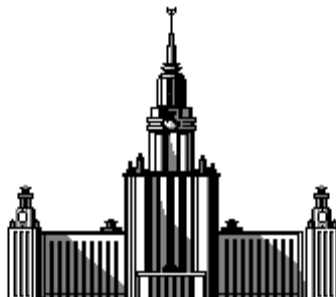


Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова  
Биологический факультет  
Кафедра биохимии

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН



---

*Дипломная работа  
студента 5 курса  
Невзорова Ильи Анатольевича*

**Структурные изменения в молекуле  $\beta$ -тропомиозина,  
вызываемые мутацией Arg91Gly**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной организации  
биологических структур Института биохимии им. А.Н. Баха РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Д.И. Левицкий

Москва 2008

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений.....	3
<b>Обзор литературы.....</b>	<b>4</b>
1. Структурные основы мышечного сокращения.....	4
2. Регуляция актинового типа.....	5
3. Тропомиозин как регуляторный белок тонкого филамента.....	6
<i>Распространение и изоформы.....</i>	<i>6</i>
<i>Структурные и функциональные свойства.....</i>	<i>9</i>
4. Миопатические мутации в тропомиозинах.....	14
5. Изучение тепловой денатурации тропомиозина методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).....	15
<i>Свободный тропомиозин.....</i>	<i>16</i>
<i>Комплексы тропомиозина с F-актином.....</i>	<i>16</i>
<i>Комплексы тропомиозина с F-актином и тропонином.....</i>	<i>19</i>
<i>Влияние кардиомиопатических мутаций на тепловую денатурацию тропомиозина.....</i>	<i>20</i>
<b>Материалы и методы.....</b>	<b>.....</b>
<i>Выделение актина из ацетонового порошка.....</i>	<i>.....</i>
<i>Стабилизация F-актина фаллоидином.....</i>	<i>.....</i>
<i>Получение восстановленных препаратов скелетного тропомиозина.....</i>	<i>.....</i>
<i>Приготовление пиренил-меченого тропомиозина.....</i>	<i>.....</i>
<i>Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS.....</i>	<i>.....</i>
<i>Определение концентрации белка.....</i>	<i>.....</i>
<i>Ограниченный трипсинолиз <math>\beta</math>-тропомиозина.....</i>	<i>.....</i>
<i>Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).....</i>	<i>.....</i>
<i>Исследование температурных зависимостей диссоциации комплексов тропомиозина с F-актином методом светорассеяния. ....</i>	<i>.....</i>
<i>Метод кругового дихроизма.....</i>	<i>.....</i>
<i>Соосаждение тропомиозина с F-актином.....</i>	<i>.....</i>
<i>Аналитическое ультрацентрифугирование.....</i>	<i>.....</i>
<b>Результаты и их обсуждение.....</b>	<b>.....</b>
<b>Немышечный <math>\beta</math>-тропомиозин (<math>\beta</math>-NmTm).....</b>	<b>.....</b>
<i>Свойства свободного <math>\beta</math>-тропомиозина дикого типа и несущего мутацию R91G.....</i>	<i>.....</i>
<i>Свойства немышечного <math>\beta</math>-тропомиозина дикого типа и с мутацией R91G в комплексе с F-актином.....</i>	<i>.....</i>
<i>Тепловая денатурация <math>\beta</math>-NmTm WT и <math>\beta</math>-NmTm R91G в присутствии F-актина .....</i>	<i>.....</i>
<i>Температурные зависимости диссоциации комплексов <math>\beta</math>-NmTm WT и <math>\beta</math>-NmTm R91G с F-актином.....</i>	<i>.....</i>
<b>Скелетный <math>\beta</math>-тропомиозин (<math>\beta</math>-SkTm).....</b>	<b>.....</b>
<i>Некоторые трудности, возникшие при работе с <math>\beta</math>-SkTm WT и <math>\beta</math>-SkTm R91G.....</i>	<i>.....</i>
<i>Исследование тепловой денатурации свободных <math>\beta</math>-SkTm WT и <math>\beta</math>-SkTm R91G.....</i>	<i>.....</i>
<i>Свойства скелетного <math>\beta</math>-тропомиозина дикого типа и с мутацией R91G в комплексе с F-актином.....</i>	<i>.....</i>
<i>Тепловая денатурация <math>\beta</math>-SkTm WT и <math>\beta</math>-SkTm R91G в присутствии F-актина .....</i>	<i>.....</i>
<i>Температурные зависимости диссоциации комплексов <math>\beta</math>-SkTm WT и <math>\beta</math>-SkTm R91G с F-актином.....</i>	<i>.....</i>
<b>Заключение.....</b>	<b>.....</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>.....</b>
<b>Список цитированной литературы.....</b>	<b>.....</b>

## Список используемых сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат

DTT – дитиотриетол

Нерес – 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин]этансульфоновая кислота

F-актин – фибриллярный актин

$\beta$ -ME –  $\beta$ -меркаптоэтанол

R91G – мутация в молекуле тропомиозина с заменой остатка Arg91 на остаток глицина

S1 – субфрагмент 1 миозина

SDS – додецилсульфат натрия

TPCK – тозил-L-фенилаланин-хлорметилкетон

Tm – тропомиозин

$\beta$ -Tm WT – рекомбинатный  $\beta$ -Tm дикого типа

$\beta$ -Tm R91G – рекомбинатный  $\beta$ -Tm с мутацией R91G

$\beta$ -NmTm – немышечный  $\beta$ -Tm

$\beta$ -SmTm – гладкомышечный  $\beta$ -Tm

$\beta$ -SkTm – скелетномышечный  $\beta$ -Tm

LMW Tm – низкомолекулярный Tm

HMW Tm – высокомолекулярный Tm

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

КД – круговой дихроизм

## **Обзор литературы**

Молекулярный механизм подвижности у эукариот основывается на активности актомиозиновой системы. В основе ее функционирования лежит циклическое взаимодействие молекул миозина с актиновым филаментом, сопровождающееся гидролизом АТФ [Левецкий, 2004a]. Большое отрицательное изменение свободной энергии (около  $-50$  кДж/моль), сопровождающее данную реакцию, позволяет актомиозиновой системе совершать полезную работу по перемещению ее компонентов – тонкого (актинового) и толстого (миозинового) филаментов – друг относительно друга. Кроме структур, преобразующих химическую энергию в механическую, сократительные системы должны обладать аппаратом регуляции данной функции. Ключевым и наиболее общим фактором, инициирующим сокращение всех типов мышц, является повышение концентрации ионов кальция в цитоплазме мышечных клеток [Гусев, 2000]. Роль посредников в передаче кальциевого сигнала к актомиозиновому комплексу принадлежит регуляторным белкам, которые локализуются либо на тонком (актиновом) филаменте, либо ассоциированы с миозином. Регуляция первого типа (“актиновый тип”) имеет место в сердечных и скелетных мышцах, а второго (“миозинового”) – в клетках гладкой мускулатуры и в немышечных клетках [Гусев, 2000].

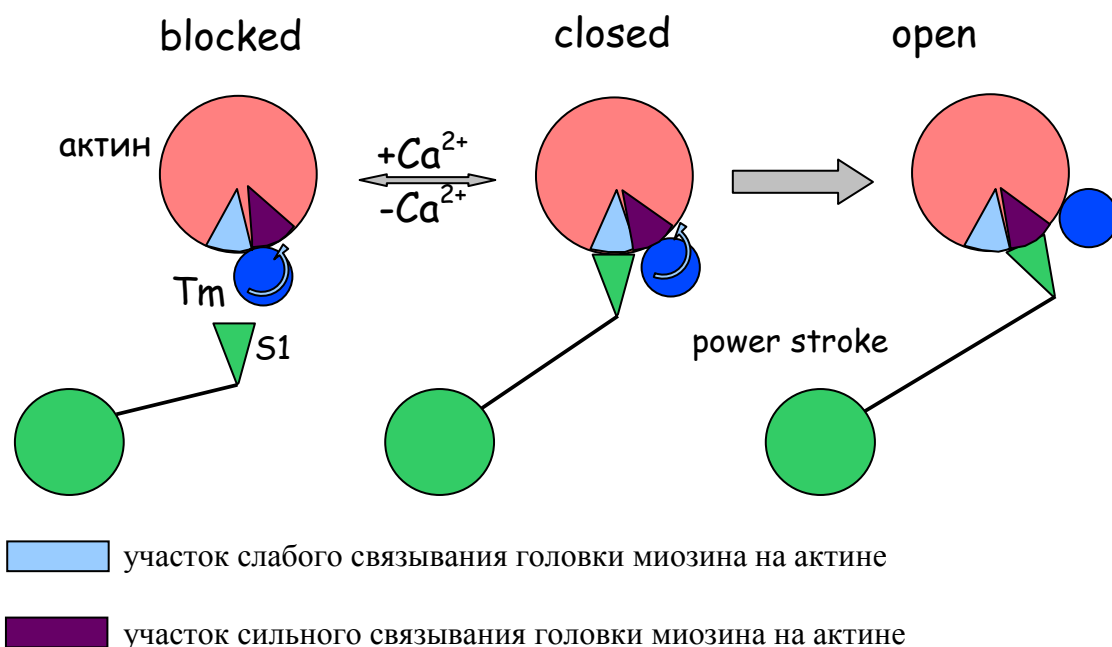
### **1. Структурные основы мышечного сокращения.**

