

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

АНДРЕЕВА ДАРЬЯ ДМИТРИЕВНА

Выпускная квалификационная работа магистра

**Влияние фармакологических агентов на
взаимодействие миозина с актином в
АТФазном цикле**

Работа выполнена в лаборатории
молекулярных основ клеточной подвижности

Института Цитологии РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

Сабанеева Елена Валентиновна

Научный консультант:

кандидат биологических наук,

Карпичева Ольга Евгеньевна

Оглавление

Аннотация	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	8
1.1. Актин: структура и функции	8
1.2. Миозин: структуры и функции	11
1.3. Тропонин: структура и функции	14
1.4. Тропомиозин: структура, функции, патологии	17
1.4.1. Изоформы тропомиозина	17
1.4.2. Структура тропомиозина	19
1.4.3. Модель стерического блокирования	21
1.4.4. Патологии, ассоциированные с мутациями в генах тропомиозина	22
1.4.4.1. Немалиновая миопатия	22
1.4.4.2. Дистальный артрогрипоз	23
1.4.4.3. Кэп-миопатия	24
1.4.4.4. Врожденная диспропорция типов мышечных волокон	24
1.5. Фармакологические агенты	25
1.5.1. Ингибиторы миозиновой активности	25
1.5.1.1. Блеббистатин	26
1.5.1.2. BTS	27
1.5.1.3. BDM	28
1.5.2. Модуляторы активности тропонина	28
1.5.2.1. Бепридил	30
1.5.2.2. Тирасемтив (СК-2017357)	30
1.5.2.3. EMD 57033	31
1.5.2.4. W7	32
Глава 2. Материалы и методы	34
2.1. Получение глицеринизированных мышечных волокон.	34
2.2. Получение теневых волокон	34
2.3. Получение субфрагмента-1 миозина	34
2.4. Получение тропонина	35
2.5. Получение рекомбинантного γ -тропомиозина	35
2.6. Измерение концентрации белков	35
2.7. Электрофорез в полиакриламидном геле	36
2.8. Метод поляризационной микрофлуориметрии	36
2.9. Измерение АТФазной активности	38
Глава 3. Результаты и обсуждение	39

3.1. Исследование влияния мутации R90P в γ -тропомиозине, связанной с наследственной миопатией, на механизмы регуляции тропомиозином актин-миозинового взаимодействия	40
3.1.1. Влияние мутации R90P в Trpm3.12 на кальциевую чувствительность тонких филаментов	40
3.1.2. Влияние мутации R90P в Trpm3.12 на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле	41
3.2. Исследование влияния ингибитора АТФазной активности BDM и кальциевого десенситизатора W7 на конформационные перестройки миозина	46
3.2.1. Влияние ингибитора миозина BDM и кальциевого десенситизатора W7 на АТФазную активность миозина и кальциевую чувствительность тонких филаментов	46
3.2.2. Влияние BDM и W7 на пространственную организацию и подвижность головок миозина в АТФазном цикле	47
Выводы	52
Литература	53
Благодарности	60

Аннотация

Выяснение молекулярных механизмов мышечного сокращения в норме и при патологиях мышечной ткани является одной из фундаментальных проблем клеточной биологии. Мышечное сокращение основано на взаимодействии миозина с актином, сопровождаемом гидролизом АТФ. Регуляция взаимодействия этих двух белков осуществляется с помощью тропомиозина и кальций-чувствительного тропонинового комплекса. Многочисленные точечные мутации в гене *TRPM3*, кодирующем изоформу тропомиозина Trpm3.12, обнаружены у пациентов с такими наследственными патологиями скелетных мышц, как немалиновая миопатия, дистальный артрогрипоз, врожденная диспропорция типов мышечных волокон (CFTD) и кэп-миопатия.

В настоящей работе проведено изучение влияния замены аминокислотного остатка аргинина на остаток пролина в 90-м положении тропомиозина Trpm3.12 (R90P) на взаимодействие миозина с актиновыми филаментами в мышечном волокне. Замена R90P в Trpm3.12 была обнаружена при CFTD – миопатии, характеризующейся мышечной слабостью и гипотонией. Молекулярные механизмы, лежащие в основе дисфункции мышечных волокон, вызванной этой мутацией, неизвестны.

С помощью метода поляризационной микрофлуориметрии были исследованы конформационные перестройки миозина, модифицированного флуоресцентной меткой, в реконструированных теневых волокнах, содержащих рекомбинантный контрольный и R90P-мутантный тропомиозин, при моделировании различных стадий АТФазного цикла при высокой и низкой концентрациях Ca^{2+} . Обнаружено, что тропомиозин с заменой R90P изменяет соотношение головок миозина, сильно и слабо связанных с актином в цикле гидролиза АТФ. По-видимому, замена R90P вызывает такие изменения конформации тропомиозина, которые приводят к смещению этого регуляторного белка в открытую позицию на актине, позволяющую сильное взаимодействие миозина с актином даже в условиях низкой концентрации Ca^{2+} и при моделировании состояния расслабления актин-миозиновой системы мышечного волокна. Это может быть основной причиной аномально высокой чувствительности тонких филаментов к Ca^{2+} и мышечной слабости и гипотонии. Кроме того, показано, что ингибитор АТФазной активности миозина BDM и кальциевый десенсибилизатор W7 снижают количество сильносвязанных миозиновых головок и способны ослабить влияние мутации R90P в тропомиозине на Ca^{2+} -чувствительность тонких филаментов.

One of the fundamental problems of cell biology is elucidation of the molecular mechanisms of muscle contraction in health and in pathologies of muscle tissue. Muscle contraction is based on the interaction of myosin with actin, accompanied by ATP hydrolysis. The interaction of these two proteins is regulated by tropomyosin and a calcium-sensitive complex of troponin. Numerous point mutations in the *TPM3* gene encoding the tropomyosin isoform Tpm3.12 have been found in patients with hereditary skeletal muscle diseases such as nemaline myopathy, distal arthrogryposis, congenital muscle fiber type disproportion (CFTD), and cap myopathy.

In this work, the effect of the R90P substitution in Tpm3.12 on the interaction of myosin with actin filaments in muscle fiber was studied. The R90P substitution in Tpm3.12 has been found in CFTD - myopathy which is characterized by muscle weakness and hypotension. However, the molecular mechanisms underlying contractile dysfunction caused by this mutation are unknown.

Using polarization microfluorimetry technique the conformational rearrangements of myosin modified with a fluorescent label in reconstructed ghost fibers containing the recombinant control and R90P-mutant tropomyosin were studied, while simulating various intermediate stages of the ATP hydrolysis cycle at high and low concentration of Ca^{2+} . It was found that tropomyosin with the R90P substitution changes the ratio of strongly and weakly bound myosin heads to actin during ATPase cycle. Apparently, the R90P substitution causes such changes in the tropomyosin conformation that lead to a displacement of this regulatory protein to an open position on actin, allowing a strong interaction of myosin with actin even under conditions of low Ca^{2+} concentration and when simulating the relaxation state of the actin-myosin system of muscle fiber. This may be the main reason for both the abnormally high Ca^{2+} -sensitivity of thin filaments and muscle weakness and hypotension. It was also shown that the inhibitor of the myosin ATPase activity BDM and the calcium desensitizer W7 reduce the number of strongly bound myosin heads and are able to weaken the effect of the R90P mutation on the Ca^{2+} -sensitivity of the thin filaments.

Введение

Известно, что основная регуляция сокращения поперечно-полосатых мышц осуществляется с помощью тропомиозина и кальций-чувствительного тропонинового комплекса [Geeves, Holmes, 1999]. Считается, что при низкой концентрации ионов кальция тропомиозин занимает блокирующую позицию на тонкой нити и закрывает сайты связывания миозина на актиновом филаменте. В условиях высокой концентрации ионов кальция происходит активация сокращения мышечного волокна. Тропонин, связываясь с ионами кальция, взаимодействует с тропомиозином. При этом тропомиозин изменяет свою конформацию и сдвигается в закрытую позицию на актиновом филаменте, позволяя миозину формировать слабые формы связывания с актином. Затем миозин в цикле гидролиза АТФ формирует сильную форму связывания с тонким филаментом и сдвигает тропомиозин в открытое положение [Houmeida и др., 2010].

В последние годы возрос интерес к исследованию белков, регулирующих АТФазный цикл миозина и актина. В частности, точечные мутации в тропомиозине могут приводить к серьезным нарушениям структуры и функции саркомера и приводить к развитию наследственных миопатий, которые характеризуются гипотонией и слабостью скелетных мышц. Однако, молекулярные механизмы нарушения регуляции сократительной функции при мутациях тропомиозина изучены недостаточно.

Целью настоящей работы являлось изучение молекулярных механизмов нарушения регуляции актин-миозинового взаимодействия в мышечном волокне, вызванного точечной мутацией в гене *TPM3*, приводящей к замене R90P в тропомиозине, и возможности восстановления нормальной регуляции с помощью ингибитора миозина BDM и десенсибилизатора тропонина W7.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Изучить влияние замены R90P в изоформе тропомиозина Trpm3.12 на расположение тропомиозина относительно актина и на конформационные изменения миозина, происходящие в мышечном волокне в цикле гидролиза АТФ.

2. Оценить влияние ингибитора АТФазной активности миозина ВДМ на структурное состояние миозина и тропомиозина в мышечном волокне при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТФ.
3. Исследовать влияние кальциевого десенсибилизатора тропонина W7 на изменение конформации миозина и тропомиозина при моделировании в мышечном волокне различных стадий АТФазного цикла.

Глава 1. Обзор литературы

Мышечное волокно состоит из множества миофибрилл, образующих последовательно расположенные саркомеры. Каждый саркомер состоит из множества белков, организованных в трехмерную решетку, оптимально предназначенную для активной и пассивной генерации силы. Изотропная область миофибрилл (I-диск) представляет собой тонкие филаменты, которые не перекрываются с толстыми филаментами. Основными белками тонкого филамента являются актин, тропомиозин и тропонин, основу толстого филамента составляет белок миозин. Анизотропная область (A-диск) представляет собой области перекрытия толстых и тонких филаментов, а также только толстые филаменты (H-зона). Толстые филаменты соединяются с Z-дисками посредством молекул титина, которые связываются со специфическими участками актина и других саркомерных белков (Z-зона).

Выделяют два типа мышечных волокон: медленные (тип I) и быстрые (тип II). Медленные волокна характеризуются аэробным (клеточным) дыханием, содержат много митохондрий, и как следствие, обладают относительно большей выносливостью. Мышечные волокна второго типа используют в основном анаэробное дыхание, быстро сокращаются и утомляются. Каждый тип мышечного волокна характеризуется определенными изоформами миозина, в частности тяжелых цепей [Pette, Staron, 2000], и тропомиозина [Gunning и др., 2005].

1.1. Актин: структура и функции

У позвоночных выделяют три основные изоформы актина, включая альфа-изоформу скелетных, сердечных и гладких мышц, а также бета- и гамма-изоформы, экспрессируемые в мышечных и неммышечных клетках. Изоформы актина различаются несколькими N-концевыми аминокислотами и претерпевают различные посттрансляционные модификации [Herman, 1993].

Полипептидная цепь актина образует глобулярный белок (G-актин), в котором выделяют два основных домена: альфа (внутренний) и бета (внешний) (рис. 1). Связь между доменами осуществляется посредством двух участков: петель с центром в остатке 336 и линкерной спиралью (остатки 137-145). Каждый домен состоит из двух

субдоменов. Субдомены 1 и 3 структурно связаны и, вероятно, возникли в результате дупликации генов [Dominguez, Holmes, 2011]. Между доменами актина образуются две щели, верхняя щель между субдоменами 2 и 4 связывает нуклеотид и связанный с ним двухвалентный катион магния. Нижняя щель между доменами 1 и 3 выстлана преимущественно гидрофобными остатками и составляет основной сайт связывания для большинства актин-связывающих белков [Fujii и др., 2010; Oda и др., 2009]. Фибриллярный актин (F-актин) состоит из двух правозакрученных цепей G-актина, в которых на каждые 6 левых витков спирали приходится 13 мономеров. Взаимодействие между соседними мономерами актина осуществляется за счет множества контактов, включая остатки верхнего в цепи мономера 322-325, 286-286, 166-169 и соответствующие остатки нижнего мономера 243-245, 202-204, 375 и 41-45. Соседние цепи связаны друг с другом посредством петли, образуемой остатками 269-273, которая “вставляется” в мономер противоположной цепи [Holmes и др., 1990].

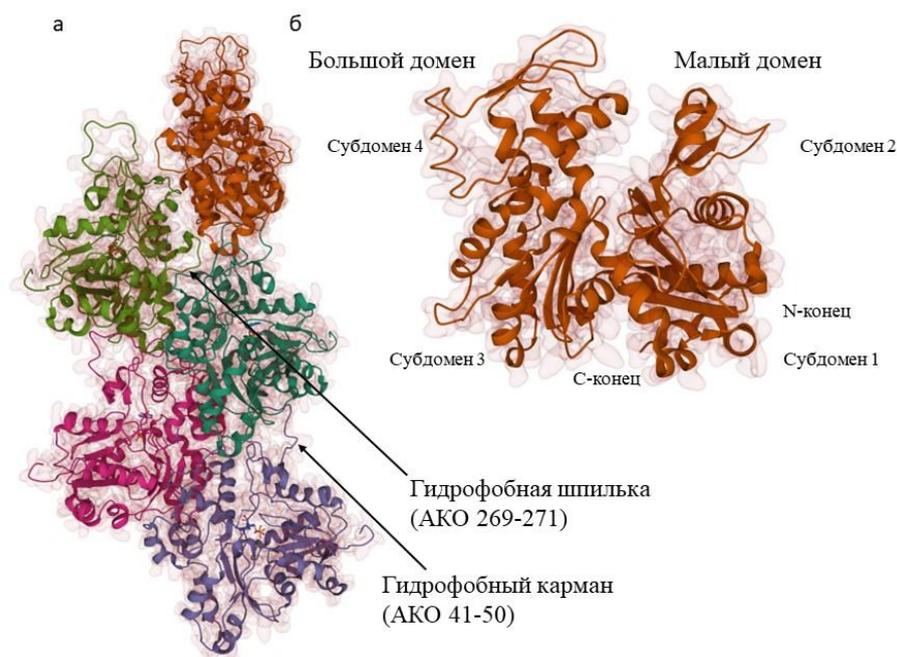


Рисунок 1. Ленточные модели строения F-актина (а) и G-актина (б), основанные на данных рентгеноструктурного анализа (PDB: 4A7N [Behrman и др., 2012] и 1IJJ [Bubb, Yarmola, 2002], соответственно).

Актин считается относительно пассивным элементом сократительного аппарата. Однако существуют данные, указывающие на активную роль конформационных перестроек F-актина в развитии силы [Borovikov и др., 1982; Karpicheva и др., 2017;

Ochala и др., 2010]. Актин-связывающие белки [Borovikov, 1999] [Orlova, Egelman, 1993], гидролиз АТФ в активном центре миозина [Strzelecka-Golaszewska et al., 1993], а также наличие ионов кальция [Egelman, Orlova, 1995] способны изменять структуру актинового филамента. Миозин, связываясь с актиновым филаментом, приводит к увеличению гибкости актина [Orlova, Egelman, 1993; Takebayashi, Morita, Oosawa, 1977]. Было показано, что в структурных изменениях F-актина особую роль играет субдомен 2 актинового мономера [Orlova, Egelman, 1997], а изменения носят кооперативный характер [Moraczewska и др., 2004].

1.2. Миозин: структуры и функции

Существует более 40 известных классов миозина, из них 13 классов экспрессируются у млекопитающих. Первым был обнаружен миозин, выделенный из толстых мышечных филаментов, который назвали миозин II или обычный миозин. Немышечная изоформа миозина II обнаруживается почти во всех эукариотических клетках.

