропомиозина, наблюдаемые при переходе от слабой к сильной форме связывания миозина с актином при низкой и высокой концентрации  $Ca^{2+}$ .

#### 4. Влияние мутаций в скелетном тропомиозине Glu117Lys и Glu147Pro, связанных с немалиновой миопатией, на его структурно-функциональные свойства.

Опираясь на вышеизложенное, можно предположить, что даже точечные мутации тропомиозина могут вызвать нарушение регуляции актин-миозинового взаимодействия. Для подтверждения этого предположения мы экспрессировали в *Escherichia coli* скелетный  $\beta$ -тропомиозин человека с нормальной последовательностью (ТМ «дикого» типа) и с мутациями Glu117Lys (E117K) и Gln147Pro (Q147P), связанными с развитием немалиновой миопатии, и изучили эффект этих мутаций на вторичную структуру белка, АТФазную активность актомиозина в присутствии тро-

помиозина, сродство тропомиозина к актину и конформационные перестройки тропомиозина в теневых мышечных волокнах при моделировании цикла гидролиза АТФ.

Вторичную структуру дикого и мутантных ТМ оценивали с помощью метода кругового дихроизма. Несмотря на то, что пролин очень резко изгибает полипептидную цепь и в норме отсутствует в структуре суперспиральных белков, включение в последовательность тропомиозина этого аминокислотного остатка при мутации Q147P не вызывает значительных изменений в спектре кругового дихроизма и термостабильности молекулы (результаты не показаны). Такой же эффект наблюдали и для тропомиозина с мутацией E117K. Эти данные свидетельствуют о том, что мутации Q147P и E117K не оказывают заметного влияния на вторичную структуру белка. Однако при сосаждении комплекса актин-тропомиозин оказалось, что мутация Q147P резко снижает способность тропомиозина связываться с актином (рис. 10, б). Тогда как мутация E117K не влияет на сродство белка к актину, но уменьшает кооперативность его связывания с актином (рис. 10, а) и существенно ингибирует АТФазную активность актомиозина в растворе (рис. 11).

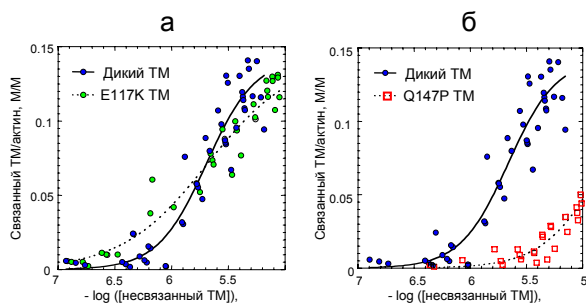


Рис. 10. Сравнение фракции связанного с актином ТМ в отсутствие и в присутствии мутаций E117K (а) или Q147P (б) после сосаждения комплекса актин-ТМ. Синие символы обозначают данные для ТМ дикого типа, зеленые и красные символы – для ТМ с мутациями E117K и Q147P, соответственно.

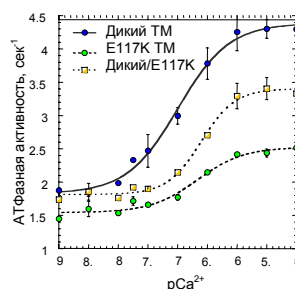


Рис. 11. Сравнение АТФазной активности актомиозина в присутствии тропомиозина дикого типа (синие символы), с мутацией E117K (зеленые символы) и смеси белков в соотношении 1:1 (желтые символы).

Для того чтобы объяснить уменьшение сродства к актину тропомиозина с мутацией Q147P и ингибирование АТФазной активности актомиозина в присутствии тропомиозина с мутацией E117K, мы сравнивали способность дикого и мутантных тропомиозинов изменять свою пространственную организацию в теневых мышечных волокнах при добавлении ТН,  $Ca^{2+}$ , S1 и нуклеотидов с помощью флуоресцентного зонда 5-IAF, связанного с Цис36 ТМ (ТМ-AF).