Рассмотрим структурные компоненты мышечного волокна и механизм регуляции актинового типа. Основным компонентом тонкого филамента является F-актин, который можно представить в виде двух скрученных друг относительно друга цепей, каждое звено которых есть глобулярная молекула G-актина. Актиновый филамент обладает полярностью: тот его конец, к которому в ходе полимеризации присоединяются новые молекулы G-актина, именуется “плюс-концом”, а противоположный “минус-конец” представляет собой место диссоциации мономеров от фибриллы F-актина. Присоединение очередного мономера к цепи требует гидролиза молекулы АТФ и является кооперативным процессом, инициируемым добавлением ионов  $Mg^{2+}$  или повышением ионной силы [Dos Remedios et al., 2003]. В целом, актиновый филамент характеризуется высокой динамичностью структуры, на которую оказывают влияние как состав среды, в которой происходит полимеризация (наличие ионов двухвалентных металлов и нуклеотидов, ионная сила), так и взаимодействия со специфическими актин-связывающими белками. Процесс мышечного сокращения обусловлен взаимодействием головки миозина (так называемый субфрагмент 1 миозина, S1) с молекулами актина в составе тонкого

филамента [Holmes and Geeves, 2000; Левицкий и соавт., 1995]. Вкратце, в ходе этого взаимодействия происходит гидролиз АТФ, катализируемый S1, в результате чего конформация S1 изменяется и происходит генерация механического усилия. В итоге наблюдается движение миозинового филамента вдоль нити актина по направлению к её плюс-концу.

## 2. Регуляция актинового типа.

Таким образом, для генерации механического усилия головке миозина необходим контакт с актином. Эта особенность используется в “актиновом” типе регуляции, основанном на доступности сайтов связывания с S1 на поверхности актина. В состоянии расслабления, когда концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в мышце очень мала, тропомиозин стерически блокирует сайты связывания миозина на актиновом филаменте, предотвращая взаимодействие миозина с актином [Squire and Morris, 1998; Perry, 2001]. Насыщение тропомиозина ионами  $\text{Ca}^{2+}$  позволяет сдвинуть тропомиозин из этого положения, что делает возможным связывание поперечных мостиков (головок молекул миозина) с актином, приводящее к генерации силы. Эта теория получила название «механизма стерического блокирования». Таким образом, логично предположить, что молекула тропомиозина может занимать два разных положения на поверхности актинового филамента.



**Рис. 1.** Схема регуляции актинового типа, включающая три разных состояния тонкого филамента (“blocked”, “closed” и “open”) [McKillop & Geeves, 1993]. Представлен вид с торца актиновых и миозиновых филаментов. Синим цветом показаны три положения тропомиозина на поверхности актинового филамента. Разными цветами отмечены участки слабого и сильного связывания головки миозина (S1, зеленые треугольники) на поверхности актина. Подробнее см. в тексте.

Однако в последнее время эта концепция была пересмотрена и теперь предполагается наличие не двух, а трех возможных состояний тропомиозина на поверхности актинового филамента [McKillop and Geeves, 1993]. Эти состояния принято обозначать как «blocked», «closed» и «open» (рис. 1). В состоянии “blocked” связывание S1 с актином невозможно. Такое состояние наблюдается в отсутствие ионов  $Ca^{2+}$ , когда тропониновый комплекс прочно связан с актином и с помощью тропонина Т выталкивает тропомиозин из канавки актинового филамента на его поверхность. В состоянии “closed” (в присутствии иона  $Ca^{2+}$ ) разрешено только «слабое» связывание миозиновой головки с актином (это соответствует состояниям, когда в активном центре миозина находится АТФ или  $ADP \cdot P_i$ ), а в состоянии “open” возможна изомеризация актомиозинового комплекса с переходом «слабого» связывания в «сильное» (когда головка миозина содержит АДФ или не содержит нуклеотида вообще). Таким образом, тропомиозин играет ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц.