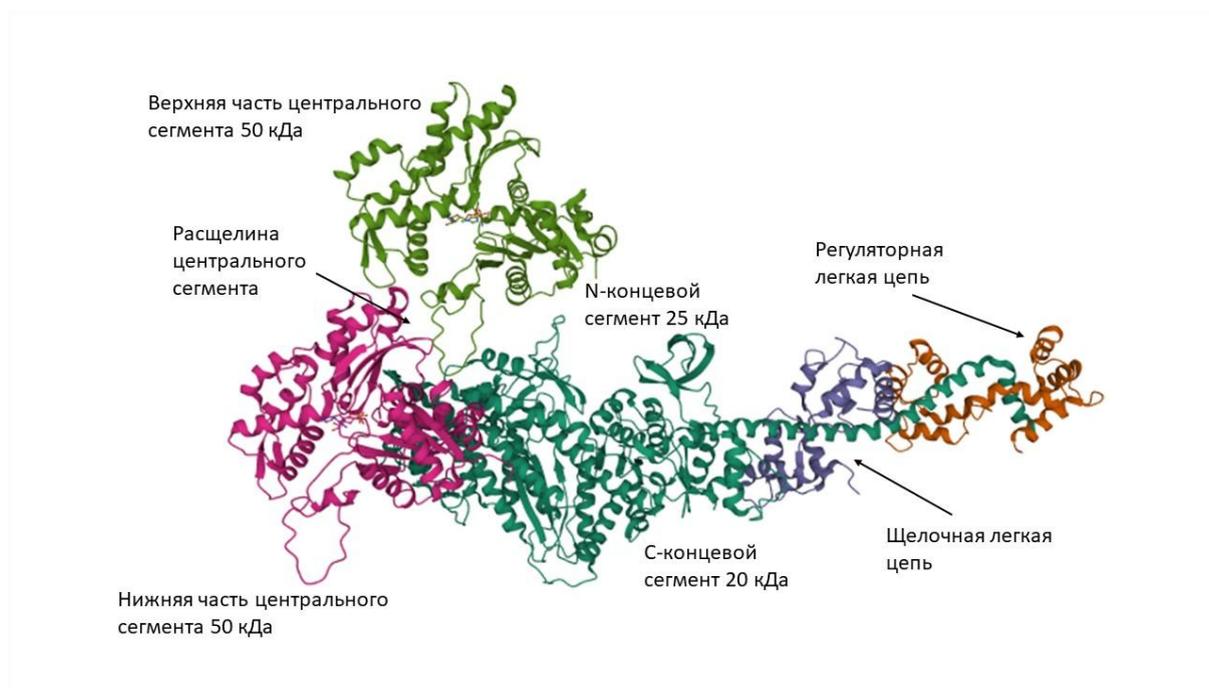


Рисунок 2. Ленточная модель субфрагмента-1 миозина скелетных мышц кролика, созданная на основании данных электронной микроскопии (PDB: 5H53) [Fujii, Namba, 2017].

Все изоформы миозина представляют собой АТФазы, активирующиеся связыванием с актиновым филаментом. АТФазный активный центр находится в области глобулярной части миозина (головки миозина), таким образом, субфрагмент-1, полученный протеолитическим расщеплением миозина альфа-химотрипсином, сохраняет функциональность миозина и может быть использован в модельных экспериментах. Подробная структура S1 разрешением 2.80 Å была впервые получена в 1993 году с помощью рентгеноструктурного анализа [Raument и др., 1993]. Авторы показали, что субфрагмент-1 состоит из двух доменов: моторного и регуляторного, содержащего легкие цепи (рис. 2). Сайт связывания актина и АТФазный центр находятся в моторном домене на небольшом отдалении друг от друга. Профессор М. Дживс и коллеги

показали, что субфрагмент-1 миозина успешно связывается с актином [Geeves, Conibear, 1995].

Миозиновые филаменты образуются путем агрегации молекул миозина. Хвостовые домены упаковываются вместе с образованием толстого филамента, а головки миозина располагаются на поверхности филамента. Толстые филаменты поперечнополосатых мышц позвоночных имеют антипараллельную структуру и собираются вместе в середине филамента и параллельно по обе стороны от центра [Squire, 1973]. Таким образом, в середине филамента есть участок, в котором отсутствуют выступающие головки миозина.

Мономеры миозина состоят из одной или двух тяжелых и нескольких легких цепей. Тяжелые цепи организованы в три структурно и функционально различных домена.

1. *Глобулярный головной домен* (моторный домен или поперечный мостик) содержит актин- и АТФ-связывающие сайты. Последовательность этого домена имеет наибольшую консервативность среди всех изоформ. Актин-связывающий сайт миозина разделен глубокой щелью, способной изменять конформацию в ответ на связывание АТФ. К тому же в моторном домене выделяют конвертерный участок, способный вращаться примерно на 60 градусов при связывании АТФ и высвобождении продуктов гидролиза АТФ.
2. К головке примыкает альфа-спиральная подвижная *шейная область*, связанная с легкими цепями, регулирующими головку миозина. Мышечный миозин содержит две легкие цепи, структурно принадлежащие семейству EF-hand и способные связывать по два иона кальция каждая.
3. *Хвостовой домен* содержит подвижный участок, а также различные участки связывания, определяемые конкретной изоформой миозина. Миозину II класса характерно наличие двухцепочечных альфа-спиральных хвостов, формирующих различные филаменты.

Доменная структура миозина была подтверждена протеолитическими исследованиями. При протеолизе молекулы миозина в области шейки образуются три фрагмента: стержневая часть и две головки, называемые субфрагментом-1 миозина (S1) [Mueller, Perry, 1962]. Участок между двумя шарнирными областями называется субфрагментом-2 миозина (S2). При расщеплении подвижного участка в хвостовой

области образуются тяжелый меромиозин, несущий две головки, и легкий меромиозин. При протеолизе тяжелых цепей S1 образуются три фрагмента: N-концевой массой 25 кДа, центральный – 50 кДа и С-концевой – 20 кДа [Tong, Elzinga, 1990].

Структурные и биохимические исследования выявили детали АТФазного цикла (рис. 3), который сопряжен с механической активностью [De La Cruz, Ostap, 2004; Geeves, Holmes, 1999; Sweeney, Houdusse, 2010]. Как было сказано выше, сайт связывания актина располагается на моторном домене миозина, который расщепляется большой щелью и для плотного связывания актина требует закрытия щели (рисунок 3). Связывание АТФ приводит к открытию щели и отсоединению актина от миозина. Гидролиз АТФ в АТФазном сайте миозина необходим для связывания миозина с актином и происходит непосредственно перед взаимодействием этих белков. При связывании актина с миозином происходит закрытие щели и вытеснение продуктов гидролиза (АДФ и неорганического фосфата). Формируется так называемая “слабая” форма связывания поперечного мостика с филаментом. Во время освобождения продуктов гидролиза миозиновая головка меняет свою конформацию, сдвигая актиновый филамент на расстояние в несколько нанометров (до 10 нм). Этот процесс был назван шагом поперечного мостика или “рабочим ходом” (“power stroke”). В отсутствие АТФ миозиновая головка сильно связана с актином.

TnI, TnC и С-концевой участок TnT образуют глобулярную головку, а остальная часть молекулы TnT образует стержнеобразный хвост.

TnC представляет собой гантелеобразную молекулу с двумя глобулярными N- и С-концевыми доменами, соединенными центральным спиральным линкером [Houdusse и др., 1997]. Каждый глобулярный домен содержит EF-hand, образованный двумя спиральями и Ca^{2+} -связывающей петлей из 12 остатков. N-концевой домен содержит два низкоаффинных сайта связывания ионов кальция, в то время как С-концевой – два высокоаффинных сайта, связывающих ионы кальция и магния. Ca^{2+} -индуцированные конформационные изменения в TnC инициируют структурные изменения во всем тонком филаменте.



Рисунок 4. Ленточная модель тропонинового комплекса скелетных мышц курицы (PDB: 1YTZ), созданная при помощи рентгеноструктурного анализа [Vinogradova и др., 2005].

Известны два гена TnC, идентичные на 66%: один ген кодирует изоформу, экспрессируемую в быстрых мышечных волокнах, а другой кодирует изоформу сердечной мышцы и медленных мышечных волокон. Один из EF-доменов сердечной изоформы неактивен, таким образом эти изоформы способны связывать только 3 иона кальция. Кальций-зависимая регуляция сокращения имеет разные механизмы в сердечной и скелетных мышцах. Согласно кристаллической структуре

скелетно-мышечного TnC связывание двух ионов кальция переключает N-концевой домен из “закрытой” в “открытую” позицию, позволяя TnC взаимодействовать с TnI [Strynadka и др., 1997]. Однако, связывание ионов кальция с сердечным тропонином С только частично открывает сайт связывания с TnI, дальнейшее связывание непосредственно с TnI открывает N-концевой домен [Sia и др., 1997].

TnI является ингибирующей субъединицей комплекса, ответственной за ингибирование активности актин-активируемой миозиновой АТФазы. Существует три известных гена TnI, кодирующих изоформы сердечной, быстрых и медленных скелетных мышц. Все белки обладают высокой гомологией, кроме N-концевого участка из 32 аминокислот, присутствующего только в сердечном тропонине I. Этот уникальный участок содержит два остатка серина, способных фосфорилироваться протеинкиназой А в ответ на адренергическую стимуляцию сердца [Tombe de, Solaro, 2000].

TnT представляет собой филаментный белок 30-35 кДа, который кодируется тремя гомологичными генами, специфически экспрессируемых в медленных скелетных мышцах (*TNNT1*), сердечных мышцах (*TNNT2*) быстрых скелетных мышцах (*TNNT3*) [Barton и др., 1997]. Структурные исследования показали, что TnT связывается с тропомиозином антипараллельно, при этом его С-концевой домен расположен над остатком в позиции 190 тропомиозина, а N-концевой домен простирается над областью соединения двух молекул тропомиозина [Li и др., 2002]. С помощью рентгеновской кристаллографии были выявлены участки связывания TnI и TnT (остатки 224-274 сердечного тропонина и 199-245 быстрой скелетной изоформы тропонина) [Takeda и др., 2003; Vinogradova и др., 2005]. Были обнаружены по крайней мере 2 сайта связывания тропомиозина с TnT: первый сайт из 39 остатков, располагающихся в N-концевой части средней области TnT; второй сайт из 25 остатков на С-концевом участке [Jin, Chong, 2010]. Последовательности этих сайтов связывания высококонсервативны в трех изоформах тропонина. Структура N-концевой области TnT гипервариабельна в разных типах мышц и способна регулировать молекулярную конформацию TnT и его взаимодействие с другими регуляторными белками миофиламентов [Amarasinghe, Jin, 2015; Ogut, Jin, 1996; Wang, Jin, 1998].

1.4. Тропомиозин: структура, функции, патологии

Тропомиозины (Tpm) – это широко распространенные высококонсервативные белки, обнаруженные в эукариотических клетках, которые играют незаменимую роль в разнообразных процессах, которые включают, среди прочего, цитокинез, подвижность клеток, трансформацию клеток или более узкоспециализированные функции, такие как сокращение миофибрилл [Gateva и др., 2017].

1.4.1. Изоформы тропомиозина

Тропомиозины были обнаружены во всех типах эукариот, кроме растений, и имеют множество изоформ. Это разнообразие изоформ создается комбинацией нескольких генов, кодирующих Tpm, альтернативным сплайсингом первичных транскриптов и для некоторых из них использованием альтернативных промоторов.

Тропомиозины млекопитающих и птиц α , β , γ и δ кодируются 4 генами *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* и *TPM4* [Pittenger, Kazzaz, Helfman, 1994]. Исторически тропомиозины подразделяются на два класса, высокомолекулярные и низкомолекулярные, длина которых составляет 284 и 248 остатков соответственно. Это различие в размерах обусловлено использованием альтернативных промоторов, которые приводят к включению экзонов 1a, 2a или 2b для высокомолекулярного или экзона 1b для низкомолекулярного тропомиозина на N-конце белка [Pittenger, Kazzaz, Helfman, 1994].

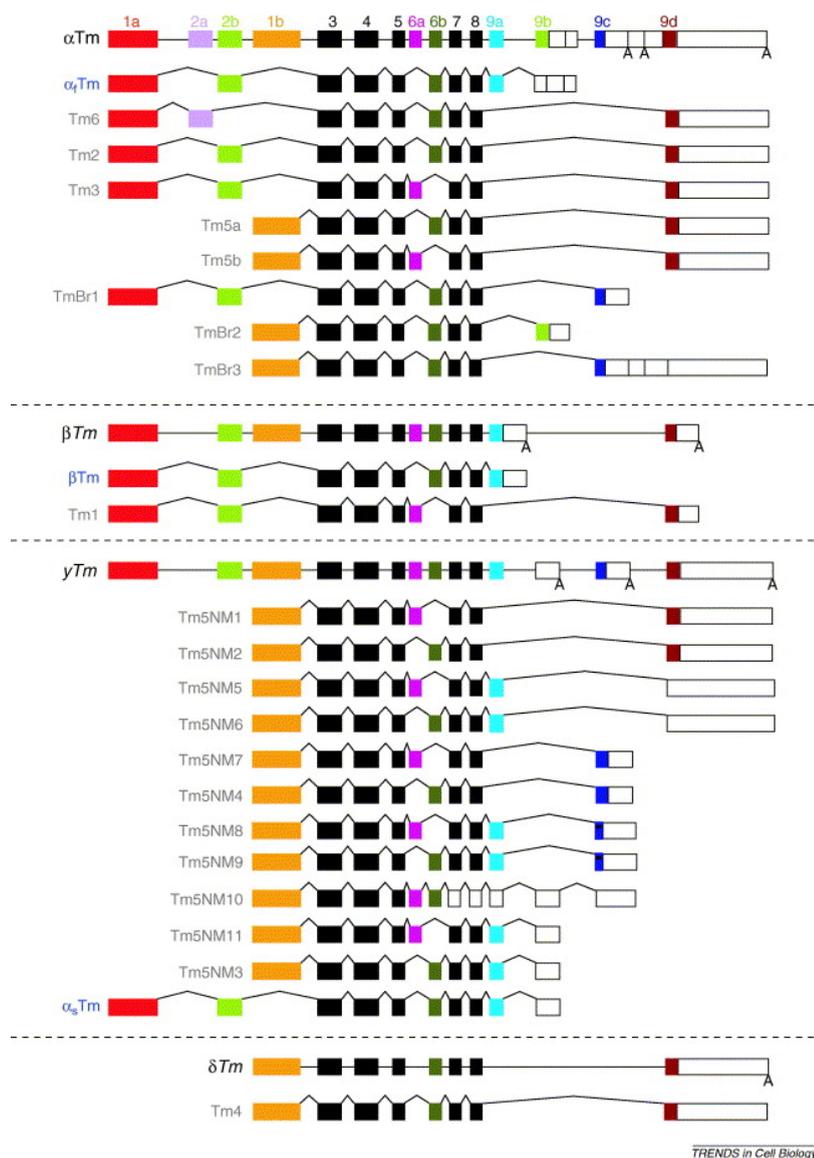


Рисунок 5. Схематичное изображение интрон-экзонной структуры основных изоформ генов тропомиозина (взято из [Gunning и др., 2005]). За счет 4 гомологичных генов тропомиозина (α , β , γ , δ) и альтернативного сплайсинга достигается разнообразие изоформ тропомиозина. Цветовая кодировка отображает степень гомологии последовательности.

Большинство изоформ тропомиозина экспрессируется в разных клетках и тканях, однако есть изоформы, обладающие определенным тропизмом. У человека изоформа поперечно-полосатой мышцы α -Трм (кодируемая *TPM1*) преимущественно экспрессируется в сердечной мышце и быстрых мышечных волокнах типа 2. β -Трм (кодируемый *TPM2*) в основном экспрессируется в медленных, типа 1, и в быстрых мышечных волокнах и сердечной мышце. α -Трм или γ -Трм (кодируемый *TPM3*) преимущественно экспрессируется в медленных мышечных волокнах, а также в сердце

[Schevzov и др., 2016]. Три основные изоформы тропомиозина обладают высокой степенью гомологии аминокислот: α -Трм и β -Трм идентичны на 87%, α -Тм и γ -Тм идентичны на 91%, а β -Тм и γ -Тм идентичны на 86%.

1.4.2. Структура тропомиозина

Тропомиозин относится к классу k-m-e-f α -спиральных белков, включающего также α -кератин, миозин, эпидермин и фибриноген. Эти белки формируют суперспираль, образованную двумя параллельными α -спиралями, обладающими семикратной периодичностью (рис. 6). Суперспираль образуется благодаря наличию гептоповторов *a-b-c-d-e-f-g*, содержащих гидрофобные (в позициях *a* и *d*), заряженные (в позициях *e* и *g*) и полярные (в позициях *b*, *c* и *f*) аминокислотные остатки. Гидрофобные АКО вносят вклад в образование гидрофобного кора суперспирали за счет взаимодействий с тремя остатками соседней спирали. Заряженные радикалы образуют ионные пары с остатками соседней спирали, способствуя формированию гомо- или гетеродимеров. Саркомерные тропомиозины образуют стержнеобразную молекулу диаметром приблизительно 20 Å и длиной 400 Å, что соответствует длине семи актиновых субъединиц в составе актинового филамента.

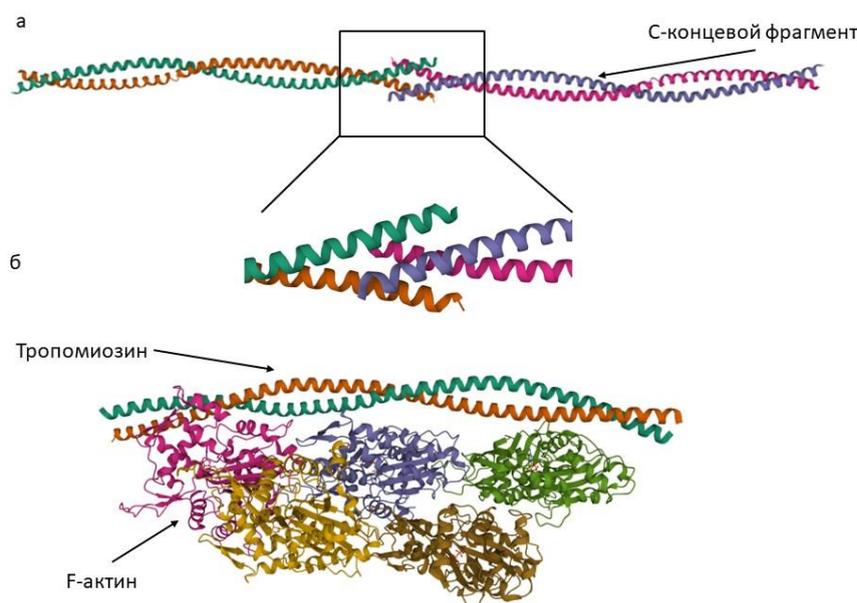


Рисунок 6. Ленточная модель строения (а) тропомиозина скелетных мышц кролика, созданная на основании данных рентгеноструктурного анализа (PDB: 2D3E) [Minakata

и др., 2008], (б) комплекса актина и тропомиозина скелетных мышц мыши, созданная на основании данных электронной микроскопии (PDB: 3J8A) [Ecken и др., 2015].