Как следует из рис. 12, а, в, д, обе мутации вызывают уменьшение угла ориентации диполей излучения  $\Phi_E$  ТМ-AF, связанного с актином темновых волокон. Согласно интерпретации, предложенной в разделе 3, можно предположить, что под действием мутаций тропомиозин смещается к периферии тонкой нити, т.е. к блокирующей позиции, типичной для слабого связывания миозина с актином. Значение N для E117K ТМ практически не отличалось от ТМ дикого типа, тогда как мутация Q147P увеличивала значение этого параметра на 60% (с 0,20 до 0,32 отн. ед.) (рис. 12, б, г, е), что указывает на заметное уменьшение сродства Q147P ТМ к актину и хорошо согласуется с данными о снижении способности связывания этого ТМ к актину в растворе (рис. 10, б).

При связывании тропонина значения  $\Phi_E$  и N изменяются  $Ca^{2+}$ -зависимым образом для всех тропомиозинов (рис. 12). Следовательно, тропонин в зависимости от концентрации  $Ca^{2+}$  способен изменять конформацию и позицию как дикого, так и мутантного тропомиозинов.

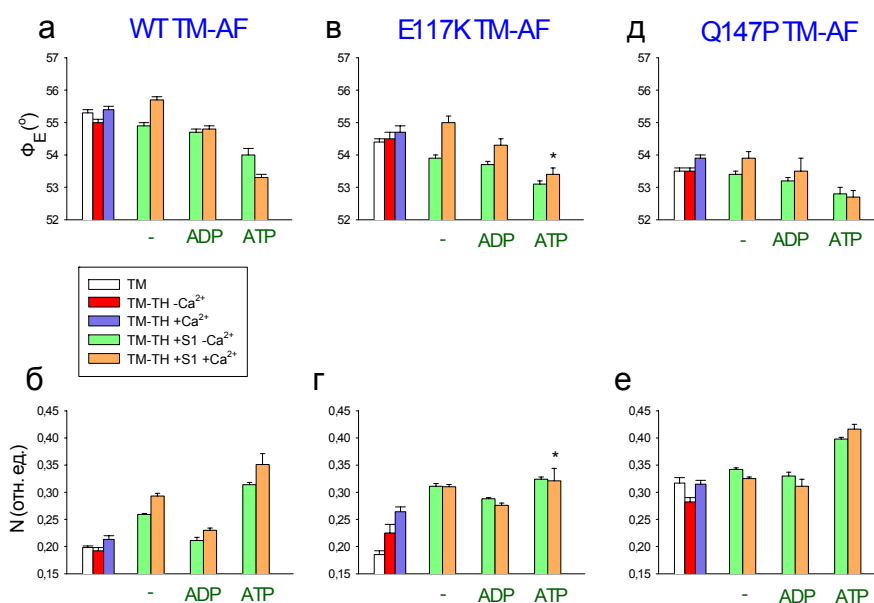


Рис. 12. Влияние мутаций в ТМ E117K и Q147P на значения  $\Phi_E$  и N ТМ-AF в темновых волокнах в отсутствие и в присутствии ТН,  $Ca^{2+}$ , S1 и нуклеотидов. Белые колонки представляют данные для темновых волокон, содержащих ТМ. Красные и синие колонки обозначают данные для темновых волокон, содержащих ТМ и ТН соответственно при низкой и высокой концентрации  $Ca^{2+}$ . Зеленые и оранжевые колонки обозначают данные для темновых волокон, содержащих ТМ, ТН и S1 при низкой и высокой концентрации  $Ca^{2+}$ , соответственно, без нуклеотида или в присутствии ADP или ATP. Символами \* показаны недостоверные изменения значений относительно данных для мышечных волокон, содержащих ТМ дикого типа (а, б), в остальных случаях эти изменения достоверны,  $p < 0,05$ .