### **3. Тропомиозин как регуляторный белок тонкого филамента.**

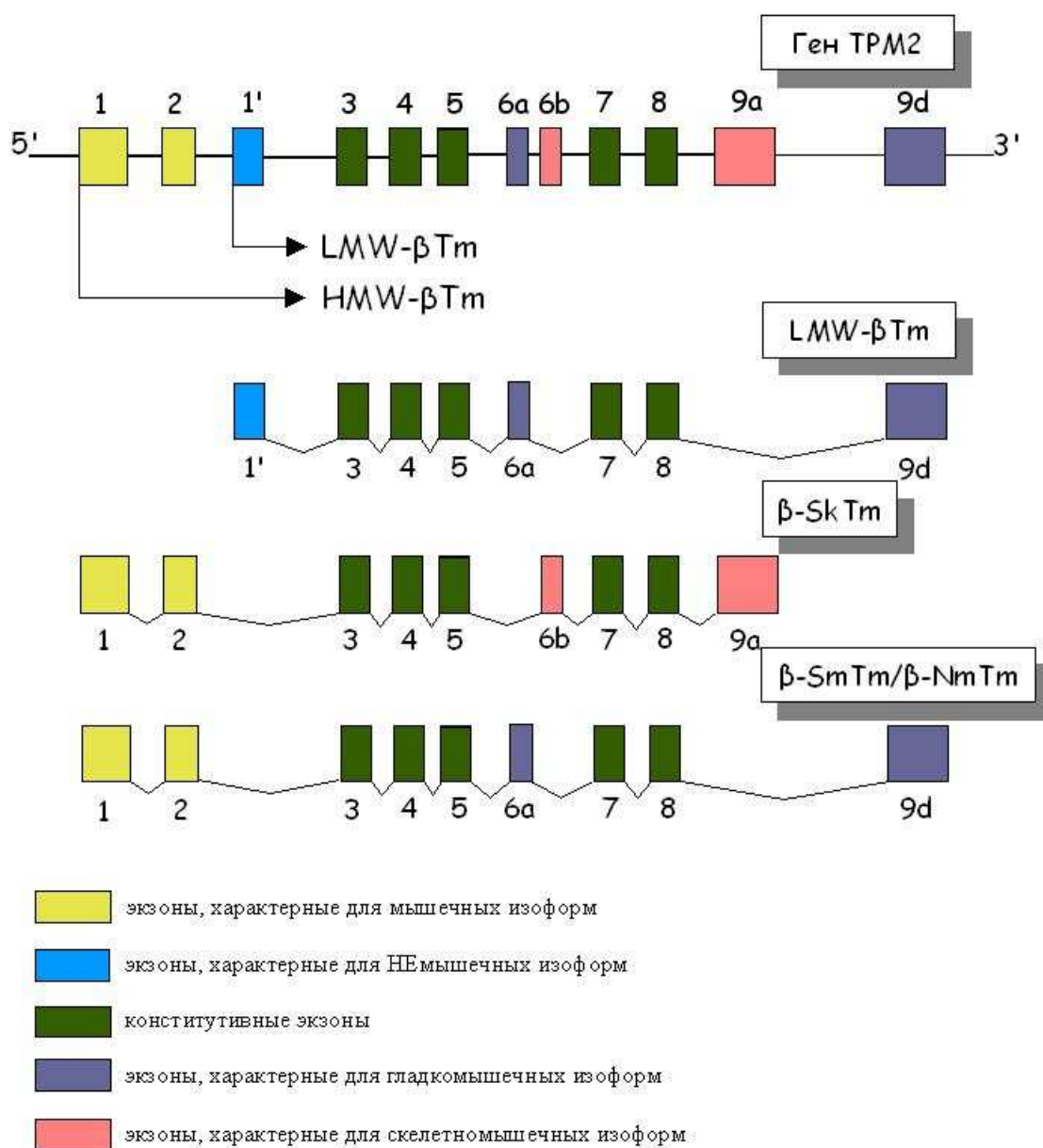
#### *Распространение и изоформы.*

Тропомиозины – это семейство актин-связывающих белков, обладающих почти 100%-ой  $\alpha$ -спиральной структурой. Присутствие тропомиозинов отмечено как в мышечной ткани, так и в клетках немышечного типа (дрожжи, тромбоциты, клетки мозга, фибробласты) [Perry, 2001]. В геноме млекопитающих и птиц охарактеризовано 4 гена, кодирующих около 20 изоформ тропомиозина: ТРМ1 ( $\alpha$ ), ТРМ2 ( $\beta$ ), ТРМ3 ( $\gamma$ ) и ТРМ4 ( $\delta$ ). Исторически, тропомиозины разделяют на две группы по количеству аминокислотных остатков: 1) тропомиозины с высокой молекулярной массой (НМВ), содержащие от 281 до 284 аминокислотных остатков; 2) тропомиозины с низкой молекулярной массой (ЛМВ), состоящие из 247 аминокислот в первичной структуре. Все мышечные тропомиозины относятся к группе НМВ, в то время как большинство немышечных – к группе ЛМВ. Такое различие в размерах является следствием использования альтернативных промоторов при транскрипции генов ТРМ – внешнего (в случае НМВ) и внутреннего (в случае ЛМВ) [Gunning et al., 2005]. В дополнение к этому, еще одним источником разнообразия изоформ тропомиозинов является альтернативный сплайсинг мРНК.

Первые два гена (TRM1 и TRM2) наряду с обширным набором немышечных изоформ кодируют соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформы мышечного тропомиозина [Perry, 2001]. Необходимо отметить, что в скелетных мышцах соотношение данных изоформ составляет (3-4):1 в пользу  $\alpha$ -изоформы. Таким образом, возможно существование трех типов димерных молекул тропомиозина:  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  и  $\beta\beta$ . При этом *in vivo* тропомиозин скелетной мышцы на 90% представлен первыми двумя типами ( $\alpha\alpha$  и  $\alpha\beta$ ). Недавно было показано, что некоторые мутации в  $\beta$ -тропомиозине, приводящие к нарушениям в функционировании опорно-двигательного аппарата, влияют на количественные состав изоформ тропомиозина в скелетной мышце [Nilsson & Tajsharghi, 2008]. При этом наблюдается повышение уровня экспрессии  $\beta$ -тропомиозина и преимущественное образование  $\beta\beta$ -гомомеров вместо  $\alpha\beta$ -гетеродимеров, что, по мнению авторов, влечет за собой патологические последствия. Два типа тропомиозиновых цепей,  $\alpha$  и  $\beta$ , различаются всего по 39 аминокислотам (~14%), причем  $\alpha$ -цепь содержит всего один остаток цистеина (Cys-190), тогда как  $\beta$ -цепь – два (Cys-36 и Cys-190). Наряду с данными компонентами, в скелетных мышцах встречаются также некоторые минорные изоформы, известные как  $\gamma$ - и  $\delta$ -тропомиозины, которые практически отсутствуют в быстрых скелетных мышцах, но составляют 31% от общего количества тропомиозинов медленных скелетных мышц. В сердечной мышце в норме экспрессируется только  $\alpha$ -изоформа тропомиозина [Perry, 2001].

Рассмотрим подробнее структуру гена и изоформы  $\beta$ -тропомиозина. На рис. 2 представлена схема экзонной структуры гена TRM2 ( $\beta$ ): показаны (стрелками) сайты инициации транскрипции в случае LMW и NMW тропомиозинов и комбинации различных экзонов в белковых продуктах гена (изоформах) [Libri et al., 1990; база данных Swiss-Prot]. Экзоны **3, 4, 5, 7 и 8** высоко консервативны во всех тропомиозинах и не имеют альтернативных вариантов. Экзоны **1 и 2** характерны только для мышечных изоформ, причем экзон **1** содержит внешний промотор для синтеза высокомолекулярного  $\beta$ -тропомиозина (NMW). Его альтернативный вариант, экзон **1'**, напротив, характерен исключительно для немышечных изоформ [Libri et al., 1990]. Он содержит в своем составе внутренний промотор для синтеза низкомолекулярных  $\beta$ -тропомиозинов (LMW). Кроме того, имеются еще две пары альтернативных экзонов: **6a/6b** и **9a/9d**. Комбинация **6a/9d** характерна для всех гладкомышечных и немышечных изоформ, тогда как в  $\beta$ -тропомиозине из скелетных мышц присутствует сочетание **6b/9a** [Gunning et al., 2005; Perry, 2001]. Таким образом, использование альтернативных промоторов и альтернативный сплайсинг приводит к образованию трех изоформ  $\beta$ -тропомиозина: низкомолекулярный немышечный  $\beta$ -Tm (LMW  $\beta$ -Tm), скелетномышечный  $\beta$ -Tm ( $\beta$ -SkTm)

и HMW-изоформа тропомиозина из гладких мышц, которая также встречается и в немышечных тканях ( $\beta$ -SmTm/ $\beta$ -NmTm) [Pittinger *et al.*, 1995]. Необходимо отметить, что здесь мы приводим лишь те изоформы  $\beta$ -Tm, которые занесены в аннотируемую базу данных Swiss-Prot, т.е. они известны как белковые продукты. В литературе имеются данные о существовании в раннем миогенезе таких изоформ  $\beta$ -Tm, в которых «немышечные» экзоны комбинируются с «мышечными», например **6b/9d** и **6a/9a** [Wang *et al.*, 1992]. Заметим, однако, что белковые продукты, соответствующие данным мРНК, пока не выделены и не охарактеризованы.



**Рис. 2.** Схематическое изображение экзонной структуры гена  $\beta$ -тропомиозина (TPM2) [Libri *et al.*, 1990; база данных Swiss-Prot]. Показаны комбинации альтернативных форм экзонов **1**, **6** и **9** в различных изоформах  $\beta$ -Tm. Подробнее см. в тексте.

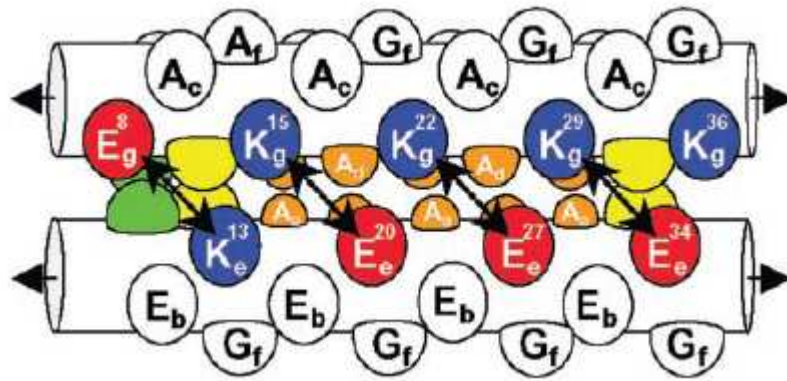


Структурные и функциональные свойства.