Структура тропомиозина характеризуется чередованием стабилизирующих и дестабилизирующих АКО. Самым распространенным остатком является аланин, обладающий высокой спиралеобразующей способностью [Kwok, Hodges, 2003]. N-концевой фрагмент (1-81 АКО) содержит два аланинового кластера в гидрофобном коре, способствующих образованию аксиального сдвига тропомиозина относительно актина, который может играть существенную роль во взаимодействии актина и тропомиозина. Центральная часть тропомиозина (89-208 АКО) также содержит аланиновые кластеры, а также участки чередования аланинов (Ala102, Ala109, Ala116) с неканоническими гидрофобными остатками (Met127, Met141), “разрыхляющими” плотную спиральную структуру, которая коррелирует с изгибами актинового филамента. На С-конце за счет прерывания гидрофобного кора молекулы образуются 3 полости. Первая (АКО 207-214) и вторая (АКО 214-221) полости практически переходят одна в другую, и в этой области происходит локальное расплетение и увеличение шага суперспирали. Третья полость, образованная в области остатков Gln263 и Tyr267, совпадает с расхождением цепей тропомиозина друг от друга, что дает им возможность участвовать в образовании связи с N-концом следующей молекулы тропомиозина.

Связывание отдельных молекул тропомиозина с F-актином является чрезвычайно слабым [Wegner, 1979], поскольку расстояние между тонким филаментом и тропомиозином в 40 Å слишком велико для образования ковалентных связей и между этими двумя белками возможны только электростатические взаимодействия. Легкость связывания тропомиозина с актиновым филаментом объясняется тенденцией тропомиозина легко полимеризоваться на тонком филаменте, в результате предварительно сформированной трехмерной структуры тропомиозина и комплементарной структуре актинового филамента [Lehman и др., 2013]. Вследствие такого слабого взаимодействия, тропомиозин способен легко изменять свое положение при связывании и конформационных перестройках тропонина, миозина и других актин-связывающих белков, оставаясь динамично связанным с тонким филаментом.

В молекуле тропомиозина найдено 7 актин-связывающих мотивов в первичной структуре (по ~39 остатков), представленных равноудаленными скоплениями кислых

АКО в положениях b , c и f [Boylan, Phillips, 1986]. Каждый мотив содержит два сегмента (α и β), принимающих участие в связывании разных частей тонкого филамента. При исследовании мутантных изоформ тропомиозина, было предположено, что мотивы не равнозначны, так, например, делеция пятого мотива приводит к полной потере сродства тропомиозина к миозину; мутанты с делециями мотивов 2, 3, 4 и 6 имеют сродство к актину в 10-30 раз меньше, чем нативный белок [Singh, Hitchcock-DeGregori, 2006].

1.4.3. Модель стерического блокирования

Тропомиозин является универсальным регулятором актинового цитоскелета. Как было указано выше, он регулирует взаимодействие актиновых филаментов с актин-связывающими белками, включая миозин, тропонин, формин, тропомодулин. Тропомиозин может активировать или ингибировать актин-миозиновое взаимодействие в зависимости от концентрации ионов кальция [Clayton и др., 2010; Lehrer, Morris, 1984].

Первая модель, объясняющая регуляцию актина с миозином была предложена на собрании Королевского общества в 1963 г [Hanson, Lowy, 1964]. Данные, полученные с помощью метода дифракции рентгеновских лучей интактных мышечных волокон, позволили выдвинуть предположение об изменении азимутального положения тропомиозина на актине в различных физиологических состояниях [Huxley, 1973]. Впоследствии исследования дифракции волокон и реконструкция одиночных молекул с помощью электронного микроскопа показали, что тропомиозин лежит примерно на 10 Å над поверхностью субъединиц актина и связан с тонким филаментом за счет слабых электростатических взаимодействий [Bivin и др., 1991; Lorenz и др., 1995; Poole и др., 2006]. В присутствии тропонина и при низкой концентрации ионов кальция тропомиозин блокирует взаимодействие актина – такое состояние тонкого филамента называется “блокирующим”. В присутствии ионов кальция и тропонина тропомиозин азимутально смещается на актинового филамента, чтобы частично обнажить сайты связывания миозина и “разрешить” слабое связывание поперечных миозиновых мостиков с актином (названное “закрытым” состоянием филамента. Дальнейшее смещение тропомиозина, вызванное связыванием головок миозина, открывает полностью миозин-связывающие сайты на поверхности актинового филамента и переводит филамент в “открытое” состояние [Behrman и др., 2012; Craig, Lehman,

2001; Vibert, Craig, Lehman, 1997]. Сильное связывание миозина с тонкими филаментами сдвигает равновесие филаментов из закрытого состояния в открытое, в котором тропомиозин и миозин связываются с актином с более высоким сродством [Bremel, Weber, 1972; Greene, Eisenberg, 1980].

Методы электронной микроскопии и 3D-реконструкции F-актина в комплексе с различными изоформами тропомиозина показали, что в отсутствие тропонина и миозина тропомиозин занимает блокирующее или закрытое положение на актиновом филаменте, в зависимости от изоформ актина и тропомиозина [Lehman и др., 2000]. Исследование эффектов мутаций в консервативных положениях *b*, *c* и *f* гептадного повтора тропомиозина показало, что АКО в первой половине периодов 2-6 важны для сродства к актину. Замены АКО во второй половине периодов 2-6 оказывали относительно небольшое влияние на сродство тропомиозина к тонкому филаменту [Barua и др., 2012].

1.4.4. Патологии, ассоциированные с мутациями в генах тропомиозина

Наследственные миопатии – это группа генетических нарушений, которые характеризуются гипотонией и слабостью скелетных мышц. Исторически наследственные миопатии классифицируются на основе морфологических особенностей, наблюдаемых в образцах биопсии мышц [North и др., 2014]. К миопатиям, ассоциированным с мутациями в генах белков саркомера, относят немалиновую миопатию, дистальный артрогрипоз, врожденную диспропорцию типов мышечных волокон, кэп-миопатию и некоторые другие варианты.

1.4.4.1. Немалиновая миопатия

Немалиновая миопатия (НМ) – одна из наиболее распространенных недистрофических наследственных миопатий [Colombo и др., 2015]. Отличительными характеристиками НМ являются наличие немалиновых телец в мышечных волокнах. Клиническая картина НМ разнообразна: от легкого нарушения двигательной функции, которое не приводит к снижению продолжительности жизни, до тяжелой дыхательной недостаточности, приводящей к смерти в раннем детском возрасте [Sanoudou, Beggs, 2001]. В настоящее время идентифицировано одиннадцать генов, ассоциированных с НМ, кодирующих белки тонких филаментов скелетных мышц (*NEB*, *ACTA1*, *TPM2*, *TPM3*, *TNNT1*, *CFL2*, *LMOD3*, *KLHL40*, *KLHL41*, *POZ*, *MYO18B*) [Gupta и др., 2013;

Ravenscroft и др., 2013; Sambuughin и др., 2010; Sanoudou, Beggs, 2001; Yuen и др., 2014; Zhao и др., 2020]. Природа нарушений в структуре саркомера может зависеть от того, в каком гене произошла мутация. Так, нарушение регуляции длины тонких филаментов происходит в мышцах, несущих мутации в генах небулина, актина и леймодина-3 [Ottenheijm и др., 2009; Winter de и др., 2016; Yuen и др., 2014]. В мышечной ткани пациентов с мутациями в гене небулина *NEB* наблюдалась более медленная кинетика АТФазного цикла. Мышцы пациентов с мутациями в гене тропомиозина *TPM2* демонстрировали более быструю кинетику переключения миозиновых головок. Мышцы пациентов с мутациями в генах актина *ACTA1* и тропомиозина *TPM3* характеризовались более быстрой или, наоборот, более медленной кинетикой в зависимости от локализации дефекта. Мутации в гене тропомиозина *TPM3* могут как увеличивать, так и уменьшать кальциевую чувствительность генерации силы [Donkervoort и др., 2015; Mokbel и др., 2013; Ottenheijm и др., 2011; Yuen и др., 2015].

В настоящее время все еще неизвестны молекулярные механизмы дисфункции мышечной ткани при НМ. Не существует эффективного лечения пациентов с НМ - применяется только симптоматическая терапия. Зачастую пациентам с НМ требуется ночная вентиляция легких, назогастральное кормление и использование ортезов [Wallgren-Pettersson и др., 2004]. Поскольку саркомер в первую очередь участвует в патологических процессах, лежащих в основе НМ, перспективными терапевтическими мишенями для увеличения мышечной силы при НМ являются способы активации тропонина, модуляции работы миозина, и увеличения уровня экспрессии некоторых нативных белков в скелетных мышцах.

1.4.4.2. Дистальный артрогрипоз

Группа наследственных артрогрипозов – это патологии, которые проявляются наследственными контрактурами как минимум двух суставов, приводящими к значительным ограничениям подвижности суставов [Dahan-Oliel и др., 2019]. Артрогрипоз может быть как самостоятельным, так и сопутствующим заболеванием. Дистальный артрогрипоз является аутосомно-доминантным заболеванием и характеризуется следующими клиническими проявлениями: неправильное положение стопы, врожденная выпуклая стопа, перекрытие пальцев, камптодактилия, отклонение локтевого пальца. Идентифицированы мутации в следующих генах, ассоциированных с дистальным артрогрипозом: эмбриональной изоформы миозина (*MYH3*), тропомиозина

(*TPM2*), тропонина I (*TNNI2*), тропонина T (*TNNT3*), миозин-связывающего белка C1 (*MYBPC1*). Мутации в перечисленных генах повышают чувствительность миофиламентов к ионам кальция, приводят к увеличению мышечной силы и снижению скорости расслабления мышц [Ochala и др., 2012]. На сегодняшний день не существует эффективного лечения дистального артрогрипоза, а основная цель симптоматического лечения состоит в сохранении и восстановлении подвижности пациента.

1.4.4.3. Кэп-миопатия

Кэп-миопатия характеризуются наличием шапочковидных структур, расположенных на периферии мышечных волокон. Кэп-структуры представляют собой неупорядоченные миофибриллы с увеличенными и (или) неорганизованными Z-дисками и не содержат белки толстого филамента. На сегодняшний день зарегистрировано 20 случаев, из них 13 спорадических и 7 семейных [Hung и др., 2010]. Клинические симптомы характеризуются деформациями скелета, нарушением респираторной функции, слабостью мышц. Генетические исследования выявили мутации в трех генах саркомерных белков: актина *ACTA1*, тропомиозина *TPM2* и *TPM3* [De Paula и др., 2009; Hung и др., 2010; Wallgren-Pettersson и др., 2007].

1.4.4.4. Врожденная диспропорция типов мышечных волокон

Врожденная диспропорция типов мышечных волокон является генетически гетерогенным заболеванием, характеризующимся избирательной атрофией медленных волокон, при этом диаметр волокон на 35-40% меньше диаметра быстрых волокон [Goebel, Borchert, 2002]. На сегодняшний день выявлено более 10 мутаций в генах, вызывающих эту патологию [Claeys, 2020]. Наиболее частыми являются мутации в гене тропомиозина *TPM3*: Ala4Val, Arg90Pro, Arg91Pro, Leu100Met, Arg133Pro, Leu148Pro, Arg168Gly, Arg168Cys, Lys169Glu, Glu173Ala, Glu174Ala, Glu241Lys, Arg245Gly, X286Ser [Clarke и др., 2009; Lawlor и др., 2010; Marttila и др., 2014; Munot и др., 2010; Ottenheijm и др., 2011; Robaszkiewicz и др., 2012].

1.5. Фармакологические агенты

Поскольку все еще не существует эффективного лечения наследственных миопатий, идентификация и характеристика фармакологических соединений, которые способны модулировать функциональную активность саркомерных белков являются актуальной научной задачей биологии и медицины. Кроме того, эти соединения представляют собой удобный инструмент для целенаправленного модулирования функции белков с точки зрения оценки внутриклеточных характеристик белков. Компьютерный анализ структуры и влияния таких модуляторов, изучение рентгеновских кристаллографических структур или ЯМР-структур привели к идентификации различных веществ, способных модулировать функцию конкретных мышечных белков.

1.5.1. Ингибиторы миозиновой активности

Одной из основных мишеней для воздействия модуляторов сократительной функции является семейство миозинов. Такие ферменты как протеинкиназы, к которым относится миозин, могут подавляться двумя распространенными типами ингибиторов: конкурентными и неконкурентными [Zhang, Yang, Gray, 2009]. Конкурентные ингибиторы миозиновой АТФазы будут специфически связываться с сайтом-связывания АТФ в головке миозина, предотвращая связывание и гидролиз АТФ. Однако применимость использования конкурентных ингибиторов миозина ограничена тем фактом, что миозины, связанные с конкурентными ингибиторами, остаются постоянно связанными с актином, и стерически препятствуют связыванию актина с неингибированными миозинами. Применимость конкурентных ингибиторов миозина дополнительно ограничивается недостаточной селективностью и возможностью связывать немиозиновые АТФазы и АТФ-связывающие белки в клетке.

На сегодняшний день большинство низкомолекулярных ингибиторов миозина являются неконкурентными ингибиторами, которые препятствуют функциональной активности миозина, связываясь в аллостерическом сайте вне кармана связывания АТФ. Этот тип ингибирования позволяет избирательно ингибировать миозин без блокирования связывания актина неингибированными миозинами и без воздействия на другие АТФазы или АТФ-связывающие белки.

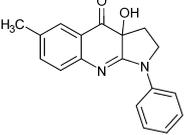
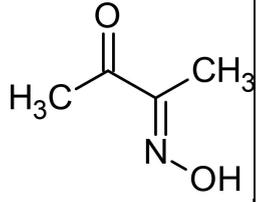
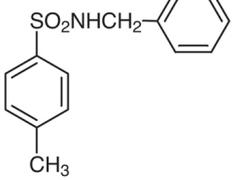
Название	Формула соединения	Сайт связывания	Механизм взаимодействия	Ссылки
Блеббистатин		Гидрофобный карман в щели 50 кДа в моторном домене	Неконкурентный, препятствует освобождению фосфата	[Rauscher и др., 2018; Straight и др., 2003]
BDM		Гидрофобный карман в щели 50 кДа в моторном домене	Неконкурентный, препятствует освобождению фосфата	[Ostap, 2002]
BTS		Гидрофобный карман в щели 50 кДа в моторном домене	Неконкурентный, препятствует освобождению Pi и АДФ	[Cheung и др., 2002; Shaw, Ostap, Goldman, 2003]

Таблица 1. Свойства охарактеризованных низкомолекулярных ингибиторов мышечного миозина.

1.5.1.1. Блеббистатин

Блеббистатин – это хиральный тетрагидропирролохинолинон, широко используемый в исследованиях и хорошо изученный ингибитор миозиновой АТФазы, селективный по отношению к миозину II. Структурные и кинетические исследования показали, что блеббистатин связывается в гидрофобном кармане, находящемся на вершине головки миозина, между сайтами связывания АТФ и актина [Allingham, Smith, Rayment, 2005], приводящее к образованию стабильного комплекса блеббистатин-миозин-АДФ-Ф_н и частичному открытию щели, и ингибированию выхода неорганического фосфата после гидролиза АТФ [Ramamurthy и др., 2004]. По данным структурного анализа комплекса блеббистатин·миозин II·ADP·ванадат *Dictyostelium discoideum* (PDB: 1YV3) наибольший вклад во взаимодействие с блеббистатином вносят гидрофобные взаимодействия с остатками миозина Tyr261, Thr474, Tyr634, Gln637 и Leu641, Ile455,

Ser456 и Ile471, Leu262, Phe466, Glu467, Cys470 и Val630 [Allingham, Smith, Rayment, 2005].