Присоединение S1 к тонким нитям, содержащим ТМ и ТН, вызывает изменения  $\Phi_E$  и N при моделировании АТФазного цикла (рис. 12). Однако для мутантных тропомиозинов величина  $\Phi_E$  была меньше, чем для ТМ дикого типа. Это означает, что мутантные тропомиозины, связываясь с актином теневого волокна в присутствии S1, как и в отсутствие S1, располагаются ближе к периферии тонкой нити по сравнению с ТМ дикого типа.

При моделировании перехода актомиозина из слабой (в присутствии АТФ) в сильную форму связывания (в отсутствие нуклеотида или в присутствии АДФ) значения  $\Phi_E$  для всех ТМ-АФ постепенно увеличиваются как при низкой, так и при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  (рис. 12, а, в, д), указывая на смещение тропомиозина к центру тонкой нити. Однако мутации не позволяют этому белку занимать позиции на тонкой нити, характерные для сильного связывания актомиозина. Кроме того, значение N мутантных тропомиозинов в целом выше, чем для тропомиозина дикого типа, что указывает на уменьшение сродства этих тропомиозинов к актину. Мутация Q147P вызывает наибольшее снижение сродства этого белка к актину, что согласуется с данными, полученными при соосаждении комплекса актин-тропомиозин (рис. 10). Наиболее значительное уменьшение  $\Phi_E$  наблюдали для Q147P ТМ. Таким образом, структурное состояние мутантных тропомиозинов в цикле гидролиза АТФ характерно для образования слабых форм связывания актина с миозином.

Мутации E117K и Q147P уменьшают амплитуду изменений  $\Phi_E$  при переходе актомиозина из слабой в сильную форму связывания на 33 и 46% при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  и на 11 и 33% при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ , соответственно, по сравнению с ТМ дикого типа. Снижение амплитуды изменений  $\Phi_E$  для E117K ТМ коррелирует с ингибированием АТФазной активности актомиозина в присутствии этого мутантного белка в растворе (рис. 11).

Возможно, механизм действия мутаций связан с тем, что замены E117K и Q147P происходят в позиции e гептоповторов тропомиозина и способны нарушать образование солевых мостиков между аминокислотными остатками в позициях e и g различных субъединиц тропомиозина. Нарушение формирования солевых мостиков может дестабилизировать суперспираль тропомиозина и приводить к изменению актин-тропомиозинового взаимодействия. Кроме того, мутация E117K может локально инвертировать отрицательный поверхностный заряд ТМ, поскольку при этих мутациях происходит замена отрицательно заряженного остатка глутамина на положи-

тельный остаток лизина [48]. Принимая во внимание электростатическую природу взаимодействия тропомиозина с актином, локальное изменение заряда способно вызвать смещение мутантного ТМ относительно F-актина в другое равновесное положение.

Как было показано ранее ([44], также см. раздел 3), тропомиозин может «перекатываться» по поверхности актиновой нити в цикле гидролиза АТФ. Этому способствует наличие в тропомиозине псевдоповторов, состоящих из  $\alpha$ - и  $\beta$ -областей, которые взаимодействуют с актином в разных состояниях тонкой нити. Аминокислотные остатки в позициях 117 и 147 располагаются в  $\beta$ -участках псевдоповторов молекулы ТМ, которые, как было предположено, участвуют во взаимодействии с актином при сильном связывании головок миозина с актином. Локальное изменение конформации ТМ в  $\beta$ -участках может объяснить природу ингибирования движения ТМ при трансформации актомиозина из слабой в сильную форму связывания.

Недостаточная активация тонкой нити тропомиозином, содержащим аминокислотные замены E117K и Q147P, на наш взгляд, может приводить к нарушениям в характере и последовательности взаимозависимых конформационных перестроек всего белкового ансамбля сократительной системы мышечной клетки и может быть одной из причин ослабления сократительной функции мышечной ткани [Pronina (Karpicheva) et al., 2007b], наблюдаемой в патологически измененных скелетных мышцах при немалиновой миопатии.

## ВЫВОДЫ

1. В мышечном волокне в цикле гидролиза АТФ происходят многоступенчатые и взаимозависимые изменения конформации актина и миозина, которые сопровождаются изменениями в ориентации и подвижности SH1 спирали миозина и субдомена 1 актина. Каждому промежуточному состоянию актин-миозинового комплекса соответствует определенное структурное состояние и позиция тропомиозина на тонкой нити.