Тропомиозин был открыт Бэйли в 1946 г. [Bailey, 1948] при обработке миофибрилл органическими растворителями, вызывающими избирательную денатурацию миозина. Тогда же была отмечена ассиметричная природа данного белка, несмотря на которую тропомиозин легко кристаллизовался с образованием хрупких пластинок, содержащих ~90% воды. Тогда же было отмечено такое важное свойство растворов тропомиозина как высокая вязкость при низкой ионной силе. С помощью электронной микроскопии было показано, что в данных условиях тропомиозин образует длинные фибриллы приблизительно одинакового диаметра, которые деполимеризуются при повышении ионной силы раствора [Astbury et al., 1948]. На основе этих и ряда других данных Бэйли выдвинул предположение о димерной структуре молекулы выделенного им белка, которое впоследствии подтвердилось. Несмотря на это, о функциях тропомиозина не было известно ничего, кроме предположений о его структурной роли, основанных на фибриллярности белка. Из-за сходства аминокислотного состава и физических свойств, Бэйли заключил, что выделенный им белок, скорее всего, является предшественником миозина, поэтому он был назван «тропомиозином». Хотя в дальнейших исследованиях эта гипотеза была опровергнута, в понимании структуры и функции тропомиозина явно был достигнут определенный прогресс.

Как отмечалось ранее, нативная молекула тропомиозина состоит из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет молекулярную массу 33 кДа (284 аминокислотных остатка) и представляет собой  $\alpha$ -спираль. В результате взаимодействия двух субъединиц тропомиозина образуется структура типа coiled-coil – левозакрученная “перевитая спираль”, которая характерна не только для тропомиозина, но и для фибриллярного хвоста миозина, парамиозина и некоторых других белков [Brown et al., 2005]. Образование подобной структуры накладывает определенные ограничения на первичную структуру белка – именно поэтому аминокислотная последовательность тропомиозина и подобных белков организована в виде повторяющихся мотивов (гептад) из семи аминокислот (отсюда выявленное Бэйли сходство в аминокислотном составе миозина и тропомиозина). В гептадах каждой аминокислоте присвоена латинская буква (abcdefg). Аминокислоты, находящиеся в положении *a* и *d*, имеют по большей части неполярный радикал, а в положении *e* и *g* – заряженный. Гидрофобные взаимодействия между аминокислотами *a* и *d* образуют остов (гидрофобны кор) молекулы (рис. 3). Еще в 1953 г. Ф. Криком была предложена модель пространственной упаковки аминокислотных радикалов в гидрофобном коре coiled-coil, названная им «knobs in holes» («бугры и

впадины»), согласно которой каждый аминокислотный остаток ( $a$  или  $d$ ) оказывается в своеобразной впадине, образованной тремя другими радикалами [Brenden & Tooze, 1999]. Данную структуру дополнительно стабилизируют электростатические взаимодействия заряженных аминокислот в положениях  $e$  и  $g$ :  $i$ -ый остаток ( $g$ ) взаимодействует с  $i'+5$  (апострофом показано, что остаток принадлежит другой цепи). Кроме того, по данным группы Ходжеса [Kohn et al., 1997], имеют место электростатические взаимодействия внутри цепи ( $i/(i+3)$  и  $i/(i+4)$ ). Таким образом, две правозакрученные  $\alpha$ -спирали тропомиозина димеризуются, образуя левозакрученную спираль [Brown et al., 2005]. Полипептидная цепь скелетного тропомиозина состоит из 284 аминокислот, что эквивалентно 40 гептадам.



**Рис. 3.** Схема взаимодействий, стабилизирующих двойную coiled-coil-спираль молекулы тропомиозина [Kwok & Hodges, 2004]. Буквы a-g соответствуют положению аминокислотного остатка в составе гептадного повтора. Подробнее см. в тексте.

Важно отметить тот факт, что структура гидрофобного кора молекулы тропомиозина представляется очень неоднородной. Ходжесом и соавт. [Kwok & Hodges, 2004] разработана теория «стабилизирующих и дестабилизирующих кластеров», раскрывающая вклад различных аминокислотных радикалов в стабильность структуры coiled-coil. Теория постулирует, что аминокислотные остатки, занимающие положения  $a$  и  $d$  в гептадной структуре, по природе радикала группируются в стабилизирующие (Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Met) и дестабилизирующие кластеры (остальные 14 аминокислот). Заметим, что аланин обладает дестабилизирующим действием, благодаря малому размеру гидрофобного радикала, что доказано в экспериментах Ходжеса на модельных пептидах [Kwok & Hodges, 2004]. Интересно отметить, что в структуре гидрофобного кора по крайней мере  $\alpha$ -тропомиозина аланин является наиболее распространенным дестабилизирующим остатком (~74%). Это вполне объяснимо, принимая во внимание тот

факт, что аланин обладает наибольшей способностью к образованию одиночных  $\alpha$ -спиралей. В 2001 г. в группе Коэна [*Brown et al.* 2001] была расшифрована атомная структура N-концевого сегмента  $\alpha$ -тропомиозина (1-81), который содержит в своем составе большой дестабилизирующий кластер (Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>18</sup>-Ala<sup>22</sup>-Ala<sup>25</sup>-Lys<sup>29</sup>-Ala<sup>32</sup>-Ser<sup>36</sup>). Было показано, что присутствие аланина в гидрофобном коре изменяет свойства двойной спирали. Во-первых, наблюдается сдвиг одной цепи относительно другой на  $\sim 1,2$  Å; во-вторых, происходит уменьшение диаметра двойной спирали в этом участке на 2 Å и, в-третьих, наблюдается изгиб оси двойной спирали между стабилизирующими и дестабилизирующими кластерами. По мнению авторов, такая особенность структуры тропомиозина важна для регуляции сокращения. Из особенностей структуры тропомиозина необходимо отметить его центральный участок (остатки 120–150), где в положении 137 (*d*-позиция) находится остаток аспартата, который существенно дестабилизирует coiled-coil в этом месте и, видимо, нарушает  $\alpha$ -спиральную структуру. Этот вывод следует из того, что присутствующий рядом участок расщепления трипсином (Arg133) – единственно доступный для протеолиза во всей молекуле [*Sumida et al.*, 2007]. Кроме того, остаток Asp137 высококонсервативен во всех тропомиозинах. Исходя из этого, С. Лерер сделал предположение о важности дестабилизации центрального участка молекулы тропомиозина для его функционирования [*Sumida et al.*, 2007].

Образование фибриллы тропомиозина объясняется полимеризацией его молекул по типу “голова к хвосту” с образованием перекрытия в 8-9 аминокислотных остатков между С- и N-концами соседних молекул [*Perry*, 2001]. Данная модель предполагает возможность образования электростатических и гидрофобных взаимодействий между боковыми поверхностями цепей N- и С-концевых участков соседних молекул и удовлетворительно объясняет деполимеризующее действие высокой ионной силы (отмеченное еще в 1948 в работе [*Astbury et al.*, 1948]). Кроме того, в пользу гипотезы о перекрытии говорят данные рентгеновской кристаллографии, а именно наблюдаемое несоответствие длины молекулы тропомиозина в составе фибриллы ( $406 \pm 1.4$  Å [*Phillips et al.*, 1986]) и длины индивидуальной молекулы (423 Å). Отметим, что для концевых взаимодействий в тропомиозине необходимо, чтобы N-концевой остаток метионина был ацетилирован [*Perry*, 2001]. При получении рекомбинантных тропомиозинов в системе *E.coli* обычно на N-конец молекулы дополнительно «навешивают» дипептид Ala-Ser, который, как показано, имитирует ацетилирование [*Monteiro et al.*, 1994]. Образование концевых взаимодействий критически важно для связывания тропомиозина с F-актином [*Kremneva et al.*, 2004].