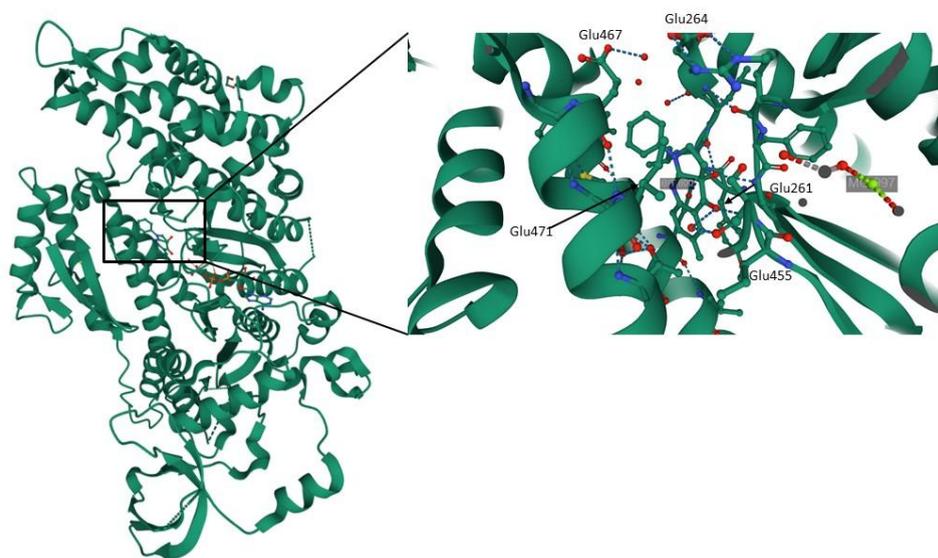


Рисунок 7. Ленточная модель строения миозина в комплексе с блеббистатином и АДФ (PDB: 1YV3) [Allingham, Smith, Rayment, 2005].

Преимуществом блеббистатина является высокая специфичность ингибирования по отношению к миозину. Блеббистатин подавляет активность АТФазы большинства членов класса миозина II с максимальной ингибирующей концентрацией (IC_{50}) в микромолярной концентрации. Исключением является миозин *Drosophila melanogaster*, нечувствительный в концентрациях до 200 мкМ. Концентрации блеббистатина до 150 мкМ не подавляют АТФазную активность неканонических миозинов [Allingham, Smith, Rayment, 2005; Limouze и др., 2004].

К сожалению, блеббистатин имеет недостатки, затрудняющие его использование в качестве возможного фармакологического агента. К ним относятся низкая эффективность, отсутствие селективности по отношению к миозину II, флуоресценция, плохая растворимость в воде, фототоксичность и светочувствительность [Roman, Verhasselt, Stevens, 2018]. Известно несколько аналогов блеббистатина, не имеющих перечисленных недостатков.

1.5.1.2. BTS

BTS (N-бензил-п-толуолсульфонамид) ингибирует актин-активируемую активность АТФазы скелетного миозина II. Исследования показали, что BTS обратимо ингибирует

высвобождение неорганического фосфата из миозина после гидролиза АТФ с максимальной ингибирующей концентрацией (IC_{50}) в микромолярной концентрации [Cheung и др., 2002]. BTS воздействует на миозин II быстрых скелетных мышц в 100 раз сильнее, чем на миозин медленных скелетных мышц, сердечной мышцы или на немышечный миозин. Кинетический анализ влияния BTS на АТФазный цикл предполагает, что BTS снижает скорость высвобождения фосфата из миозина более чем в 100 раз в присутствии актина, а также снижает скорость диссоциации АДФ [Shaw, Ostar, Goldman, 2003].

1.5.1.3. BDM

BDM (2,3-бутандион моноксим) был разработан как реактиватор ацетилхолинэстеразы [Wilson, Ginsburg, 1955], но позже было обнаружено, что BDM обратимо ингибирует мышечное сокращение в скелетных мышцах и ингибирует АТФазную активность миозина II скелетных мышц [Higuchi, Takemori, 1989]. Кинетические исследования показали, что BDM сдвигает равновесие с комплекса миозин·АТФ на миозин·АДФ·ФН и замедляет гидролиз фосфата [Herrmann и др., 1992]. Основными ограничениями использования BDM являются низкое сродство к миозину – для достижения ингибирования миозина требуются миллимолярные концентрации [Sellin, McArdle, 1994], а также противоречивые данные о сродстве с другими классами миозина. Крамер и Митчисон показали, что BDM также ингибирует активность АТФазы немышечного миозина II, миозина V и миозина VI, но не ингибирует активность АТФазы кинезина [Cramer, Mitchison, 1995]. Позже было показано, что BDM не ингибирует миозин I, V и IV и немышечный миозин II [Cheung и др., 2002]. В дополнение к своей роли реактиватора ацетилхолинэстеразы, BDM ингибирует киназу легких цепей миозина [Siegman и др., 1994] и влияет на ионные каналы в мышечных и нервных клетках [Sellin, McArdle, 1994], на фосфорилирование белков в кардиомиоцитах [Stapleton, Fuchsbaauer, Allshire, 1998] и подавляет митохондриальное дыхание, воздействуя на цепь переноса электронов [Hall, Hausenloy, 2016].

1.5.2. Модуляторы активности тропонина

Еще одним потенциальным инструментом лечения миопатий являются соединения, модулирующие сродство кальциевых белков тонких филаментов. В сердечных и скелетных мышцах тропониновый комплекс включает и выключает сокращение мышц в зависимости от наличия ионов кальция. На сегодняшний день известно несколько

реагентов (Таблица 2), способных связываться с тропониновым комплексом и модулировать его аффинность связывания с ионами кальция.

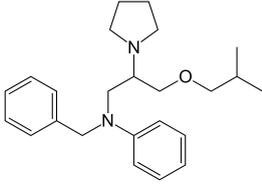
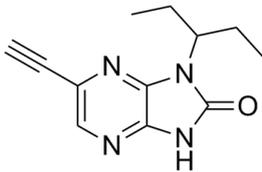
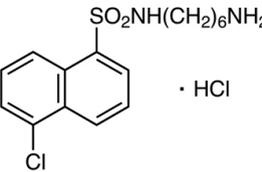
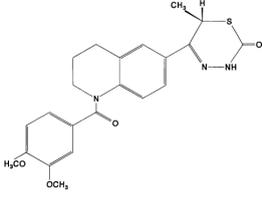
Название	Формула соединения	Механизм действия	Ссылки
Бепридил		Увеличивает сродство тропонина С к ионам кальция	[Abusamhadneh и др., 2001]
Тирасемтив (СК-2017357)		Увеличивает сродство тропонина С к ионам кальция	[Hansen и др., 2014; Shefner и др., 2019]
W7		Ингибитор сердечного, медленного и быстрого скелетного тропонина	[Hidaka Н и др., 1978; Hidaka и др., 1980; Hoffman, Sykes, 2009]
EMD 570033		Связывается с С-концом в области сайтов связывания с кальцием, увеличивает активность	[Wang и др., 2001]

Таблица 2. Свойства охарактеризованных низкомолекулярных ингибиторов скелетного тропонинового комплекса.

1.5.2.1. Бепридил

Бепридил способен связывать тропонин С и модулировать аффинность регуляторного домена [Kischel и др., 2000]. В присутствии бепридила сродство к кальцию в регуляторном сайте увеличивается [MacLachlan Lk и др., 1990]. Это увеличение наблюдалось в быстрых и медленных скелетных волокнах, однако, эффект был сильнее в медленных волокнах [Kischel P, Stevens L, Mounier Y, 1999]. Связывание реагента с тропонином С не вызывало изменения количества поперечных мостиков, участвующих в связывании с актином [Kischel P, Stevens L, Mounier Y, 1999]. С помощью метода ЯМР определили кристаллическую структуру сердечного тропонина С, связанного с тремя ионами кальция в комплексе с бепридилом с разрешением 2 Å. Было обнаружено, что две молекулы бепридила расположены в гидрофобной полости между глобулярными доменами тропонина С и контактируют с обоими доменами, стабилизируя конформацию открытого регуляторного домена [Abusamhadneh и др., 2001; Li и др., 2000]. Варугезе с коллегами с помощью компьютерного анализа показали, что связывание бепридила в гидрофобном кармане сердечного тропонина С снижает взаимодействие тропонина С с тропонином I за счет снижения корреляции движения между сегментами субъединиц тропонина [Varughese и др., 2011]. При низких концентрациях ионов кальция бепридил усиливает АТФазную активность миозина, однако, при высоких концентрациях активность ингибируется [Varughese и др., 2011]. Бепридил увеличивает чувствительность к ионам кальция в изолированном тропонине С, изменяя координацию кальция, однако при взаимодействии с нативным тропониновым комплексом бепридил изменяет корреляцию сайтов связывания ионов кальция и снижает эффективность взаимодействия TnC-TnI как в N-, так и в C-доменах TnC [Varughese и др., 2011].

1.5.2.2. Тирасемтив (СК-2017357)

Рассел с соавторами в 2012 году разработали низкомолекулярный селективный активатор быстрого скелетного тропонина СК-2017357. СК-2017357 замедляет скорость высвобождения кальция, увеличивает сродство тропонина к кальцию, повышает кальциевую чувствительность и увеличивает мышечную силу. В доклинических моделях тирасемтив усиливал мышечный ответ на субмаксимальную нервную стимуляцию [Russell и др., 2012]. В клинических испытаниях тирасемтив вызывал значительное увеличение силы, вызываемой в большеберцовой мышце за счет

электрической стимуляции малоберцового нерва [Andrews и др., 2018; Hansen и др., 2014]. Однако клиническое исследование Шефнера и коллег показало плохую переносимость препарата и эффект, не достигающий клинической и статистической значимости у пациентов с боковым амиотическим склерозом [Shefner и др., 2019].

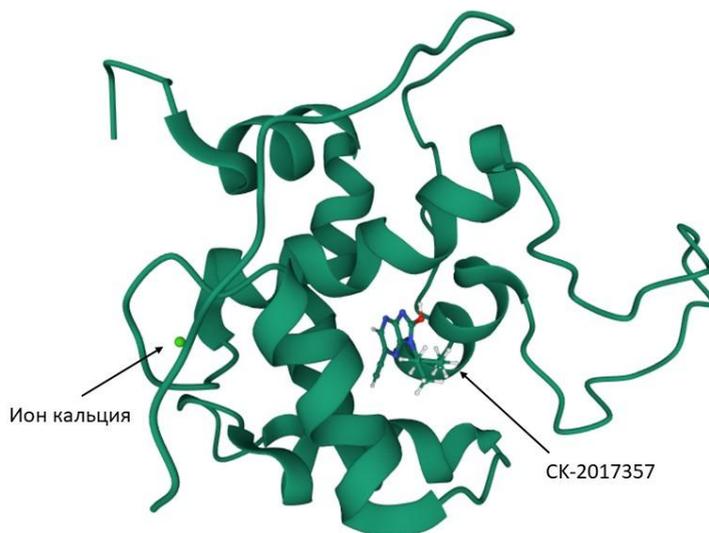


Рисунок 8. Ленточная модель строения сердечного тропонина С в комплексе с СК-2017357 (PDB: 7КАА) [Li и др., 2021].

1.5.2.3. EMD 57033

EMD 57033 является одним из энантиомеров кардиотонического агента EMD 53988, увеличивающего генерацию силы в сердечных мышцах. Энантиомеры EMD 57033 и EMD 57439 отличаются положением метильной группы, связанной с шестым углеродным атомом [Schipke, Korbmacher, 1996]. Отрицательный изомер, EMD 57439, действует как ингибитор фосфодиэстеразы III. EMD 57033 почти не обладает ингибирующей активностью по отношению к фосфодиэстеразе и действует как сенсibilизатор кальция [Beier и др., 1991]. Было показано, что он увеличивает максимальную силу активации кальцием в сердечной мышце [Arteaga, Kobayashi, Solaro, 2002; Wang и др., 2001] и скелетных мышцах [Lipscomb-Allhouse, Mulligan, Ashley, 2001]. С помощью метода ЯМР было выявлено, что EMD 57033 связывается с С-концом TnC в области сайтов связывания с кальцием [Wang и др., 2001] и увеличивает сродство тропонина С к ингибирующему тропонину I за счет стабилизации открытого гидрофобного кармана на С-конце TnC. EMD 57033 действует значительно эффективнее с сердечными изоформами TnC [Lipscomb и др., 2005],

поскольку в сердечном комплексе гидрофобная цель TnC не открывается полностью до момента связывания с TnI, в отличие от скелетной изоформы, в которой гидрофобная щель открывается легко для взаимодействия с TnI [Lipscomb и др., 2005].

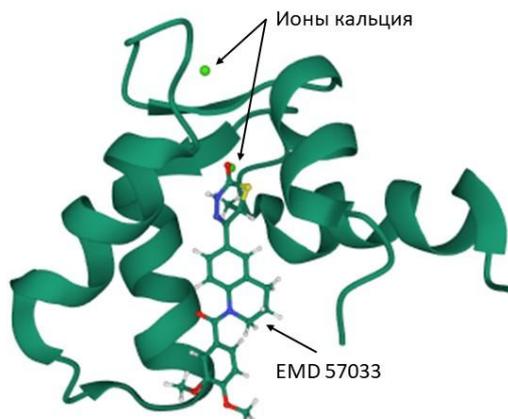


Рисунок 9. Ленточная модель строения сердечного тропонина С в комплексе с EMD 57033 (PDB: 1PH0) [Wang и др., 2001]

1.5.2.4. W7

W7 (N-(6-аминогексил)-5-хлоро-1-нафталенсульфонамид), первоначально использовался в качестве ингибитора актомиозина гладких мышц сосудов [Hidaka H и др., 1978]. Затем было обнаружено, что W7 является антагонистом кальмодулина и тропонина и ингибирует регулируемые кальцием АТФазу и протеинкиназу [Hidaka и др., 1980]. Исследования методом ЯМР показали, что W7 связывается с гидрофобным карманом тропонина С, сдвигая тропонин С от его сайта-связывания с тропонином I [Oleszczuk и др., 2010]. Было показано, что W7 обратимо ингибирует Ca²⁺-зависимую активацию в скелетных мышечных волокнах и кардиомиоцитах, снижает АТФазную активность миозина и напряжение [Adhikari Bb, Wang K, 2004].

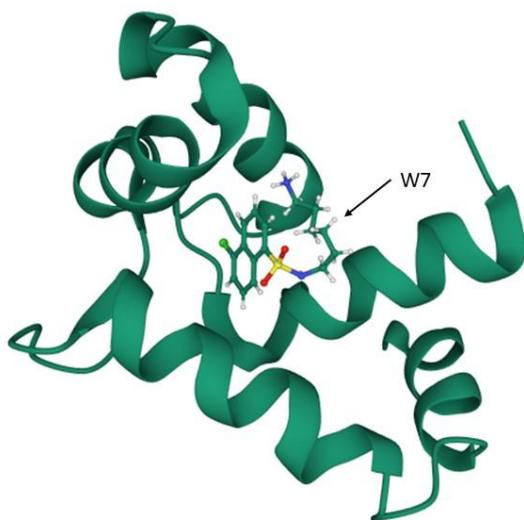


Рисунок 10. Ленточная модель строения сердечного тропонина С в комплексе с W7 (PDB: 2KFX) [Hoffman, Sykes, 2009].

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Получение глицеринизированных мышечных волокон.

Глицеринизированные волокна получали из поясничных мышц (*Musculus psoas*) кролика согласно методике, описанной ранее [Szent-Gyorgyi, 1949]. Пучок мышечных волокон закрепляли на лигатурах и помещали на сутки в охлажденный до 2-4 °С глицеринизирующий раствор, содержащий 100 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0) и 50% глицерин. Затем пучки помещали в новый глицеринизирующий раствор на 24 часа. После смены глицеринизирующего раствора материал хранили в течение 4-5 суток при -20 °С.

2.2. Получение теневых волокон

Мышечные волокна отмывали от глицеринизирующего раствора в течение 5-10 минут в стандартном отмывающем 67 мМ растворе K-Na фосфатного буфера, содержащего 41 мМ NaH₂PO₄*12H₂O, 27 мМ KH₂PO₄, 100 мМ MgCl₂*6H₂O.

Теневые мышечные волокна получали путем удаления миозина и регуляторных белков при инкубации одиночных волокон в экстрагирующем растворе, содержащем 800 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ АТР, 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0) в течение 75-80 минут. После процесса инкубации теневые волокна прикрепляли на предметное стекло с помощью клея БФ и тщательно отмывали раствором, содержащим 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 6.7 мМ фосфатный буфер (pH 7.0). По данным электрофоретического анализа теневые волокна состоят на 80-90 % из чистых актиновых филаментов, а также из белков Z-линии и некоторых белков с высоким молекулярным весом [Borovikov и др., 1982].

2.3. Получение субфрагмента-1 миозина

Миозин выделяли из скелетных мышц кролика согласно модифицированной методике Иванова и Юрьева [Иванов, Юрьев, В.А, 1961]. Субфрагмент-1 (S1) получали протеолизом скелетного мышечного миозина α-химотрипсином в течение 20 мин при 25 °С в буфере, содержащем 0.01 М трис-HCl (pH 6.8), 0.12 М NaCl, 2 мМ ЭДТА и 1 мМ NaN₃, в весовом соотношении 1:300. Процесс протеолиза останавливали добавлением фенолметилсульфонилфлуорида (PMSF) до конечной концентрации 1 мкМ. Затем

суспензию центрифугировали при 13600xg в течение 15 мин. Осадок диализовали в буфере, содержащем 0.02 М трис-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM NaN₃.