2. Регуляция актин-миозинового взаимодействия в цикле гидролиза АТФ осуществляется взаимозависимыми конформационными перестройками актина, миозина и тропомиозина. При высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  тропонин смещает тропомиозин к центру тонкой нити и субдомен 1 актина к периферии тонкой нити и таким способом активует формирование сильных форм связывания актомиозина. Тропонин при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и дефосфорилированный кальдесмон ограничивают мио-

зин-зависимые движения тропомиозина и фиксируют конформацию актина и миозина в состоянии, типичном для слабых форм актин-миозинового взаимодействия.

3. Мутации Glu117Lys и Gln147Pro в тропомиозине смещают тропомиозин к периферии тонкой нити и ограничивают миозин-зависимые движения тропомиозина в цикле гидролиза АТФ, что может быть одной из причин мышечной слабости, наблюдаемой при немалиновой миопатии.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

*Статьи в рецензируемых журналах:*

1. Borovikov Y. S., Karpicheva O. E., Avrova S.V., Robinson P., Redwood C. S. (2009) The effect of the dilated cardiomyopathy-causing mutation Glu54Lys of alpha-tropomyosin on actin-myosin interactions during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 489:20-4.

2. Borovikov Y. S., Karpicheva O. E., Chudakova G. A., Robinson P., Redwood C. S. (2009) Dilated cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin inhibit its movement during the ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381:403-6.

3. Borovikov Y. S., Karpicheva O. E., Avrova S. V., Redwood C. S. (2009) Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and  $Ca^{2+}$ . *Biochim. Biophys. Acta* 1794:985-94.

4. Pronina O. E., Makuch R., Wrzosek A., Dąbrowska R., Borovikov Y. S. (2007) Caldesmon inhibits both force development and transition of actin monomers from "OFF" to "ON" conformational state by changing its position in thin filaments. *Int. Cell. Biol.* 31:394-404.

5. Kulikova N., Pronina O. E., Dąbrowska R., Borovikov Y. S. (2007) Caldesmon inhibits the actin-myosin interaction by changing its spatial orientation and mobility during the ATPase activity cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357:461-6.

6. Kulikova N., Pronina O. E., Dąbrowska R., Borovikov Y. S. (2006) Caldesmon restricts the movement of both C- and N-termini of tropomyosin of F-actin in ghost fibers during the actomyosin ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345:280-6.

7. Borovikov Y. S., Kulikova N., Pronina O. E., Khaimina S. S., Wrzosek A., Dąbrowska R. (2006) Caldesmon freezes the structure of actin filaments during the actomyosin ATPase cycle. *Biochim. Biophys. Acta* 1764:1054-62.

8. Пронина О. Е., Копеланд О., Марстон С., Боровиков Ю. С. (2006) С-концевые сайты кальдесмона управляют циклом гидролиза АТФ, сдвигая промежуточные состояния актомиозина к слабым формам взаимодействия миозина с актином. *Цитология* 48:9-18.

9. Пронина О.Е., Вржосек А., Дабровска Р., Боровиков Ю. С. (2005) Влияние нуклеотидов на ориентацию и подвижность субфрагмента-1 миозина в теневом мышечном волокне. *Биохимия (Москва)* 70:1382-8.

*Тезисы докладов:*

1. Karpicheva O.E., Berestovoy M.A., Chudakova G.A., Borovikov Y.S., Redwood C.S. (2008) The effect of dilated cardiomyopathy-causing Glu40Lys and Glu54Lys mutations on



$\alpha$ -tropomyosin movement in ATPase cycle. In *Abstracts of XXXVII European Muscle Conference, Supplement*, Oxford, United Kingdom, J. Muscle Res. Cell Motil. 29:282.

2. Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Redwood C.S. (2007) Force generation is regulated via conformational changes of actin and myosin initiated by changes in position and mobility of troponin-tropomyosin on thin filaments. In *Abstracts of XXXVI European Muscle Conference, Supplement*, Stockholm, Sweden, 58.