Как отмечалось ранее, важнейшей характеристикой тропомиозина является его способность связываться с актиновыми филаментами. В случае мышечных тропомиозинов такое связывание происходит в соотношении одна молекула тропомиозина на 7 мономеров актина плюс один тропониновый комплекс (комплекс тропонинов Т, I и С в соотношении 1:1:1) [Squire and Morris, 1998; Perry, 2001]. Очевидно, что способность связываться с актином подобным образом требует от молекулы тропомиозина определенных особенностей структуры. Детальный анализ аминокислотной последовательности, а также данные рентгеноструктурного анализа позволили выявить эти особенности. В 1974 г. Стоуном и соавторами была отмечена неравномерность распределения аминокислот с кислыми радикалами в первичной структуре тропомиозина – по мнению авторов, они образуют приблизительно семь кластеров, неэквивалентных по последовательности и разделенных районами с низким содержанием данных аминокислот. Была предложена гипотеза, рассматривающая данные кластеры в качестве возможных актин-связывающих участков. Позднее каждый из данных семи участков был разделен на две зоны ( $\alpha$ - и  $\beta$ -зоны) и было высказано предположение, что в связывании с актином первостепенную роль играют  $\alpha$ -зоны [Stewart and McLachlan, 1975]. В пользу идеи электростатической природы взаимодействий можно привести данные о зависимости взаимодействия между актином и тропомиозином от ионной силы, а также данные по дифракции рентгеновских лучей: ближайшее расстояние между атомами молекул актина и тропомиозина оценивается как 10,5 Å, что возможно только в случае электростатических взаимодействий [Perry, 2001]. В 2005 г. была получена кристаллическая структура среднего участка молекулы тропомиозина (три из семи витков coiled-coil спирали) с разрешением 2,3 Å [Brown et al., 2005]. Это позволило внести существенные коррективы в существующую модель взаимодействия актина с тропомиозином. Авторами обратили внимание на участок протяженностью 12 аминокислот в N-концевой части пятого витка coiled-coil спирали. Основу участка составляют 4 неполярные аминокислоты (169–172), фланкированные участками с заряженными аминокислотами. Было установлено, что данный участок представляет собой самый нестабильный фрагмент молекулы, и поэтому было высказано предположение, что он непосредственно взаимодействует с актином. Авторами была предложена модель такого взаимодействия, согласно которой неполярные радикалы аминокислотных остатков 169–172 образуют гидрофобные взаимодействия с радикалами на поверхности актинового мономера. В пользу предложенной модели говорит также тот факт, что она предусматривает образование энергетически выгодных солевых мостиков между положительно заряженными остатками на поверхности актина и кислыми остатками, фланкирующими участок 169–172. Большое количество точечных

мутаций (I172T, D175N, E180G, E180V, L185R) с выраженным кардиомиопатическим эффектом также указывает на то, что сегмент 167-184 в N-концевой части 5-го витка тропомиозина действительно важен для взаимодействия с актином. Отметим, что предложенная модель взаимодействия тропомиозина с актином может быть распространена на все остальные  $\alpha$ -зоны молекулы тропомиозина, т.к. в их аминокислотной последовательности наблюдается гомология – непременно гидрофобная аминокислота в центре, фланкированная участками, содержащими отрицательно заряженные радикалы [Brown et al., 2005].

Завершая анализ структурных и функциональных свойств тропомиозина, рассмотрим вариации в свойствах  $\beta$ -тропомиозина. Напомним, что все разнообразие изоформ происходит благодаря альтернативному сплайсингу и использованию альтернативных (внешнего или внутреннего) промоторов. Короткие (LMW) формы тропомиозинов встречаются в немышечных клетках (например, фибробластах) и связывают шесть мономеров актина. Их основная функция – стабилизация актиновых филаментов и их защита от дестабилизирующего и деполимеризующего действия ADF/кофилина и от фрагментирующего действия белков семейства гельзолина, регуляция связывания с актином некоторых немышечных миозинов [Gunning et al., 2005; Cooper, 2002] и препятствование ветвлению актиновых филаментов посредством запрета связывания с ними комплекса Arp2/3 [Blanchoin et al., 2001]. Полноразмерные (HMW)  $\beta$ -тропомиозины взаимодействуют с семью мономерами актина. Функции их также различны: скелетная изоформа ( $\beta$ -SkTm) является участником тропонин-тропомиозиновой регуляции мышечного сокращения, тогда как изоформа из гладких мышц и немышечных тканей ( $\beta$ -SmTm/ $\beta$ -NmTm) регулирует сокращение гладких мышц (взаимодействуя с кальдесмоном) и динамику актинового цитоскелета немышечных клеток. Многочисленные исследования в лабораториях М. Дживса и С. Хитчкок-ДеГрегори позволили выявить структурные и функциональные различия участков, кодируемых альтернативными экзонами в молекуле тропомиозина. Было показано, что в случае  $\alpha$ -тропомиозина мышечный экзон **6b**, в отличие от немышечного экзона **6a**, ответственен за связывание тропонина Т и, кроме того, обладает меньшей стабильностью по результатам компьютерного анализа [Maytum et al., 2004] и по данным дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [Kremneva et al., 2006]. Возвращаясь к  $\beta$ -тропомиозину, отметим, что скелетномышечный экзон **9a** уменьшает аффинность тропомиозина к F-актину, по сравнению с немышечным (гладкомышечным) экзоном **9d** [Pittenger et al., 1995]. Кроме того, замена, экзона **9a** на **9d** приводит к ослаблению концевых взаимодействий в  $\beta$ -тропомиозине [Coulton et al., 2008]. Таким образом,

вариации в свойствах изоформ тропомиозинов сводятся к вариациям в свойствах экзонов 1, 6 и 9.

#### **4. Миопатические мутации в тропомиозинах.**

В основе патогенеза большинства миопатий, т.е. нарушений в структуре и функции мышц, лежат наследственные факторы. В число подобных заболеваний входят немалиновые миопатии [Donner et al., 2002], дистальные артрогрипозы [Robinson et al., 2007] и наследственные кардиомиопатии в двух своих вариантах – гипертрофическая (ФНС, Familial Hypertrophy Cardiomyopathy) и дилатационная (DCM, Dilated Cardiomyopathy) [Seidman and Seidman, 2001; Fatkin and Graham, 2002]. Немалиновые миопатии проявляются в виде генерализованной мышечной слабости и присутствия так называемых немалиновых телец в скелетных мышцах [Donner et al., 2002]. Основные симптомы в случае дистальных артрогрипозов – это повышенная сократимость (контрактура) мышц конечностей в отсутствие каких-либо явных морфологических изменений и неврологических расстройств [Robinson et al., 2007]. В случае кардиомиопатий, напротив, наблюдаются обширные морфологические изменения ткани миокарда. ФНС проявляется в виде увеличения массы сердечной мышцы, в основном за счет утолщения (гипертрофии) стенки левого желудочка. Как следствие, при этом объем полости левого желудочка уменьшается. Несмотря на такую патологическую морфологию, сократительная функция при ФНС нарушается редко, а иногда даже превышает по показателям норму; тем не менее, наличие данной кардиомиопатии в большинстве случаев приводит к сердечной недостаточности или внезапной остановке сердца. Главные характеристики DCM – это увеличение объема полостей желудочков, утоньшение их стенок, аритмия, сердечная недостаточность и в ряде случаев – летальный исход.

Учитывая описанную выше разнородность симптомов наследственных миопатий, удивительным представляется тот факт, что зачастую к таким последствиям ведут мутации в одних и тех же мышечных белках – в основном это  $\alpha$ -тропомиозин (ФНС [Golitsina et al., 1997; Kremneva et al., 2004] и DCM [Mirza et al., 2007]),  $\beta$ -тропомиозин (немалиновые миопатии [Donner et al., 2002], дистальные артрогрипозы [Robinson et al., 2007]), тропонины Т, I и С (ФНС, DCM [Fatkin and Graham, 2002; Mirza et al., 2005]) и реже – актин, тяжелые цепи миозина, С-белок и другие саркомерные белки [Fatkin and Graham, 2002]. Таким образом, мы видим, что в большинстве случаев причиной той или иной миопатии является мутация именно в регуляторных белках тонкого филамента.

Именно поэтому изучение структуры и функций белков, несущих такие мутации, может оказаться полезным для понимания механизмов развития миопатий и разработки подходов к их коррекции. Кроме того, мутантные белки представляют собой удобную модельную систему для изучения принципов устройства и функционирования данных молекул.

Основные методические подходы, применяемые для изучения миопатических мутаций в регуляторных белках (тропомиозины и тропонины), сводятся в основном к характеристикам функциональных свойств реконструированного тонкого филамента. Это измерение кальциевой чувствительности тонкого филамента и актин-активируемой АТРазы миозиновой головки, а также изучение скорости перемещения реконструированных тонких филаментов в системе *in vitro motility*. Такие исследования зачастую дают представление об общих тенденциях изменений в функционировании тонкого филамента, содержащего мутацию в одном из компонентов. Например, в статье С. Марстона с соавторами [Mirza et al., 2005] в случае всех исследованных мутантов тропонинов Т и С наблюдалось уменьшение АТРазной активности актомиозина и ее кальциевой чувствительности. Однако, несмотря на всю пользу и многочисленность данных исследований, конкретная причина нарушений функционирования тонкого филамента в них зачастую остается неясной. Именно поэтому наиболее плодотворный результат приносит совмещение функциональных и структурных подходов, таких как спектроскопия кругового дихроизма [Hitchcock-DeGregori et al., 2006], использование флуоресцентных меток [Golitsina et al., 1997], дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и изучение температурных зависимостей диссоциации комплексов тропомиозина с F-актином [Kremneva et al., 2004; 2006]. Хорошим примером подобного совмещения является работа С. Марстона с соавторами [Mirza et al., 2007], где упомянутые выше функциональные тесты удачно сочетаются с изучением методом ДСК тепловой денатурации  $\alpha$ -тропомиозинов, несущих DCM мутации E40K и E54K, и их комплексов с F-актином.