Затем S1 модифицировали с помощью флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS, по ранее описанной методике [Borejdo, Putnam, 1977]. S1 смешивали с красителем в молярном соотношении 1:1.2 в течение 4 часов на льду, реакцию останавливали добавлением ДТТ (дитиотреит). Для удаления несвязавшегося красителя раствор диализовали против буфера, содержащего 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 10 mM трис-HCl буфер (pH 6.8). Полученный субфрагмент-1 хранили в термосе на льду и использовали в течение 15-18 дней.

2.4. Получение тропонина

Тропонин получали из ацетонового порошка, выделенного из скелетных мышц кролика [Potter, 1982] с помощью протеолиза (Sigma-Aldrich, P2714) в буфере, содержащем 1M KCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.2 mM PMSF, 1 mM DTT, 0.1 mM NaN₃, TRIS-HCl (pH 8.0) в течение 5 ч при комнатной температуре. Суспензию центрифугировали при 13600 g в течение 40 мин при 4 °C. Тропонин высаливали с помощью (NH₄)₂SO₄ и диализовали против раствора, содержащего 0.02% NaN₃, 1 mM ДТТ, 30 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl (pH 7.0).

2.5. Получение рекомбинантного γ -тропомиозина

Рекомбинантный γ -тропомиозин был любезно предоставлен профессором кафедры медицины Оксфордского университета Ч. Рэдвудом; методики экспрессии тропомиозинов можно посмотреть в указанных работах [Robinson et al., 2008; Robaszkiewicz и др., 2012].

2.6. Измерение концентрации белков

Концентрацию мышечных мелков измеряли с помощью спектрофотометра UV-2700 (Shimadzu, Япония), с использованием следующих коэффициентов поглощения и молекулярных масс:

Белок	Коэффициент поглощения, $E_{280}, ((\text{мг/мл})^{-1}\text{см}^{-1})$	Молекулярная масса, кДа
S1	0.75	110
Скелетный мышечный тропомиозин	0.24	66
Скелетный мышечный тропонин	0.45	80

Таблица 3. Коэффициенты поглощения и молекулярные массы мышечных белков.

2.7. Электрофорез в полиакриламидном геле

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 (ДСН) [Laemmli, 1970].

Электрофорез проводили в вертикальном ПААГ, используя 4% концентрирующий и 12% 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 5-8 волокон и 2-5 мкг отдельных белков.

В течение пропускания образцов через концентрирующий гель напряжение устанавливали 100 В, а при прохождении образцов в разделяющем геле – увеличивали напряжение до 140 В. После проведения электрофореза гели окрашивали в растворе, содержащем 10% CH_3COOH , 25% изопропанол и 0.05% Кумасси R-250, в течение 20 мин при тщательном перемешивании раствора. Избыток красителя отмывали 10% уксусной кислотой в течение 8-10 ч.

2.8. Метод поляризационной микрофлуориметрии

Измерение поляризованной флуоресценции проб, специфически связанных с белком, может предоставить информацию об ориентации и подвижности белка. В настоящей работе с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии были оценены изменения структурных состояний миозина, тропомиозина и актина при моделировании в мышечном волокне нескольких стадий АТФазного цикла поперечного

миозинового мостика. Измерения проводили с помощью поляризационного фотометра МИ-47, принцип работы которого описан ранее [Июффе и др., 1974].

Экспериментальные данные анализировали с использованием модель-зависимого метода [Borovikov и др., 2004; Wilson, Mendelson, 1983; Yanagida, Oosawa, 1978]. Согласно предложенной модели, в мышечном волокне имеется две популяции флуорофоров: популяция упорядоченных флуорофоров, ориентированных регулярно по спирали, и популяция хаотичных флуорофоров (N). Углы Φ_A и Φ_E образованы упорядоченными флуорофорами с осцилляторами поглощения A и излучения E, соответственно, и осью тонкого филамента. Вследствие гибкости тонкого филамента угол между осью волокна и осью тонкого филамента $\Theta_{1/2}$ не равен нулю.

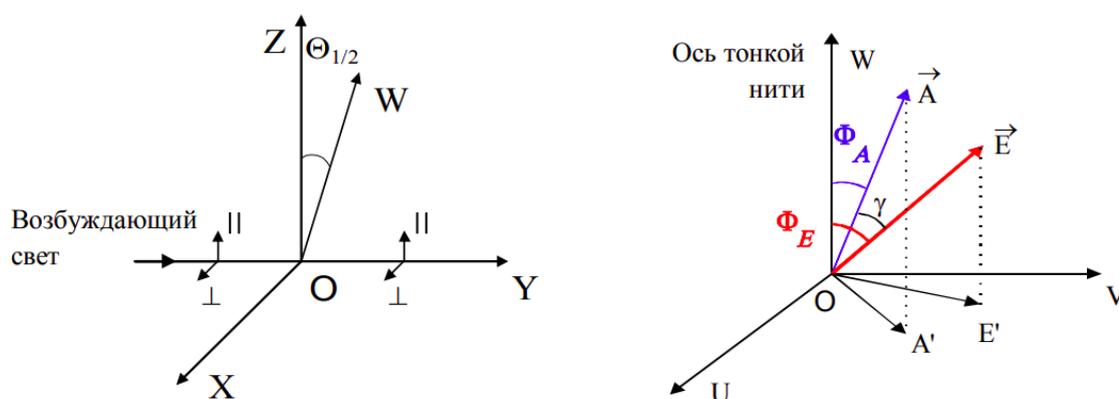


Рисунок 11. Схемы, объясняющие вычисления отдельных параметров поляризационной флуоресценции [Yanagida, Oosawa, 1978]. W – ось тонкого филамента, Φ_A , Φ_E – углы ориентации диполей поглощения и излучения проб, связанных с белком.

Параметры N, $\Theta_{1/2}$, Φ_A , Φ_E вычисляли с помощью измерения интенсивностей поляризационной флуоресценции зонда при ориентации волокна параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света. Степень поляризации света определяли по формулам (1) и (2).

$$P = \frac{||I_{||} - ||I_{\perp}}{||I_{||} + ||I_{\perp}} \quad (1)$$

$$P = \frac{\perp I_{||} - \perp I_{\perp}}{\perp I_{||} + \perp I_{\perp}} \quad (2)$$

Флуоресценцию S1-AEDANS возбуждали при 407 ± 5 нм с последующей регистрацией при 500-600 нм. Интенсивность флуоресценции регистрировали в 5 разных точках

каждого мышечного волокна. Все измерения проводились в отмывающем растворе в отсутствие или в присутствии 3 мМ АДФ (стадия $AM^{\wedge} \cdot ADP$), 5 мМ АТФ (стадия $AM^{**} \cdot ATP$), 50 мМ BDM, 100 мкМ W7. Статистическую достоверность оценивали с помощью t-критерия Стьюдента [STUDENT, 1908].

2.9. Измерение АТФазной активности

АТФазную активность субфрагмента-1 миозина, активируемую актином, определяли при температуре 25 °С с помощью измерения скорости высвобождения неорганического фосфата. Исследование проводили в 0.4 мл раствора, содержащего 12 мМ Tris-HCl (pH 6,0), 2.5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ KCl, и 2 мМ ДТТ. Реакцию запускали добавлением раствора АТФ в конечной концентрации 2 мМ и через 10 мин останавливали 9% раствором ТХУ. После центрифугирования в течение 5 мин при 2000 x g количество неорганического фосфата в супернатанте определяли по методу [King, 1932]. Пробы инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и фотометрировали при 640 нм.

Глава 3. Результаты и обсуждение

В настоящей главе представлены результаты изучения конформационных перестроек головок миозина в реконструированных теневых волокнах, содержащих рекомбинантный тропомиозин, при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ. Исследования проводили методом поляризационной микрофлуориметрии [Borovikov и др., 2009; Borovikov и др., 2004].

При анализе результатов приводятся три основных параметра флуоресценции красителя, связанного с субфрагментом-1 миозина, определенные с помощью модель-зависимого метода: угол ориентации диполей излучения красителя Φ_E , количество хаотически ориентированных флуорофоров N и жесткость на изгиб тонких филаментов ϵ . Согласно ранее предложенной интерпретации, изменения параметра Φ_E для S1-AEDANS свидетельствуют о наклоне головки миозина (или по крайней мере SH1-спирали миозина) относительно оси волокна [Borejdo, Talent, Akopova, 2006; Borovikov, 1999]. Параметр N рассматривается как показатель подвижности головки миозина или сродства S1 к актину [Borovikov, 1999]. Значение жесткости на изгиб ϵ показывает гибкость тонких филаментов и связан с персистентной длиной филамента. Каждая фаза цикла гидролиза АТФ характеризуется определенными параметрами поляризованной флуоресценции. Определив данные параметры, можно оценить влияние мутантных регуляторных белков и фармакологических агентов на конформационные перестройки головки миозина на разных стадиях АТФазного цикла. Промежуточные структурные состояния актомиозинового комплекса моделировали с помощью нуклеотидов: 3 мМ АТФ – для симуляции слабой формы связывания (AM^{**} -АТР), 3 мМ АДФ или в отсутствие нуклеотида для моделирования сильных форм связывания (AM^{\wedge} -ADP или AM, соответственно) [Lymn, Taylor, 1971; Steffen, Sleep, 2004].

Кроме того, проведено исследование АТФазной активности при возрастающей концентрации ионов кальция в отсутствие и в присутствии мутации в тропомиозине. Влияние концентрации ионов кальция, а также фармакологических агентов BDM и W7 на кальциевую чувствительность тонких филаментов выражали в количестве выделенного неорганического фосфата.

3.1. Исследование влияния мутации R90P в γ -тропомиозине, связанной с наследственной миопатией, на механизмы регуляции тропомиозином актин-миозинового взаимодействия

3.1.1. Влияние мутации R90P в Трп3.12 на кальциевую чувствительность тонких филаментов

Влияние мутантного тропомиозина на Ca^{2+} -зависимую актин-активируемую АТФазную активность комплекса актин-тропонин-тропомиозин-S1 определяли с помощью измерения количества выделенного неорганического фосфата в реакции гидролиза молекулы АТФ.

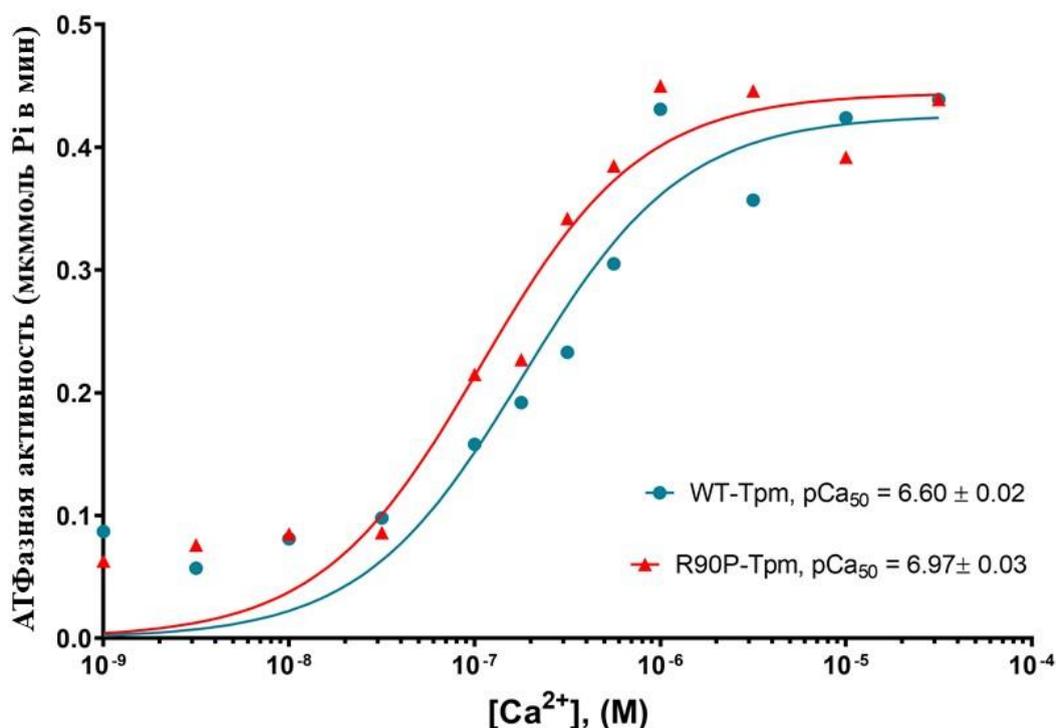


Рисунок 12. Влияние различных концентраций Ca^{2+} на АТФазную активность тонких филаментов, содержащих γ -Трп с мутацией R90P и контрольный тропомиозин. Кальциевая зависимость была определена для полностью регулируемых восстановленных тонких филаментов. Условия измерений приведены в главе “Материалы и методы”. Усредненные значения $p\text{Ca}_{50}$ были рассчитаны на основе данных трех экспериментов.

Согласно рисунку 12, максимальная АТФазная активность миозина для комплексов с мутантным тропомиозином и тропомиозином дикого типа (не содержащим мутации), при высокой концентрации ионов кальция (0.1 мМ Ca^{2+}) не отличается друг от друга. Однако сдвиг кривой в левую область указывает на увеличение Ca^{2+} -чувствительности

тонких филаментов. Параметр pCa_{50} составил 6.97 ± 0.03 для мутантного тропомиозина и 6.60 ± 0.02 для тропомиозина дикого типа, что свидетельствует об увеличении Ca^{2+} -чувствительности тонких филаментов, содержащих R90P-Trp по сравнению с филаментами, содержащими тропомиозин дикого типа.

3.1.2. Влияние мутации R90P в Trp3.12 на пространственную организацию и подвижность головок миозина, а также на позицию и гибкость тропомиозина в АТФазном цикле

Для исследования эффектов мутации R90P в γ -тропомиозине, S1-AEDANS инкорпорировали в теневые мышечные волокна, и затем регистрировали интенсивности флуоресценции в двух направлениях относительно плоскости поляризации – параллельном и перпендикулярном.

Модификация Cys707 с помощью 1,5-IAEDANS может влиять на некоторые аспекты работы миозина, однако головки миозина сохраняют чувствительность к нуклеотидам [Bobkov и др., 1997; Onishi, Nitani, 2008; Titus, Ashiba, Szent-Györgyi, 1989]. В частности, модификация Cys707 не влияет на сильное и слабое связывание субфрагмента-1 миозина с актином [Bobkov и др., 1997]. В предыдущих экспериментах, проведенных в лаборатории, также не было обнаружено влияния модификации ни на сильное, ни на слабое связывание [Borovikov и др., 2015], и, таким образом, данный метод может быть использован для изучения конформационных перестроек миозинового поперечного мостика. Также было показано, что изменения в значении Φ_E для комплекса S1-AEDANS коррелируют с изменением количества головок миозина, слабо и сильно связанных с актином [Borovikov и др., 2009; Borovikov и др., 2004; Borovikov и др., 2015; Borovikov, Gusev, 1983].

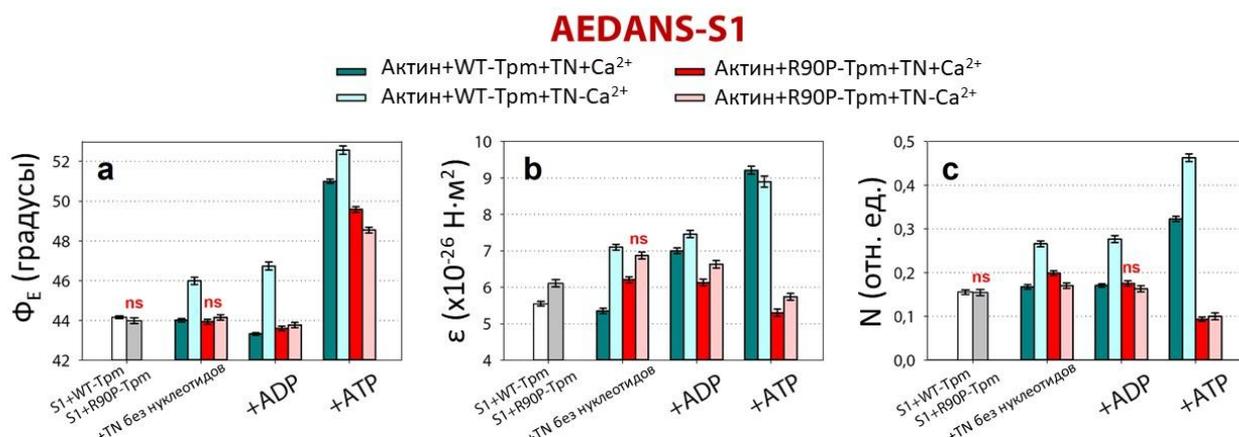


Рисунок 13. Значения Φ_E (a), ε (b) и N (c) поляризованной флуоресценции зондов S1-AEDANS, связанного с актином в теневых волокнах, при моделировании разных промежуточных стадий АТФазного цикла в присутствии контрольного и R90P-мутантного Трм. Каждое значение является средним значением для 5-7 волокон в 5 точках для каждого волокна (всего 25-35 измерений). Символами “ns” обозначены недостоверные различия значений параметров между волокнами, содержащими R90P-Трм или WT-Трм, в остальных случаях изменения достоверны, $p < 0.05$. Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения.