3. Karpicheva O.E., Robinson P., Borovikov Y.S., Redwood C.S. (2007) Nemaline myopathy-causing mutations E117K and Q147P of  $\beta$ -tropomyosin impair its function. In *Abstracts of XXXVI European Muscle Conference, Supplement*, Stockholm, Sweden, 34.

4. Pronina O.E., Robinson P., Borovikov Y. S., Redwood C. S. (2007) Alteration of  $\beta$ -tropomyosin function by nemaline myopathy-causing mutations E117K and Q147P. In *Abstracts of 51th Annual Meeting of Biophysical Society*, Baltimore, MD, USA, Biophys. J., Supplement, poster B342.

5. Chudakova G.A., Pronina O.E., Kulikova N., Wrzosek A., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2006) Movement of smooth muscle tropomyosin on F-actin in ghost fibers during the actomyosin ATPase cycle. In *Abstracts of International Symposium "Biological Motility: Basic Research and Practice"*, Pushchino, Russia, 20.

6. Khaymina S.S., Pronina O.E., Dabrowska R., Wrzosek A., Borovikov Y.S. (2005) Changes in axial tilting of cross-bridges (myosin heads and actin monomers) at intermediates of ATPase cycle in the absence or presence of caldesmon. In *Abstracts of 49th Annual Meeting of Biophysical Society*, Long Beach, CA, USA, Biophys. J. 88: poster B488.

7. Savkin D.Y., Chudakova G.A., Mikhailov G.V., Pronina O.E., Kulikova N., Wrzosek A., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2005) Caldesmon inhibits myosin-induced movement of smooth muscle tropomyosin during the actomyosin ATPase cycle. In *Abstracts of XXXIV European Muscle Conference*, Hortobagy, Hungary, J. Muscle Res. Cell Motil. 26: 70.

8. Borovikov Y.S., Pronina O.E., Khaimina S.S., Marston S.B. (2004) Change in orientation of smooth muscle tropomyosin in response to different intermediates of myosin ATPase cycle in ghost muscle fibers. In *Abstracts of XXXIII European Muscle Conference*, Elba Island, Italy, J. Muscle Res. Cell Motil. 25: 260.

9. Pronina O.E., Wrzosek A., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2004) Orientation and mobility of intermediates of 1.5-IAEDANS-labeled subfragment-1 in ghost muscle fibers. In *Abstracts of XXXIII European Muscle Conference*, Elba Island, Italy, J. Muscle Res. Cell Motil. 25: 247-248.

10. Pronina O.E., Wrzosek A., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2004) Myosin subfragment 1 orientation and mobility at intermediates of ATPase cycle. In *Abstracts of Structural Mechanisms in Muscle Conference*, London, United Kingdom, 22.

11. Pronina O.E., Wrzosek A., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2004) Effect of nucleotides on orientation and mobility of subfragment 1 in ghost fibers. In *Abstracts of International Symposium "Biological Motility"*, Pushchino, Russia, 16.

12. Borovikov Y.S., Pronina O.E., Khaimina S.S., Copeland N., Marston S.B. (2003) Influence of caldesmon fragments H1, H2, H12 and 658C on orientation and mobility of S1 in the presence and absence of nucleotides. In *Abstracts of XXXII European Muscle Conference*, Montpellier, France, J. Muscle Res. Cell Motil. 24: 325.

13. Pronina O.E., Wrzosek A., Dabrowska R., Borovikov Y.S. (2003) Effect of caldesmon and nucleotides on the binding between S1 and actin in ghost fibers. In *Abstracts of XXXII European Muscle Conference*, Montpellier, France, J. Muscle Res. Cell Motil. 24: 330.