##### **5. Изучение тепловой денатурации тропомиозина методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).**

Метод ДСК является одним из подходов, позволяющих давать интегральную оценку структурных изменений, происходящих во взаимодействующих друг с другом белках. Данный метод основан на изучении тепловой денатурации белка. Следует

отметить, что температура является важным термодинамическим параметром, сопряженным с энтальпией – термодинамическим потенциалом, описывающим энергетическое состояние системы [Privalov and Potekhin, 1986]. Структурные перестройки, происходящие в белках при их функционировании, существенным образом отражаются на тепловой денатурации белка [Privalov and Dragan, 2007]. Вследствие этого применение метода ДСК позволяет в ряде случаев получать очень ценную (и зачастую уникальную) информацию о конформационных изменениях, происходящих в молекуле белка при ее функционировании [Левицкий, 2004б].

#### *Свободный тропомиозин.*

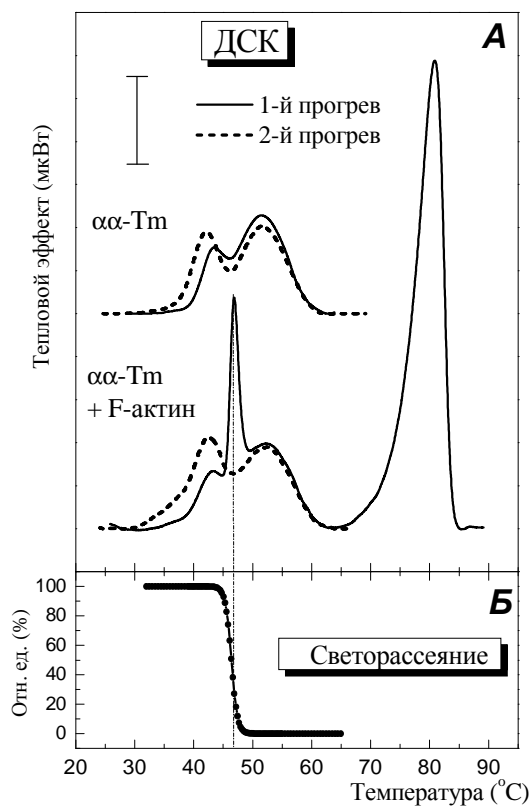
Тепловая денатурация гомодимеров тропомиозина из скелетных и гладких мышц (а также  $\alpha\beta$ -гетеродимеров из гладких мышц [Orlov et al., 1998; Levitsky et al., 2000]) детально изучена методом ДСК. Было установлено, что молекула скелетномышечного  $\alpha$ -тропомиозина состоит из нескольких кооперативных блоков с разной термостабильностью [Williams and Svenson, 1981]. Кривая ДСК такого тропомиозина представлена двумя хорошо разрешимыми пиками с максимумами при  $\sim 43^\circ\text{C}$  и  $\sim 54^\circ\text{C}$ . Низкотемпературный пик появляется лишь у препаратов с восстановленными SH-группами, но полностью исчезает в условиях, способствующих образованию дисульфидной связи между остатками Cys-190 двух цепей тропомиозина [Kremneva et al., 2004]. Это вполне согласуется с литературными данными о том, что низкотемпературный пик соответствует плавлению С-концевой части молекулы тропомиозина с восстановленными SH-группами, тогда как высокотемпературный пик состоит из двух перекрывающихся тепловых переходов, один из которых соответствует N-концевой части тропомиозина, а другой – С-концевой части молекулы с дисульфидной связью между остатками Cys-190 [Williams and Svenson, 1981]. Показано, что плавление тропомиозина не зависит от скорости прогрева и не меняется при повторных прогревах, являясь, таким образом, полностью обратимым и термодинамически равновесным процессом [Кремнева, 2005].

#### *Комплексы тропомиозина с F-актином.*

Исследование методом ДСК комплексов тропомиозина скелетных [Kremneva et al., 2004; Кремнева и др., 2003] и гладких [Levitsky et al., 2000] мышц с F-актином показало, что в присутствии актина заметно изменяется характер тепловой денатурации тропомиозина, что выражается в возникновении нового высококооперативного теплового перехода, который полностью исчезал при повторном прогреве после необратимой



денатурации F-актина и потому отражал денатурацию связанного с актином тропомиозина (рис. 4А). При этом связывание с тропомиозином не оказывало влияние на тепловую денатурацию F-актина, стабилизированного фаллоидином, который денатурировал при гораздо более высоких температурах (~80°C) [Левецкий, 2004б]. Была обнаружена очень хорошая корреляция между температурой максимума нового высококооперативного теплового перехода, появляющегося на кривой ДСК тропомиозина в присутствии F-актина (рис. 4А), и температурой диссоциации тропомиозина с поверхности актинового филамента, измеряемой по снижению светорассеяния (рис. 4Б) [Левецкий, 2004б].



**Рис. 4.** Температурные зависимости тепловой денатурации связанного с актином тропомиозина и его диссоциации с поверхности актинового филамента [Левецкий, 2004б].

**А.** Кривые ДСК для комплекса  $\alpha$ -гомомера тропомиозина ( $\alpha\alpha$ -Тм) из скелетных мышц кролика с F-актином, стабилизированным фаллоидином. Для сравнения приведены также кривые денатурации  $\alpha\alpha$ -Тм, полученные в отсутствие F-актина. Пунктиром показаны кривые, полученные при повторном прогреве соответствующих образцов. Условия: 30 мкМ  $\alpha\alpha$ -Тм, 46 мкМ F-актин, 70 мкМ фаллоидин в 20 мМ буфере Нерес-КОН, pH 7,3, содержащем 2 мМ  $MgCl_2$  и 1 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Вертикальная метка соответствует 10 мкВт. Скорость нагрева – 1 К/мин.

**Б.** Температурная зависимость диссоциации комплекса  $\alpha\alpha$ -Тм–F-актин, полученная при измерениях светорассеяния в тех же условиях и при той же скорости нагрева, что и кривая, полученная методом ДСК (А). 100% соответствуют разнице в светорассеянии между комплексом  $\alpha\alpha$ -Тм–F-актин при 25°C и свободным F-актином, стабилизированным фаллоидином, светорассеяние которого не изменялось в исследуемом температурном диапазоне (до 65°C). Снижение интенсивности светорассеяния отражает диссоциацию комплекса  $\alpha\alpha$ -Тм–F-актин.