Поскольку флуоресцентный зонд жестко связан с субфрагментом-1 миозина, считается, что параметр ε отражает значение жесткости актиновых филаментов в области локализации головок миозина, а параметр N позволяет оценить сродство S1 к актину (рис. 14). Предыдущие эксперименты, проведенные в нашей лаборатории, показали возможность распространения конформационных изменений мономеров актина вдоль всего тонкого филамента [Borovikov, 1999; Borovikov и др., 2017b; Borovikov, Gusev, 1983].

Нуклеотиды могут способствовать частичной диссоциации S1 от актина. Так, раствор, содержащий АТФ, вызывал некоторое уменьшение интенсивности флуоресценции S1-AEDANS, что свидетельствует об образовании слабой формы связывания и удалении не связанных с актином головок миозина из мышечных волокон. В присутствии АДФ или в отсутствие нуклеотидов интенсивность флуоресценции оставалась неизменной, указывая на то, что S1 практически не диссоциирует от актинового филамента и образует сильную форму связывания с актиновым филаментом.

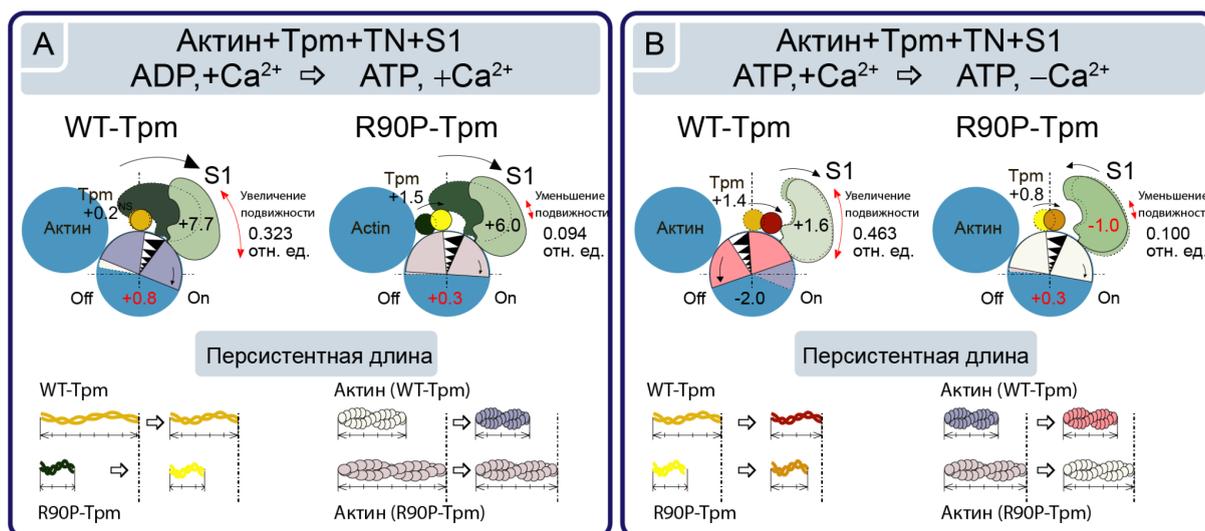


Рисунок 14. Схема, объясняющая изменения в конформации тропомиозина, угловой ориентации мономеров актина и миозина, и персистентной длине тропомиозина и актинового филамента в результате замены R90P в тропомиозине. Информация получена в результате расчета значений Φ_E – углов ориентации диполей излучения флуоресцентных зондов, связанных с S1, N – количество хаотически ориентированных флуорофоров и значения ϵ – жесткости на изгиб. Изменения значения угла Φ_E интерпретируются как азимутальный наклон моторного домена миозина. Переход комплекса актин-Трп-ТН-S1 из состояния сильного связывания в присутствии АДФ с высокой концентрацией ионов кальция в состояние слабого связывания в присутствии АТФ с высокой концентрацией ионов кальция (А) и аналогично при низких концентрациях ионов кальция (В). Обозначения: амплитуды изменения угла Φ_E при низкой и высокой концентрациях ионов кальция показаны числами, направление конформационных изменений показаны стрелками. Красный цвет используется для изменений, характерных для перехода комплекса в активированное состояние, разными оттенками зеленого показаны различные конформационные состояния миозиновой головки. Изменения значений Φ_E для зондов, связанных с тропомиозином и актином были получены ранее [Borovikov и др., in press].

Согласно рисунку 13, значения угла Φ_E , жесткости на изгиб ϵ и относительного числа неупорядоченных флуорофоров N для комплекса актин-WT-Трп-AEDANS-S1 равны 44.2° , $5.55 \times 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$ и 0.156 отн. единиц, соответственно, что указывает на высокую упорядоченность головок миозина, прочно связанных с F-актином [Borovikov и др., 2009; Borovikov и др., 2017b; Borovikov и др., 2018; Borovikov и др., 2020].

Добавление тропонина к комплексу, содержащему контрольный тропомиозин, при высокой концентрации ионов кальция уменьшало значения Φ_E , ϵ и N на 0.2° , $0.2 \times 10^{-26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$ и 0.02 отн. ед. ($p < 0.05$), соответственно. Данные изменения можно интерпретировать как увеличение популяции миозиновых головок, прочно связанных с

актином [Borovikov и др., 2009; Borovikov и др., 2017; Borovikov и др., 2018; Borovikov и др., 2020a; Borovikov и др., 2020b]. Напротив, в условиях низкой концентрации ионов кальция эти параметры увеличиваются (на 2.0° , 1.5×10^{-26} Н·м² и 0.11 отн. ед. ($p < 0,05$) соответственно), указывая на ингибирование образования форм сильного связывания S1 и актина. В комплексе с мутантным тропомиозином при низкой концентрации ионов кальция популяция сильно связанных с актиновым филаментом миозиновых головок увеличивалась (в отсутствие нуклеотида значения Φ_E , ϵ и N были ниже для R90P-Трпм, чем для WT-Трпм на 2.0° , 0.86×10^{-26} Н·м² и 0.095 отн. ед. соответственно).

В экспериментах, моделирующих стадии сильного связывания в присутствии АДФ и высокой концентрации ионов кальция, значения параметров ϵ и N увеличивались, а Φ_E уменьшались. Эти изменения отражают наклон миозиновых головок по направлению к оси F-актина и уменьшение сродства S1 к актиновому филаменту. При низкой концентрации ионов кальция в присутствии АДФ наблюдалось увеличение значений параметров Φ_E , ϵ и N относительно значений, полученных в экспериментах с высокой концентрацией. При моделировании сильного связывания, WT-Трпм расположен близко к открытому положению, количество включенных мономеров актина и прочно связанных головок миозина были выше, чем при низком уровне Ca^{2+} . В комплексе с мутантным тропомиозином при низкой концентрации ионов кальция в отличие от комплекса с тропомиозином дикого типа значения Φ_E , ϵ и N уменьшались на 3.0° , 0.83×10^{-26} Н·м² и 0.114 отн. ед., соответственно. Такие изменения указывают на поворот головки миозина к центру актинового филамента и увеличение сродства миозиновых головок к тонкому филаменту.

При моделировании слабого связывания миозина с актином в присутствии АТФ наблюдали увеличение значений параметров (Φ_E и N) в условиях высокой и низкой концентрации ионов кальция. Добавление АТФ к комплексу, содержащему R90P-мутантный тропомиозин, приводило к снижению значения Φ_E на 4.0° и оказывало сильное влияние на жесткость F-актина в месте локализации миозиновой головки и на гибкость прикрепления миозиновой головки к F-актину (значения ϵ и N снижались на 39% и 79%). Данное изменение демонстрирует повышенную гибкость F-актина, вместо ожидаемого увеличения жесткости актинового филамента, характерного для релаксации. Примечательно, что жесткость связывания составляла 5.74×10^{-26} Н·м², приближаясь к значению ϵ в присутствии WT-Трпм при высокой концентрации Ca^{2+} . Такие изменения параметров могут свидетельствовать об

образовании в мышечных волокнах так называемых ригорных миозиновых головок [Borovikov и др., 2018; Borovikov и др., 2020].

Мутация R90P в Tpm при высокой концентрации Ca^{2+} незначительно уменьшает или не меняет количество сильно связанных миозиновых головок в экспериментах без нуклеотида или с добавлением АДФ. В присутствии АТФ параметры Φ_E , ϵ и N существенно уменьшаются (на 1.43° , 4.61×10^{-26} Н·м² и 0.281 отн. ед., соответственно). Таким образом, амплитуда изменений значений Φ_E при переходе миозиновых головок от слабого (в присутствии АТФ) к сильному (в отсутствие нуклеотидов при высокой концентрации Ca^{2+}) связыванию с F-актином составляло 6.0° для R90P-Tpm и 7.7° для WT-TM. Предполагается, что мутация R90P в Tpm может снижать эффективность работы поперечного мостика [Fujita и др., 2004].

Известно, что замена положительно заряженного остатка Arg нейтральным гидрофобным остатком Pro, нарушающим спиральную структуру молекулы, дестабилизирует не только N-концевую часть молекулы Tpm, в которой она расположена, но и ее C-концевую часть [Gonchar и др., 2021]. Имеются данные о том, что при низкой концентрации ионов кальция тропонин связывает соседние субъединицы актина поперек филамента [Prochniewicz-Nakayama, Yanagida, Oosawa, 1983], а остатки 157–163 тропонина взаимодействуют с остатком 146 тропомиозина [Mudalige, Tao, Lehrer, 2009]. Поскольку остатки 90 и 146 находятся далеко друг от друга, вероятно, что замена R90P вызывает конформационные изменения в молекуле тропомиозина, способные вызывать нарушение всей структуры молекулы и ингибировать взаимодействие тропонина с тропомиозином. Следовательно, мутация R90P может изменять связывание тропомиозина с тропонином. На основе полученных данных можно сделать вывод, что мутантный тропомиозин возможно смещается в сторону открытого положения на актине при моделировании всех стадий АТФазного цикла при высокой и низкой концентрациях Ca^{2+} . Такое изменение связывания тропомиозина с тропонином может быть причиной нарушенной способности тропонина отключать тонкие филаменты. Это может привести к увеличению Ca^{2+} -чувствительности тропомиозина и вызвать появление головок миозина, прочно связанных с F-актином (рис. 14). Подобные состояния конформационного состояния миозиновых головок были обнаружены при моделировании релаксации в мышечных волокнах, содержащих другие мутантные изоформы Tpm: $\Delta E139$ [Borovikov и др., 2017b] и R91G в β -Tpm [Borovikov и др., 2017c], R168G в α -Tpm [Borovikov и др., 2017a], A155T [Karpicheva и др., 2017] и E173A [Borovikov и др., 2020] в γ -Tpm. Эти

мутации связаны с кэп-миопатией, врожденной диспропорцией типов мышечных волокон и дистальным артрогрипозом и сопровождаются контрактурами и дезорганизацией мышечных волокон [Borejdo и др., 2007; Lawlor и др., 2010; Marttila и др., 2014].

3.2. Исследование влияния ингибитора АТФазной активности BDM и кальциевого десенсибилизатора W7 на конформационные перестройки миозина

3.2.1. Влияние ингибитора миозина BDM и кальциевого десенсибилизатора W7 на АТФазную активность миозина и кальциевую чувствительность тонких филаментов

В результате замены Arg на остаток Pro в 90-м положении и связанных с ней конформационных изменений тропомиозина, мутантный тропомиозин располагается рядом с “открытым” положением в АТФазном цикле [Gonchar и др., 2021] и ослабляет связывание миозиновых головок с F-актином при низкой концентрации ионов кальция (рис. 13). Поскольку регуляция сокращения мышц осуществляется согласованными взаимозависимыми конформационными перестройками всех белков, участвующих в этом процессе, изменение состояния любого из них вызовет изменение состояния системы [Vorovikov и др., 2017a; Vorovikov и др., 2018; Vorovikov и др., 2020]. Известно, что миозиновые головки прочно связываются с F-актином и тропонином при высокой концентрации Ca^{2+} , сдвигая тропомиозин в сторону открытого положения [Craig, Lehman, 2001; Lehman и др., 2018; Li, Lehman, Fischer, 2010], поэтому можно предположить, что подавление способности миозиновых головок прочно связываться с F-актином и снижение кальциевой чувствительности тонких филаментов могут компенсировать повреждающее действие мутантного Trm в АТФазном цикле.

Оба фармакологических агента, используемые в работе (BDM и W7) – снижали чувствительность тонких филаментов к Ca^{2+} (рис. 15a, b). 20 мМ BDM снижал параметр pCa_{50} до 6.80 ± 0.03 для филаментов, содержащих мутантный тропомиозин (рис. 15a), что может быть связано со смещением Trm к блокирующему положению. Снижение чувствительности тонкого филамента к Ca^{2+} в присутствии BDM может быть вызвано как ингибированием движения тропомиозина в сторону открытого положения при низкой концентрации Ca^{2+} , так и восстановлением работы тропонина. Можно

предположить, что BDM способен восстановить Ca^{2+} -зависимую регуляцию АТФазного цикла.

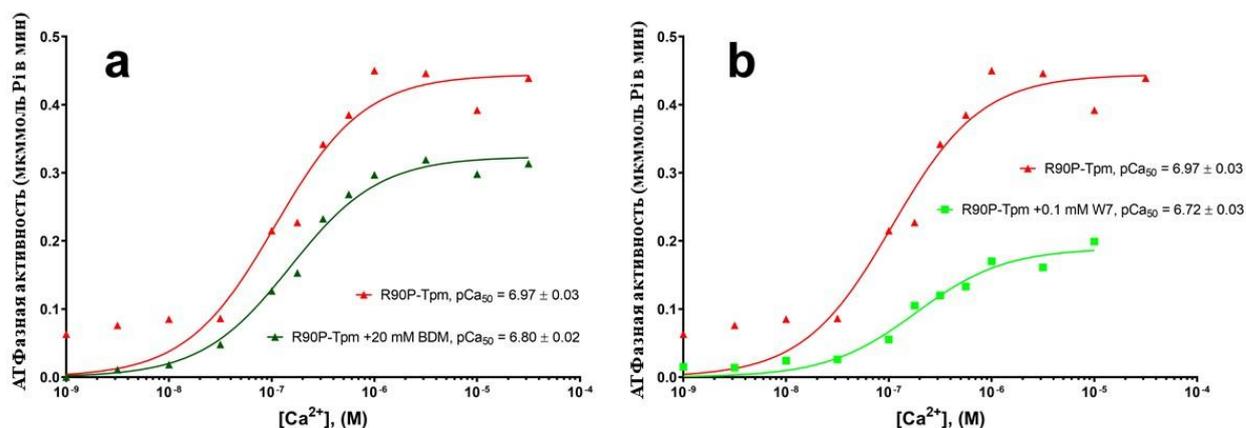


Рисунок 15. Влияние 20 мМ BDM (а) и 100 мкМ W7 (б) на кальциевую чувствительность тонких филаментов, содержащих R90P-мутантный и контрольный Трм. Кальциевая зависимость была определена для полностью регулируемых восстановленных тонких филаментов. Усредненные значения $p\text{Ca}_{50}$ были рассчитаны на основе данных трех экспериментов.

В присутствии 100 мкМ W7 значение параметра $p\text{Ca}_{50}$ снижалось до 6.72 ± 0.03 для филаментов, содержащих R90P-Трм (рис. 15b). По-видимому, тропомиозин в присутствии W7 способен смещаться в сторону блокирующего положения. Таким образом, W7 способен восстанавливать Ca^{2+} -зависимое движение мутантного тропомиозина во время цикла АТФазы в растворе белка.

3.2.2. Влияние BDM и W7 на пространственную организацию и подвижность головок миозина в АТФазном цикле

Как показано на рисунке 16, добавление 50 мМ BDM к комплексу актин-R90P-Трм-TN-S1 вызывает снижение значений Φ_E , ϵ и N для S1-AEDANS при высокой концентрации Ca^{2+} при моделировании стадий сильного связывания в отсутствие нуклеотидов и в присутствии АДФ.