## Список цитированной литературы

1. Huxley H.E. (1972) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37:361-76.
2. Haselgrove J. (1972) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37:341-52.
3. Marston S.B., Redwood C.S. (1991) *Biochem. J.* 279:1-16.
4. Sen A., Chalovich J.M. (1998) *Biochemistry* 37:7526-31.
5. Vibert P., Craig R., Lehman W.J. (1993) *Cell Biol.* 123:313-21.
6. Perry S.V. (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22:5-49.
7. Squire J.M., Morris E.P. (1998) *FASEB J.* 12:761-771.
8. Borovikov Y.S., Gusev N.B. (1983) *Eur. J. Biochem.* 136:363-9.
9. Nowak E., Borovikov Y.S., Dabrowska R. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 999:289-92.
10. Bretscher (1984) *J. Biol. Chem.* 259:12873-80.
11. Иванов И.И., Юрьев В.А. (1961) *Мед-гиз, Ленинград.*
12. Spudich J.A., Watt S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246:4866-71.
13. Okamoto Y., Sekine T. (1985) *J. Biol. Chem.* 98:1143-5.
14. Mirza M. et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280:28498-506.
15. Laemmli U.K. (1970) *Nature* 227:680-5.
16. Borejdo J., Putnam S. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 459:578-95.
17. Miki M., dos Remedios C.G., Barden J.A. (1987) *Eur. J. Biochem.* 168:339-45.
18. Gałazkiewicz B., Borovikov Y.S., Dabrowska R. (1987) *Biochim Biophys Acta.* 916:368-75.
19. Szczesna D. et al. (1994) *Biochemistry* 33:6716-20.
20. Lamkin M., Tao T., Lehrer S.S. (1983) *Biochemistry* 22:3053-8.
21. Yanagida T., Oosawa F. (1978) *J. Mol. Biol.* 126:507-24.
22. Andreev O.A., Takashi R., Borejdo J. (1995) *J. Mus. Res. Cell Motil.* 16:353-67.
23. Irving M. (1996) *Biophys. J.* 70:1830-5.
24. Каулин А.Б. (1968) *Цитология* 10:123-5.
25. Tregear R.T., Mendelson R.A. (1975) *Biophys. J.* 15:455-67.
26. Kakol I. et al. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 913:1-9.
27. Borovikov Y.S. et al. (2004) *Biophys. J.* 86:3020-9.
28. Prochniewicz-Nakayama E., Yanagida T., Oosawa F. (1983) *J. Cell Biol.* 97:1663-7.
29. Borovikov Y.S. et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1478:138-51.
30. Goody R.S., Hofmann W. (1980) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1:101-15.
31. Roopnarine O., Thomas D.D. (1996) *Biophys. J.* 70:2795-806.
32. Lymn R.W., Taylor E. W. (1971) *Biochemistry* 10:4617-24.
33. Cooke R. (1997) *Physiol. Rev.* 77:671-97.
34. Borovikov Y.S. (1999) *Int. Rev. Cytol.* 189:267-301.
35. Borejdo J. et al. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1763:137-40.
36. Onishi H., Morales M.F. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:12714-9.
37. Geeves M.A., Holmes K.C. (2005) *Adv. Protein Chem.* 71:161-93.
38. Rayment I. et al. (1993) *Science* 261:58-65.
39. Holmes K.C. (1997) *Curr. Biol.* 7:R112-8.
40. Geeves M.A. (1991) *Biochem. J.* 274:1-14.
41. Marston S.B., Fraser I.D.C., Huber P.A.J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:32104-9.
42. Oda T., Namba K., Maeda Y. (2005) *Biophys. J.* 88:2727-36.
43. Borejdo J. et al. (1982) *J. Molec. Biol.* 158:391-414.
44. Holthauzen L.M.F., Corrêa F., Farah C.S. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:15204-13.
45. Lehman W., Craig R., Vibert P. (1994) *Nature* 368:65-7.
46. Vibert P., Craig R., Lehman W. (1997) *J. Mol. Biol.* 266:8-14.
47. Bacchiocchi C., Graceffa P., Lehrer S.S. (2004) *Biophys. J.* 86:2295-307.
48. Olson T.M. et al. (2001) *J. Mol. Cell Cardiol.* 33:723-32.