Эксперименты, проведенные при разных концентрациях тропомиозина и постоянной концентрации актина, позволили предположить механизм тепловой денатурации тропомиозина в присутствии F-актина. Данный механизм сводится к тому, что денатурация тропомиозина наблюдается только тогда, когда он не связан с F-актином, т.е. F-актин оказывает своего рода протекторное действие в отношении тропомиозина. При этом новый кооперативный переход на кривой ДСК отражает плавление тропомиозина в узком температурном интервале, происходящее после его диссоциации с поверхности актинового филамента. Для описания тепловой денатурации тропомиозина в присутствии F-актина вводятся три параметра:

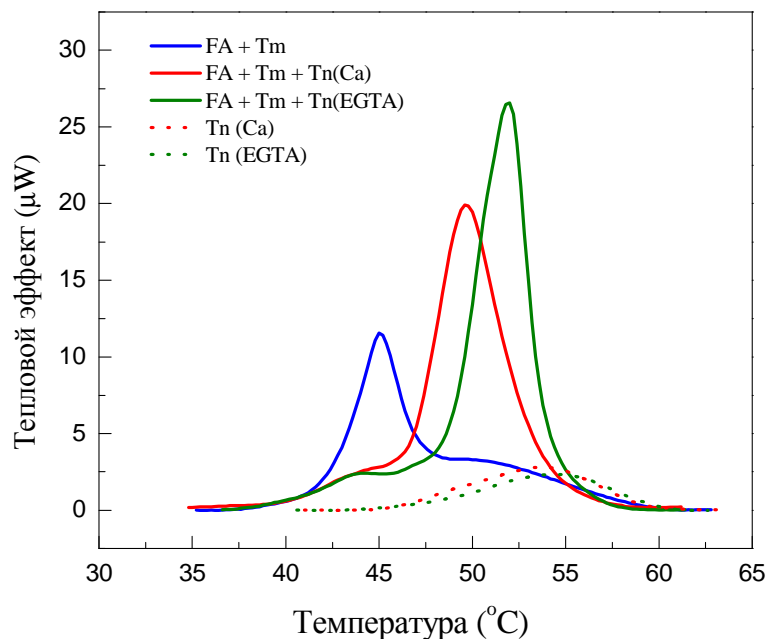
- *Температура денатурации,  $T_m$*  - температура максимума теплового перехода самого легкоплавкого домена тропомиозина; определяется из кривой ДСК тропомиозина в отсутствие F-актина.
- *Температура диссоциации,  $T_{diss}$*  – температура полуперехода на кривой температурной зависимости диссоциации комплекса F-актина с тропомиозином, полученной методом регистрации температурных зависимостей светорассеяния (*Wegner, 1979; Kremneva et al., 2004*).
- *Температура актин-индуцированного перехода,  $T_{AT}$*  – температура максимума нового перехода, появляющегося на кривой ДСК комплексов F-актина с тропомиозином; в подавляющем большинстве случаев равна  $T_{diss}$ .

Опираясь этими терминами, можно сказать, что картина тепловой денатурации тропомиозина в присутствии F-актина определяется соотношением  $T_m$  и  $T_{diss}$  [*Kremneva et al., 2004; Левицкий, 2004б; Кремнева, 2005*]. Вызванные актином изменения максимальны в том случае, когда  $T_m$  значительно ниже, чем  $T_{diss}$ . Тогда та часть молекулы тропомиозина, которая должна денатурировать в отсутствие F-актина при температурах ниже  $T_{diss}$ , теперь вынуждена плавиться в узком температурном диапазоне, ограниченном слева температурой начала диссоциации. Естественно, что тогда плавление более легкоплавкого домена происходит при более высокой температуре, что и объясняет изменения в картине ДСК, вызванные добавлением F-актина к тропомиозину. Описанная ситуация наиболее ярко проявляется в случае гладкомышечного тропомиозина [*Levitsky et al., 2000; Kremneva et al., 2006*], для которого  $T_m$  на 4–5°C ниже, чем  $T_{diss}$ . С другой стороны, эффект актина на тепловую денатурацию тропомиозина менее выражен или минимален для тех тропомиозинов, которые диссоциируют от актина при температурах, близких к  $T_m$  или даже меньших, чем  $T_m$ . Примером таких тропомиозинов является рекомбинантный дрожжевой ТМ2. Добавление актина почти не влияет на тепловую денатурацию этого белка, т.к. его диссоциация с поверхности актинового филамента

происходит на 3,6°C раньше, чем денатурация свободного тропомиозина [Кремнева, 2005].

*Комплексы тропомиозина с F-актином и тропонином.*

При изучении тепловой денатурации изолированных компонентов тропонинового комплекса было показано, что при прогреве вплоть до 100°C TnT и TnI не демонстрируют кооперативных тепловых переходов [Кремнева и др., 2003]. TnC – единственный из компонентов тропонинового комплекса, обладающий кооперативным переходом при денатурации. В 1980 г. Цалковой и Приваловым было показано, что в присутствии двухвалентных катионов кривая теплопоглощения TnC представлена двумя тепловыми переходами, соответствующими C- и N-концевому доменам молекулы TnC [Tsalkova and Privalov, 1980]. Однако в составе тропонинового комплекса характер денатурации TnC меняется, демонстрируя кривую теплопоглощения с одним максимумом как в присутствии, так и в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  [Кремнева и др., 2003].



**Рис. 5.** Кривые ДСК комплексов F-актина с α-тропомиозином (Tm) и тропонином (Tn). Представлены кривые для комплекса в двух его состояниях – в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) и в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM EGTA). Для сравнения приведена кривая ДСК для комплекса F-актина с тропомиозином, полученная в отсутствие тропонина. Концентрация Tm – 10 μM, тропонина – 10 μM, F-актина – 46 μM, фаллоидина – 60 μM. Прочие условия – 30 mM Hepes, pH 7,3, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Скорость прогрева – 1 K/мин. [Невзорov, Кремнева, Левицкий, неопубликованные данные].

Исследование методом ДСК комплекса тропонина и тропомиозина в отсутствие актина показало, что его термограмма представляет собой суперпозицию кривых, соответствующих плавлению изолированных Tn и Tm. Добавление в систему F-актина приводило к существенному изменению тепловой денатурации комплекса Tm-Tn, отражающемуся в значительном увеличении кооперативности и заметном повышении температуры максимума теплового перехода связанного с актином Tm; особенно ярко этот эффект проявлялся в отсутствие  $Ca^{2+}$  (т.е. в состоянии “blocked”) [Кремнева и др., 2003]. Недавно нами были получены данные, свидетельствующие о различии тепловой денатурации тропомиозина в составе реконструированного тонкого филамента в присутствии и в отсутствие ионов кальция (рис. 5). При этом температура максимума пика плавления связанного с актином тропомиозина в присутствии кальция и полного тропонинового комплекса ниже (на  $\sim 3,5^{\circ}C$ ), чем в случае отсутствия кальция в среде. Эти данные (рис. 5) свидетельствуют о том, что добавление тропонина оказывает существенное влияние на тепловую денатурацию связанного с F-актином Tm, значительно увеличивая его термостабильность [Кремнева и др., 2003; Кремнева, 2005].

*Влияние кардиомиопатических мутаций на тепловую денатурацию тропомиозина.*

Исследование кардиомиопатических мутаций в регуляторных белках, в частности в тропомиозине, как уже было отмечено выше, представляет большой интерес. В качестве примера подобных исследований можно привести ранее сделанные в нашей лаборатории работы по изучению тепловой денатурации индивидуальных и связанных с актином скелетных  $\alpha$ -тропомиозинов, несущих FHC-мутации D175N и E180G [Kremneva et al., 2004] или DCM-мутации E40K и E54K [Mirza et al., 2007], а также работу японских исследователей [Sakura et al., 2006], успешно применивших разработанный в нашей группе калориметрический подход для исследования тепловой денатурации  $\alpha$ -тропомиозина с заменами участков, связывающих тропонин T. Было выяснено, что мутации могут изменять как количественные (кооперативность,  $T_m$ ,  $T_{diss}$ , энтальпия), так и качественные (появление новых переходов) характеристики тепловой денатурации тропомиозинов и их комплексов с F-актином. Например, в случае мутации E180G было зафиксировано резкое уменьшение  $T_{diss}$ , вплоть до диапазона физиологических температур, что могло бы означать, что в основе эффекта данной мутации лежит значительное ослабление прочности связывания мутантного тропомиозина с F-актином при повышенных температурах [Kremneva et al., 2004].

В данной работе мы продолжаем изучение влияния различных миопатических мутаций на тепловую денатурацию тропомиозина в отсутствие и в присутствии F-актина. В данном случае мы сосредоточили свое внимание на мутации Arg91Gly в  $\beta$ -тропомиозине скелетных и гладких мышц, которая также встречается и у некоторых немышечных NMW- $\beta$ -тропомиозинов. Эта мутация, приводящая к тяжелой миопатии – дистальному артрогрипозу, сопровождается значительным снижением сродства  $\beta$ -тропомиозина к F-актину [Robinson et al., 2007]. Изучение влияния этой мутации в  $\beta$ -тропомиозине на его тепловую денатурацию в отсутствие и в присутствии F-актина составило одну из главных целей данной работы. При этом важно отметить, что сама по себе тепловая денатурация  $\beta$ -тропомиозина была изучена к настоящему времени явно недостаточно. Если процесс тепловой денатурации  $\alpha$ -тропомиозина скелетных, сердечных и гладких мышц, а также немышечного  $\alpha$ -тропомиозина исследован весьма подробно, то этого никак нельзя сказать о  $\beta$ -тропомиозине. В литературе имеются лишь отрывочные сведения о тепловой денатурации гомодимеров  $\beta$ -тропомиозина гладких мышц [Orlov et al., 1998; Levitsky et al., 2000], а о денатурации скелетного  $\beta$ -тропомиозина вообще практически ничего не известно. Поэтому изучение особенностей тепловой денатурации  $\beta$ -тропомиозина составило другую, не менее важную цель настоящей работы.