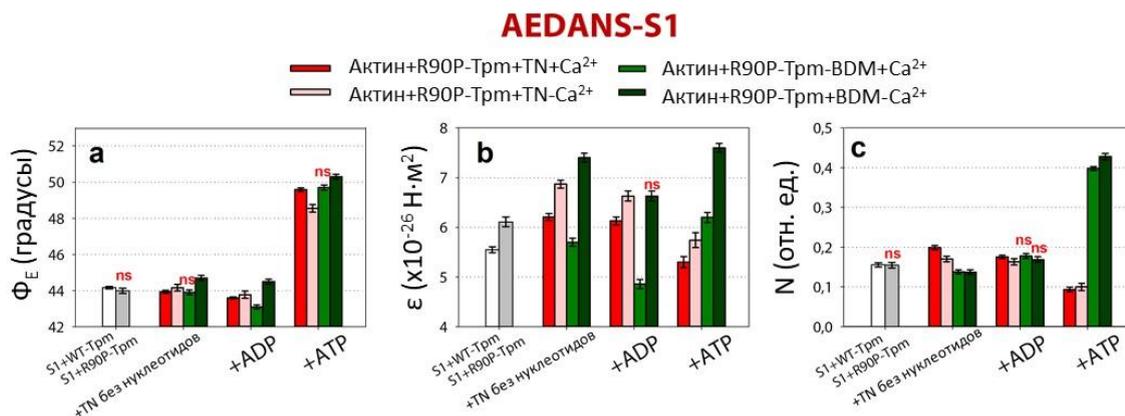


Рисунок 16. Влияние тропонина и Ca²⁺ на значения Φ_E (a), ϵ (b) и N (c) для AEDANS-S1, в присутствии R90P-Трп или R90P-Трп и 50 мМ BDM. Данные представляют собой усредненные значения для 5-7 волокон для каждого экспериментального условия. Связывание BDM значительно изменяет значения Φ_E , ϵ и N в отсутствие тропонина и в присутствии Ca²⁺ и нуклеотидов. Каждое значение является средним значением для 5-7 волокон в 5 точках для каждого волокна (всего 25-35 измерений). Символами “ns” обозначены недостоверные различия данных между волокнами, содержащими R90P-Трп или WT-Трп, в остальных случаях изменения достоверны, $p < 0.05$. Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения.

При низкой концентрации Ca²⁺ значения параметров Φ_E , ϵ и N резко возрастают, что свидетельствует о дезориентации миозиновых головок, ослаблении их связывания с актином и заметном увеличении персистентной длины актиновых филаментов в тонких филаментах, что характерно для сократительной системы при низкой концентрации Ca²⁺ (рис. 16). При моделировании стадии слабого связывания в присутствии BDM значение параметра N увеличивается на 59% и становится таким же, как в волокнах дикого типа. Данное изменение свидетельствует о снижении сродства миозиновых головок к актиновому филаменту и количества головок миозина, сильно связанных с F-актином. Известно, что BDM связывается с миозином и ингибирует высвобождение неорганического фосфата из активного центра, что, возможно, является одной из причин снижения эффективности поперечных мостиков. Однако, мутация R90P не изменяет эффективность работы поперечного мостика, поскольку изменения значений Φ_E аналогичны для мутантного тропомиозина и тропомиозина дикого типа при переходе от слабого к сильному связыванию миозиновых головок (рис. 16A).

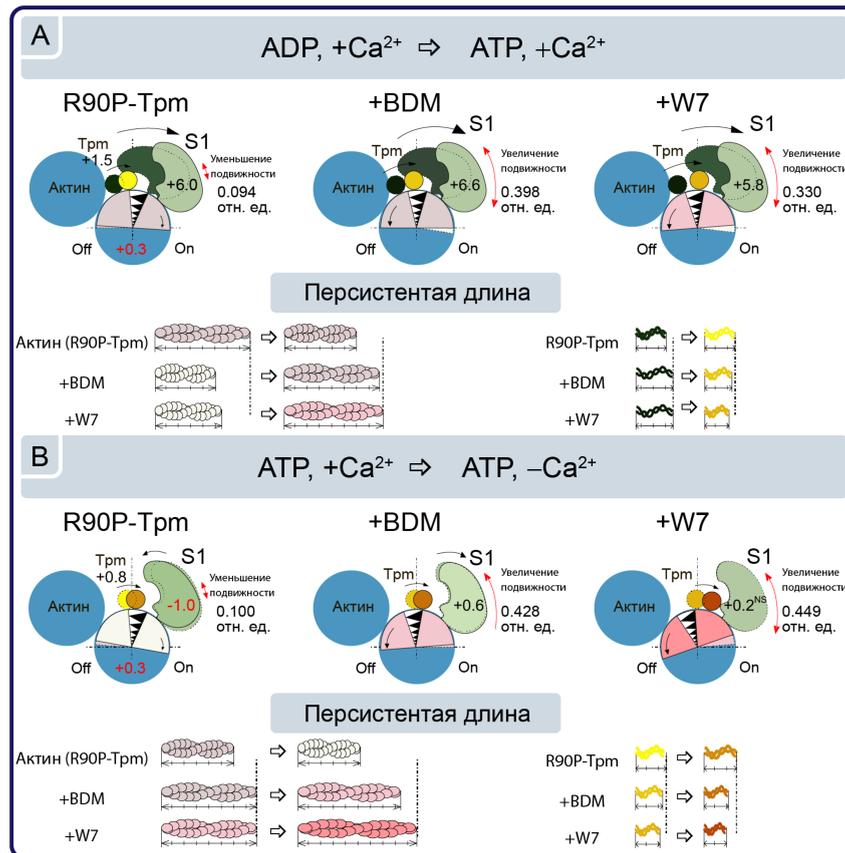


Рисунок 17. Влияние BDM и W7 на изменения в положении R90P-Tpm, конформационные перестройки комплекса актин-миозин и персистентные длины тропомиозина и актиновых филаментов. Информация получена в результате расчета значений Φ_E – углов ориентации диполей излучения флуоресцентных зондов, связанных с S1, Трм или актином, N – количество хаотически ориентированных флуорофоров и значения ϵ – жесткости на изгиб. Изменения значения угла Φ_E интерпретируются как сдвиг тяжей тропомиозина относительно внутреннего и внешнего доменов актина, вращение актиновых мономеров и азимутальный наклон моторного домена миозина. Верхняя и нижняя панели показывают переход комплекса актин-Трм-TN-S1 из состояния в присутствии АДФ при высоком уровне Ca^{2+} в состояние в присутствии АТФ при высокой концентрации Ca^{2+} (А) и далее в состояние при низком уровне Ca^{2+} (В). BDM стимулирует образование сильного связывания миозина с актином в присутствии АДФ и слабого связывания миозина с актином в присутствии АТФ. W7 не влияет на конформацию головки миозина при высокой концентрации Ca^{2+} , однако он способствует образованию слабого связывания головок миозина с актином в присутствии АТФ при низкой концентрации Ca^{2+} . Подвижность миозиновых головок значительно увеличивается в присутствии BDM и W7, что следует из изменений количества неупорядоченных зондов (параметр N). Изменения вращения актина и положения Трм получены из данных о конформационных изменениях миозина. BDM и W7 увеличивают продолжительность персистенции актина и уменьшают Трм. Обозначения такие же, как на рисунке 14. Изменения Φ_E для S1 при переходе между состояниями показаны числами.

По-видимому, BDM может вызывать заметное восстановление Ca^{2+} -зависимой регуляции тропонин-тропомиозиновым комплексом актин-миозинового взаимодействия, увеличивая способность тропонина выключать мономеры актина и позволяя мутантному тропомиозину перемещаться в сторону блокирующего положения. Таким образом, мышечные волокна восстанавливают свою способность расслабляться при низкой концентрации ионов кальция под действием АТФ. Последнее очень важно, поскольку появление поперечных мостиков, сильно связанных с F-актином при релаксации может вызывать контрактуру и способствовать развитию деструктивных изменений в мышечной ткани [Marttila и др., 2014].

Подобный эффект на Ca^{2+} -зависимую регуляцию сокращения в мышечных волокнах, содержащих R90P-Трм, может быть вызван 100 мкМ W7 (рис. 18).

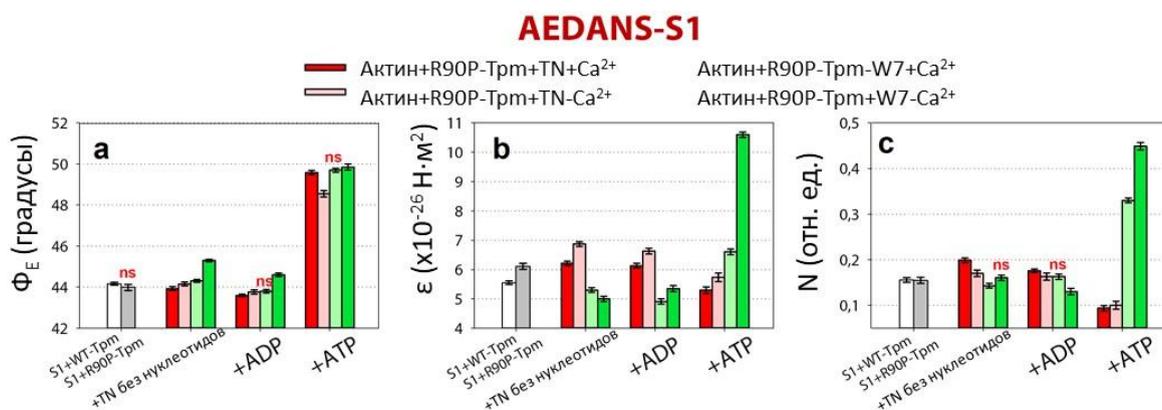


Рисунок 18. Влияние тропонина и Ca^{2+} на значения Φ_E (a), ϵ (b) и N (c) для AEDANS-S1 в присутствии R90P-Трм или R90P-Трм и 100 мкМ W7. Данные представляют собой усредненные значения для 5-7 волокон для каждого экспериментального условия. Связывание W7 значительно изменяет значения Φ_E , ϵ и N в отсутствие тропонина и в присутствии Ca^{2+} и нуклеотидов. Каждое значение является средним для 5-7 волокон в 5 точках для каждого волокна (всего 25-35 измерений). Символами “ns” обозначены недостоверные различия данных между волокнами, содержащими R90P-Трм или WT-Трм, в остальных случаях изменения достоверны, $p < 0.05$. Каждый столбец отображен со стандартной ошибкой среднего значения.

При высокой концентрации Ca^{2+} количество головок миозина, сильно связанных с F-актином, уменьшалось (значения Φ_E не изменялись), значения жесткости на изгиб (ϵ) и гибкости прикрепления миозиновой головки к F-актину (N) уменьшались, за исключением стадии в присутствии АТФ (рис. 18). Кроме того, в присутствии W7 амплитуда изменения значения Φ_E при переходе миозиновых головок от слабого к сильному связыванию с F-актином во время АТФазного цикла составляла 5.8° для

R90P-Trm-BDM, что было меньше, чем амплитуда, наблюдаемая для м-Trm (6.0° , рис. 17A). Таким образом, W7 снижает эффективность работы поперечного мостика. Однако при низкой концентрации Ca^{2+} W7 чрезвычайно снижает количество миозиновых головок, прочно связанных с F-актином (значения Φ_E увеличены, рис. 17A), и вызывает заметное увеличение персистентной длины актиновых филаментов и гибкости прикрепление миозиновой головки к актину при моделировании расслабления мышечных волокон (значения N увеличились на 78%, рис. 18с). Таким образом, W7 может по крайней мере частично восстанавливать баланс между сильно и слабо связанными головками миозина во время цикла АТФазы, который необходим для нормальной сократимости и расслабления мышечных волокон.

Выводы

1. Замена Arg90Pro в Trp3.12 вызывает нарушение стадии расслабления мышечного волокна за счет аномального смещения тропомиозина в открытую позицию и увеличения числа головок миозина, сильно связанных с F-актином на всех стадиях цикла гидролиза АТФ, что может приводить к увеличению Ca^{2+} -чувствительности тонких филаментов и к снижению эффективности работы поперечных миозиновых мостиков.
2. Связывание BDM с миозином способствует уменьшению аномального количества головок миозина, сильно связанных с актином в присутствии мутантного тропомиозина и частичному восстановлению кальциевой чувствительности тонких филаментов.
3. W7 уменьшает повышенную кальциевую чувствительность тонких филаментов, содержащих мутантный тропомиозин, и нормализует смещение тропомиозина из открытого в блокирующее положение, способствуя частичному восстановлению работы миозиновых поперечных мостиков при низкой концентрации ионов кальция.

Литература

1. Gateva G. и др. Tropomyosin Isoforms Specify Functionally Distinct Actin Filament Populations In Vitro // *Curr. Biol.* 2017. Т. 27. № 5. С. 705.
2. Lehman W. и др. Gestalt-Binding of tropomyosin on actin during thin filament activation // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. Т. 34. № 3–4. С. 155–163.
3. Ostap E. M. 2,3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2002. Т. 23. № 4. С. 305–308.
4. Rauscher A. А. и др. Targeting Myosin by Blebbistatin Derivatives: Optimization and Pharmacological Potential // *Trends Biochem. Sci.* 2018. Т. 43. № 9. С. 700–713.
5. Roman B. I., Verhasselt S., Stevens C. V. Medicinal Chemistry and Use of Myosin II Inhibitor (S)-Blebbistatin and Its Derivatives // *J. Med. Chem.* 2018. Т. 61. № 21. С. 9410–9428.
6. Sellin L. C., McArdle J. J. Multiple Effects of 2,3-Butanedione Monoxime // *Pharmacol. Toxicol.* 1994. Т. 74. № 4–5. С. 305–313.
7. Higuchi H., Takemori S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1989. Т. 105. № 4. С. 638–643.
8. Herrmann C. и др. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor // *Biochemistry*. 1992. Т. 31. № 48. С. 12227–12232.
9. Иванов И. И., Юрьев, В.А. Биохимия и патобиохимия мышц. Л.: Медгиз, Ленингр. отд-ние, 1961. 274 с.
10. Иоффе В. А. и др. Двухканальный поляризационный микрофлуориметр // *Цитология*. 1974. Т. 16. С. 112–116.
11. Abusamhadneh E. и др. Interaction of bepridil with the cardiac troponin C/troponin I complex // *FEBS Lett.* 2001. Т. 506. № 1. С. 51–54.
12. Adhikari Bb, Wang K. Interplay of troponin- and Myosin-based pathways of calcium activation in skeletal and cardiac muscle: the use of W7 as an inhibitor of thin filament activation // *Biophys. J.* 2004. Т. 86. № 1 Pt 1.
13. Allingham J. S., Smith R., Rayment I. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Т. 12. № 4. С. 378–379.
14. Amarasinghe C., Jin J.-P. N-Terminal Hypervariable Region of Muscle Type Isoforms of Troponin T Differentially Modulates the Affinity of Tropomyosin-Binding Site 1 // *Biochemistry*. 2015. Т. 54. № 24. С. 3822–3830.
15. Arteaga G. M., Kobayashi T., Solaro R. J. Molecular actions of drugs that sensitize cardiac myofilaments to Ca²⁺ // *Ann. Med.* 2002. Т. 34. № 4. С. 248–258.
16. Barton P. J. и др. Localization of the fast skeletal muscle troponin I gene (TNNI2) to 11p15.5: genes for troponin I and T are organized in pairs // *Ann. Hum. Genet.* 1997. Т. 61. № Pt 6. С. 519–523.
17. Barua B. и др. Regulation of actin-myosin interaction by conserved periodic sites of tropomyosin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Т. 109. № 45. С. 18425–18430.
18. Behrmann E. и др. Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex // *Cell*. 2012. Т. 150. № 2. С. 327–338.

19. Beier N. и др. The novel cardiotoxic agent EMD 53 998 is a potent «calcium sensitizer» // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991. Т. 18. № 1. С. 17–27.
20. Bivin D. B. и др. Cross-helix separation of tropomyosin molecules in acto-tropomyosin as determined by neutron scattering // *Biophys. J.* 1991. Т. 59. № 4. С. 880–888.
21. Borejdo J., Putnam S. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibers in rigor and relaxation // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. Т. 459. № 3. С. 578–595.
22. Borovikov Y. S. и др. Effect of Ca²⁺ binding to 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) light chains on conformational changes of F-actin caused by myosin subfragment-1 // *Eur. J. Biochem.* 1982. Т. 125. № 2. С. 343–347.
23. Boylan D., Phillips G. N. Motions of Tropomyosin // *Biophys. J.* 1986. Т. 49. № 1. С. 76–78.
24. Bremel R. D., Weber A. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle // *Nature. New Biol.* 1972. Т. 238. № 82. С. 97–101.
25. Cheung A. и др. A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II // *Nat. Cell Biol.* 2002. Т. 4. № 1. С. 83–88.
26. Claeys K. G. Congenital myopathies: an update // *Dev. Med. Child Neurol.* 2020. Т. 62. № 3. С. 297–302.
27. Clarke N. F. и др. Cap disease due to mutation of the beta-tropomyosin gene (TPM2) // *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2009. Т. 19. № 5. С. 348–351.
28. Clayton J. E. и др. Differential regulation of unconventional fission yeast myosins via the actin track // *Curr. Biol. CB.* 2010. Т. 20. № 16. С. 1423–1431.
29. Colombo I. и др. Congenital myopathies: Natural history of a large pediatric cohort // *Neurology.* 2015. Т. 84. № 1. С. 28–35.
30. Craig R., Lehman W. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments // *J. Mol. Biol.* 2001. Т. 311. № 5. С. 1027–1036.
31. Cramer L. P., Mitchison T. J. Myosin is involved in postmitotic cell spreading // *J. Cell Biol.* 1995. Т. 131. № 1. С. 179–189.
32. Dahan-Oliel N. и др. International multidisciplinary collaboration toward an annotated definition of arthrogryposis multiplex congenita // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2019. Т. 181. № 3. С. 288–299.
33. De Paula A. M. и др. A TPM3 mutation causing cap myopathy // *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2009. Т. 19. № 10. С. 685–688.
34. Dominguez R., Holmes K. C. Actin Structure and Function // *Annu. Rev. Biophys.* 2011. Т. 40. С. 169–186.
35. Donkervoort S. и др. TPM3 deletions cause a hypercontractile congenital muscle stiffness phenotype // *Ann. Neurol.* 2015. Т. 78. № 6. С. 982–994.
36. Ecken J. von der и др. Structure of the F-actin–tropomyosin complex // *Nature.* 2015. Т. 519. № 7541. С. 114–117.
37. Egelman E. H., Orlova A. New insights into actin filament dynamics // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. Т. 5. № 2. С. 172–180.
38. Fujii T. и др. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy // *Nature.* 2010. Т. 467. № 7316. С. 724–728.
39. Fujii T., Namba K. Structure of actomyosin rigour complex at 5.2 Å resolution and

- insights into the ATPase cycle mechanism // *Nat. Commun.* 2017. T. 8. № 1. C. 1–11.
40. Geeves M. A., Conibear P. B. The role of three-state docking of myosin S1 with actin in force generation. // *Biophys. J.* 1995. T. 68. № 4 Suppl. C. 194S–201S.
41. Goebel H. H., Borchert A. Protein surplus myopathies and other rare congenital myopathies // *Semin. Pediatr. Neurol.* 2002. T. 9. № 2. C. 160–170.
42. Greene L. E., Eisenberg E. Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980. T. 77. № 5. C. 2616–2620.
43. Gupta V. A. и др. Identification of KLHL41 Mutations Implicates BTB-Kelch-Mediated Ubiquitination as an Alternate Pathway to Myofibrillar Disruption in Nemaline Myopathy // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. T. 93. № 6. C. 1108–1117.
44. Hall A. R., Hausenloy D. J. Mitochondrial respiratory inhibition by 2,3-butanedione monoxime (BDM): implications for culturing isolated mouse ventricular cardiomyocytes // *Physiol. Rep.* 2016. T. 4. № 1.
45. Hanson J., Lowy J. THE STRUCTURE OF ACTIN FILAMENTS AND THE ORIGIN OF THE AXIAL PERIODICITY IN THE I-SUBSTANCE OF VERTEBRATE STRIATED MUSCLE // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1964. T. 160. C. 449–460.
46. Hidaka H и др. A novel vascular relaxing agent, N-(6--aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulfonamide which affects vascular smooth muscle actomyosin // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1978. T. 207. № 1.
47. Hidaka H. и др. Calcium-Regulated Modulator Protein Interacting Agents Inhibit Smooth Muscle Calcium-Stimulated Protein Kinase and ATPase // *Mol. Pharmacol.* 1980. T. 17. № 1. C. 66–72.
48. Hoffman R. M. B., Sykes B. D. Structure of the Inhibitor W7 Bound to the Regulatory Domain of Cardiac Troponin C // *Biochemistry.* 2009. T. 48. № 24. C. 5541–5552.
49. Holmes K. C. и др. Atomic model of the actin filament // *Nature.* 1990. T. 347. № 6288. C. 44–49.
50. Houdusse A. и др. Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 1997. T. 5. № 12. C. 1695–1711.
51. Hung R. M. и др. Cap myopathy caused by a mutation of the skeletal alpha-actin gene ACTA1 // *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2010. T. 20. № 4. C. 238–240.
52. Huxley H. E. Structural Changes in the Actin- and Myosin-containing Filaments during Contraction // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1973. T. 37. C. 361–376.
53. Jin J.-P., Chong S. M. Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T // *Arch. Biochem. Biophys.* 2010. T. 500. № 2. C. 144–150.
54. Jin J.-P., Zhang Z., Bautista J. A. Isoform diversity, regulation, and functional adaptation of troponin and calponin // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2008. T. 18. № 2. C. 93–124.
55. Kischel и др. The role of the Ca(2+) regulatory sites of skeletal troponin C in modulating muscle fibre reactivity to the Ca(2+) sensitizer bepridil // *Br. J. Pharmacol.* 2000. T. 131. № 7.
56. Kischel P, Stevens L, Mounier Y. Differential effects of bepridil on functional properties of troponin C in slow and fast skeletal muscles // *Br. J. Pharmacol.* 1999. T. 128. № 3.
57. Kwok S. C., Hodges R. S. Clustering of large hydrophobes in the hydrophobic core of two-stranded alpha-helical coiled-coils controls protein folding and stability // *J. Biol. Chem.*

2003. T. 278. № 37. C. 35248–35254.

58. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. T. 227. № 5259. C. 680–685.

59. Lawlor M. W. и др. Mutations of tropomyosin 3 (TPM3) are common and associated with type 1 myofiber hypotrophy in congenital fiber type disproportion // *Hum. Mutat.* 2010. T. 31. № 2. C. 176–183.

60. Lehman W. и др. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments // *J. Mol. Biol.* 2000. T. 302. № 3. C. 593–606.

61. Lehrer S. S., Morris E. P. Comparison of the effects of smooth and skeletal tropomyosin on skeletal actomyosin subfragment 1 ATPase // *J. Biol. Chem.* 1984. T. 259. № 4. C. 2070–2072.

62. Li M. X. и др. Structural Basis of Tirasemtiv Activation of Fast Skeletal Muscle // *J. Med. Chem.* 2021. T. 64. № 6. C. 3026–3034.

63. Li Y. и др. Bepridil opens the regulatory N-terminal lobe of cardiac troponin C // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. T. 97. № 10. C. 5140.

64. Li Y. и др. The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. T. 99. № 11. C. 7378–7383.

65. Limouze J. и др. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2004. T. 25. № 4–5. C. 337–341.

66. Lipscomb S. и др. Effects of troponin C isoform on the action of the cardiotonic agent EMD 57033 // *Biochem. J.* 2005. T. 388. № Pt 3. C. 905–912.

67. Lipscomb-Allhouse S., Mulligan I. P., Ashley C. C. The effects of the inotropic agent EMD 57033 on activation and relaxation kinetics in frog skinned skeletal muscle // *Pflugers Arch.* 2001. T. 442. № 2. C. 171–177.

68. Lorenz M. и др. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels // *J. Mol. Biol.* 1995. T. 246. № 1. C. 108–119.

69. MacLachlan Lk и др. Binding of a calcium sensitizer, bepridil, to cardiac troponin C. A fluorescence stopped-flow kinetic, circular dichroism, and proton nuclear magnetic resonance study // *J. Biol. Chem.* 1990. T. 265. № 17.

70. Marttila M. и др. Mutation update and genotype-phenotype correlations of novel and previously described mutations in TPM2 and TPM3 causing congenital myopathies // *Hum. Mutat.* 2014. T. 35. № 7. C. 779–790.

71. Minakata S. и др. Two-Crystal Structures of Tropomyosin C-Terminal Fragment 176–273: Exposure of the Hydrophobic Core to the Solvent Destabilizes the Tropomyosin Molecule // *Biophys. J.* 2008. T. 95. № 2. C. 710–719.

72. Mokbel N. и др. K7del is a common TPM2 gene mutation associated with nemaline myopathy and raised myofibre calcium sensitivity // *Brain J. Neurol.* 2013. T. 136. № Pt 2. C. 494–507.

73. Moraczewska J. и др. The DNase-I binding loop of actin may play a role in the regulation of actin-myosin interaction by tropomyosin/troponin // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. № 30. C. 31197–31204.

74. Mueller H., Perry S. V. The degradation of heavy meromyosin by trypsin // *Biochem. J.*

1962. Т. 85. № 3. С. 431–439.

75. Munot P. и др. Congenital fibre type disproportion associated with mutations in the tropomyosin 3 (TPM3) gene mimicking congenital myasthenia // *Neuromuscul. Disord. NMD*. 2010. Т. 20. № 12. С. 796–800.

76. North K. N. и др. Approach to the diagnosis of congenital myopathies // *Neuromuscul. Disord. NMD*. 2014. Т. 24. № 2. С. 97–116.

77. Ochala J. и др. Congenital myopathy-causing tropomyosin mutations induce thin filament dysfunction via distinct physiological mechanisms // *Hum. Mol. Genet.* 2012. Т. 21. № 20. С. 4473–4485.

78. Oda T. и др. The nature of the globular- to fibrous-actin transition // *Nature*. 2009. Т. 457. № 7228. С. 441–445.

79. Ogut O., Jin J. P. Expression, zinc-affinity purification, and characterization of a novel metal-binding cluster in troponin T: metal-stabilized alpha-helical structure and effects of the NH2-terminal variable region on the conformation of intact troponin T and its association with tropomyosin // *Biochemistry*. 1996. Т. 35. № 51. С. 16581–16590.

80. Oleszczuk M. и др. Solution Structure of the Regulatory Domain of Human Cardiac Troponin C in Complex with the Switch Region of Cardiac Troponin I and W7: The Basis of W7 as an Inhibitor of Cardiac Muscle Contraction // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010. Т. 48. № 5. С. 925–933.

81. Orlova A., Egelman E. H. A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament // *J. Mol. Biol.* 1993. Т. 232. № 2. С. 334–341.

82. Orlova A., Egelman E. H. Cooperative rigor binding of myosin to actin is a function of F-actin structure // *J. Mol. Biol.* 1997. Т. 265. № 5. С. 469–474.

83. Ottenheijm C. A. C. и др. Thin filament length dysregulation contributes to muscle weakness in nemaline myopathy patients with nebulin deficiency // *Hum. Mol. Genet.* 2009. Т. 18. № 13. С. 2359–2369.

84. Ottenheijm C. A. C. и др. Changes in cross-bridge cycling underlie muscle weakness in patients with tropomyosin 3-based myopathy // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Т. 20. № 10. С. 2015–2025.

85. Pittenger M. F., Kazzaz J. A., Helfman D. M. Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994. Т. 6. № 1. С. 96–104.

86. Poole K. J. V. и др. A comparison of muscle thin filament models obtained from electron microscopy reconstructions and low-angle X-ray fibre diagrams from non-overlap muscle // *J. Struct. Biol.* 2006. Т. 155. № 2. С. 273–284.

87. Ramamurthy B. и др. Kinetic Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Nonmuscle Myosin IIB // *Biochemistry*. 2004. Т. 43. № 46. С. 14832–14839.

88. Ravenscroft G. и др. Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy // *Am. J. Hum. Genet.* 2013. Т. 93. № 1. С. 6–18.

89. Robaszkiewicz K. и др. Functional effects of congenital myopathy-related mutations in gamma-tropomyosin gene // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. Т. 1822. № 10. С. 1562–1569.

90. Sambuughin N. и др. Dominant Mutations in KBTBD13, a Member of the BTB/Kelch Family, Cause Nemaline Myopathy with Cores // *Am. J. Hum. Genet.* 2010. Т. 87. № 6. С. 842–847.

91. Sanoudou D., Beggs A. H. Clinical and genetic heterogeneity in nemaline myopathy--a

- disease of skeletal muscle thin filaments // *Trends Mol. Med.* 2001. T. 7. № 8. C. 362–368.
92. Schevzov G. и др. Tissue-specific Tropomyosin Isoform Composition: // *J. Histochem. Cytochem.* 2016.
93. Schipke J. D., Korbmacher B. EMD 57033: A Novel Ca²⁺ Sensitizing Agent // *Cardiovasc. Drug Rev.* 1996. T. 14. № 4. C. 334–350.
94. Shaw M. A., Ostap E. M., Goldman Y. E. Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide // *Biochemistry.* 2003. T. 42. № 20. C. 6128–6135.
95. Sia S. K. и др. Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain // *J. Biol. Chem.* 1997. T. 272. № 29. C. 18216–18221.
96. Siegman M. J. и др. Comparison of the effects of 2,3-butanedione monoxime on force production, myosin light chain phosphorylation and chemical energy usage in intact and permeabilized smooth and skeletal muscles // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1994. T. 15. № 4. C. 457–472.
97. Singh A., Hitchcock-DeGregori S. E. Dual requirement for flexibility and specificity for binding of the coiled-coil tropomyosin to its target, actin // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2006. T. 14. № 1. C. 43–50.
98. Squire J. M. General model of myosin filament structure. 3. Molecular packing arrangements in myosin filaments // *J. Mol. Biol.* 1973. T. 77. № 2. C. 291–323.
99. Stapleton M. T., Fuchsbauer C. M., Allshire A. P. BDM drives protein dephosphorylation and inhibits adenine nucleotide exchange in cardiomyocytes // *Am. J. Physiol.* 1998. T. 275. № 4. C. H1260-1266.
100. Straight A. F. и др. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor // *Science.* 2003. T. 299. № 5613. C. 1743–1747.
101. Strynadka N. C. и др. Structural details of a calcium-induced molecular switch: X-ray crystallographic analysis of the calcium-saturated N-terminal domain of troponin C at 1.75 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1997. T. 273. № 1. C. 238–255.
102. Szent-Gyorgyi A. Free-energy relations and contraction of actomyosin // *Biol. Bull.* 1949. T. 96. № 2. C. 140–161.
103. Takebayashi T., Morita Y., Oosawa F. Electronmicroscopic investigation of the flexibility of F-actin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1977. T. 492. № 2. C. 357–363.
104. Takeda S. и др. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form // *Nature.* 2003. T. 424. № 6944. C. 35–41.
105. Tombe P. P. de, Solaro R. J. Integration of cardiac myofilament activity and regulation with pathways signaling hypertrophy and failure // *Ann. Biomed. Eng.* 2000. T. 28. № 8. C. 991–1001.
106. Tong S. W., Elzinga M. Amino acid sequence of rabbit skeletal muscle myosin. 50-kDa fragment of the heavy chain // *J. Biol. Chem.* 1990. T. 265. № 9. C. 4893–4901.
107. Varughese J. F. и др. A Computational and Experimental Approach to investigate Bepridil binding with Cardiac Troponin // *J. Phys. Chem. B.* 2011. T. 115. № 10.
108. Vibert P., Craig R., Lehman W. Steric-model for activation of muscle thin filaments // *J. Mol. Biol.* 1997. T. 266. № 1. C. 8–14.
109. Vinogradova M. V. и др. Ca(2+)-regulated structural changes in troponin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. T. 102. № 14. C. 5038–5043.

110. Walklate J., Ujfalusi Z., Geeves M. A. Myosin isoforms and the mechanochemical cross-bridge cycle // *J. Exp. Biol.* 2016. T. 219. № 2. С. 168–174.
111. Wallgren-Pettersson С. и др. 117th ENMC workshop: ventilatory support in congenital neuromuscular disorders -- congenital myopathies, congenital muscular dystrophies, congenital myotonic dystrophy and SMA (II) 4-6 April 2003, Naarden, The Netherlands // *Neuromuscul. Disord. NMD.* 2004. T. 14. № 1. С. 56–69.
112. Wallgren-Pettersson С. и др. Distal myopathy caused by homozygous missense mutations in the nebulin gene // *Brain J. Neurol.* 2007. T. 130. № Pt 6. С. 1465–1476.
113. Wang J., Jin J. P. Conformational modulation of troponin T by configuration of the NH2-terminal variable region and functional effects // *Biochemistry.* 1998. T. 37. № 41. С. 14519–14528.
114. Wang X. и др. Structure of the C-domain of human cardiac troponin C in complex with the Ca²⁺ sensitizing drug EMD 57033 // *J. Biol. Chem.* 2001. T. 276. № 27. С. 25456–25466.
115. Wegner A. Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction // *J. Mol. Biol.* 1979. T. 131. № 4. С. 839–853.
116. Wilson I. B., Ginsburg B. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase // *Biochim. Biophys. Acta.* 1955. T. 18. № 1. С. 168–170.
117. Winter J. M. de и др. Mutation-Specific Effects on Thin Filament Length in Thin Filament Myopathy // *Ann. Neurol.* 2016. T. 79. № 6. С. 959–969.
118. Yuen M. и др. Leiomodlin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy // *J. Clin. Invest.* 2014. T. 124. № 11. С. 4693–4708.
119. Yuen M. и др. Muscle weakness in TPM3-myopathy is due to reduced Ca²⁺-sensitivity and impaired acto-myosin cross-bridge cycling in slow fibres // *Hum. Mol. Genet.* 2015. T. 24. № 22. С. 6278–6292.
120. Zhang J., Yang P. L., Gray N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. T. 9. № 1. С. 28–39.
121. Zhao S. и др. Myosin-18B Promotes Mechanosensitive CaMKK2-AMPK-VASP Regulation of Contractile Actin Stress Fibers // *iScience.* 2020. T. 23. № 4.

Благодарности

Я приношу глубокую благодарность к. б. н. Ольге Евгеньевне Карпичевой и д. б. н., профессору Юрию Сергеевичу Боровикову за предоставленную возможность заниматься данной темой, внимательное отношение и помощь в работе.

Выражаю также благодарность за ценные замечания, помощь в освоении биохимических методов к. б. н. Владимиру Владимировичу Сиренко.

Я сердечно благодарна всем сотрудникам лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности, а также дорогой кафедре Цитологии и Гистологии Санкт-Петербургского Университета за создание творческой и доброжелательной атмосферы.