Итак, **цель работы** заключалась в том, чтобы исследовать особенности тепловой денатурации  $\beta$ -тропомиозина в отсутствие и в присутствии F-актина и изучить влияние на нее мутации Arg91Gly (R91G). В связи с этим были сформулированы следующие конкретные задачи:

1. Методом ДСК в сочетании с другими методами изучить влияние мутации R91G в скелетном и гладкомышечном/немышечном  $\beta$ -тропомиозине на его тепловую денатурацию.
2. Используя ранее разработанные подходы (сочетание метода ДСК с измерениями температурных зависимостей светорассеяния) изучить тепловую денатурацию  $\beta$ -тропомиозина в комплексах с F-актином и влияние на нее мутации R91G.

## Материалы и методы.

В работе использовали: Нepes, АТР, акриламид, фаллоидин, гуанидин гидрохлорид фирмы “Sigma Chemical Co.” (США); Трис, SDS, MgCl<sub>2</sub> – “Serva” (Германия), β-меркаптоэтанол – “ICN” (США). Остальные реактивы, использованные в работе, были отечественного производства марок о.с.ч. и х.ч.

Препараты рекомбинантных β-SkTm и β-SmTm/β-NmTm дикого типа и с мутацией R91G были любезно предоставлены д-ром Чарльзом Редвудом (University of Oxford, UK).

### *Выделение актина из ацетонового порошка.*

Ацетоновый порошок скелетных мышц кролика был ранее получен сотрудниками лаборатории. Для экстракции актина навеску ацетонового порошка (1 г) суспендировали в 20 мл буфера G (2 мМ трис-НСl, 0.2 мМ АТР, 0.2 мМ СаCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ β-МЕ) и оставляли на льду в течение 45 минут при постоянном перемешивании. Экстракт отделяли от нерастворимой фракции центрифугированием в течение получаса при 28000 об/мин на роторе Ti-60 (в работе использовали первую центрифугу серии “L” производства фирмы “Beckman” (США)). Актин, содержащийся в супернатанте, полимеризовали добавлением KCl и MgCl<sub>2</sub> до конечных концентраций 50 мМ и 2 мМ, соответственно. Указанные растворы добавляли постепенно, постоянно перемешивая раствор. После 2 часов инкубации на холоду добавляли KCl до конечной концентрации 0,6 М (до 0,55 М, учитывая, что в пробе уже содержится 0,05 М KCl). Цилиндр с раствором белка оставляли на ночь на холоду. Полимеризованный актин собирали центрифугированием в роторе Ti-75 при скорости 29000 об/мин в течение 3 часов. Осадок ресуспендировали в нескольких миллилитрах буфера G и измельчали в гомогенизаторе Поттера. Полученный раствор (объемом ~3,5 мл) диализовали против трех смен буфера G для постепенной деполимеризации F-актина. Последний диализ проводили против буфера G, содержащего 0,1 мМ NaN<sub>3</sub>. Остатки полимеризованного F-актина удаляли центрифугированием в роторе Ti-75 при 40000 об/мин в течение трех часов. Собирали супернатант, определяли концентрацию актина спектрофотометрическим методом, используя коэффициент молярной экстинкции E<sup>1%</sup> при 290 нм, равный 6,3 см<sup>-1</sup>. G-актин хранили в течение 3 недель; перед экспериментами G-актин полимеризовали для получения F-актина, добавляя к G-актину MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 2 мМ.

### *Стабилизация F-актина фаллоидином.*

Стабилизацию F-актина фаллоидином осуществляли при комнатной температуре, медленно добавляя к раствору F-актина водный раствор фаллоидина (1,43 мМ) до конечной концентрации последнего, превосходящей молярную концентрацию актина в 1,33 раза.

### *Получение восстановленных препаратов скелетного тропомиозина.*

Для получения полностью восстановленных препаратов Тм, белок инкубировали в присутствии 20 мМ  $\beta$ -МЕ в течение 60 мин при 50°C, затем 10 мин при 70°C. Перед калориметрическими экспериментами в случае  $\beta$ -тропомиозинов к препаратом дополнительно добавляли 1 мМ  $\beta$ -МЕ для предотвращения образования дисульфидных сшивок между SH-группами остатков Cys-190 [Kremneva et al., 2004]. При этом первый прогрев в калориметре был мало информативен из-за искажения базовой линии вследствие окисления  $\beta$ -МЕ в диапазоне 50-60°C.

### *Приготовление пиренил-меченого тропомиозина.*

Осуществляли по методике, предложенной Лерером и соавт. [Ishii & Lehrer, 1990]. Тропомиозин растворяли до конечной концентрации ~2 мг/мл в денатурирующем буфере, содержащем 5М гуанидин гидрохлорид, 20 мМ DTT, 1 мМ  $MgCl_2$ , 30 мМ Hepes, pH 7,0, и прогревали в течение 60 мин при 40°C для восстановления сульфгидрильных групп. Для удаления избытка DTT после инкубации 500 мкл раствора наносили на гель-фильтрационную колонку NAP-5 (Pharmacia), уравновешенную денатурирующим буфером без DTT, и элюировали 1 мл того же буфера. Концентрацию белка в элюате определяли спектрофотометрически – она составляла половину от исходной (1,0-1,2 мг/мл), что согласуется с теоретическим расчетом. Далее к элюату добавляли 5-кратный молярный избыток пирен-йодацетамида (Molecular probes), растворенного в диметилформамиде, и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение четырех часов. После инкубации непрореагировавшую метку гасили избытком DTT. Для освобождения от свободной метки и DTT раствор белка пропускали через колонку NAP-5 (Pharmacia), уравновешенную денатурирующим буфером без DTT. Для удаления следов метки проводили диализ (2 смены) против буфера, содержащего 30 мМ Hepes, pH 7,3, 100 мМ KCl, 1 мМ  $MgCl_2$ . Концентрацию меченого белка определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент экстинкции  $\epsilon_{344} = 2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Общую концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Во всех случаях выход меченого белка был не менее 90%.

### *Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS.*

Белковый состав проб анализировали методом электрофореза в камерах Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad) по методу Лэммли [Laemmli, 1970] в 16%-м разделяющем геле при постоянном напряжении 200 V. Толщина геля составляла 0,75 мм.

### *Определение концентрации белка.*

*Спектрофотометрическое определение.* Оптическую плотность растворов  $\beta$ -тропомиозина определяли на спектрофотометре Cary-100 (Varian), используя коэффициент экстинкции 0,27 (SwissProt P07951).

*Метод Брэдфорд.* Использовали модификацию метода, позволяющую определить от 1 до 10 мг белка в пробе (1 мл) [Практикум по биохимии, 1989].

### *Ограниченный трипсинолиз $\beta$ -тропомиозина.*

Для проведения ограниченного протеолиза использовали трипсин, обработанный тозил-L-фенилаланил-хлорметилкетонем (TPCK-трипсин, Worthington biochemical corporation). Реакцию проводили в буфере, содержащем 30 mM Hepes, pH 7,3, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>. К раствору белка (0,6 мг/мл) добавляли раствор TPCK-трипсина (0,5 мг/мл в 1 mM HCl) до весового соотношения 300/1. Трипсинолиз проводили при 25°C, отбирая равные аликвоты через определенные промежутки времени. Реакцию останавливали добавлением к аликвоте равного объема 2-х кратного буфера для образцов (0,125 M Трис-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 9M мочевины, 0,004% бромфеноловый синий, 5%  $\beta$ -ME). Пробы анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением SDS по методу Лэммли.

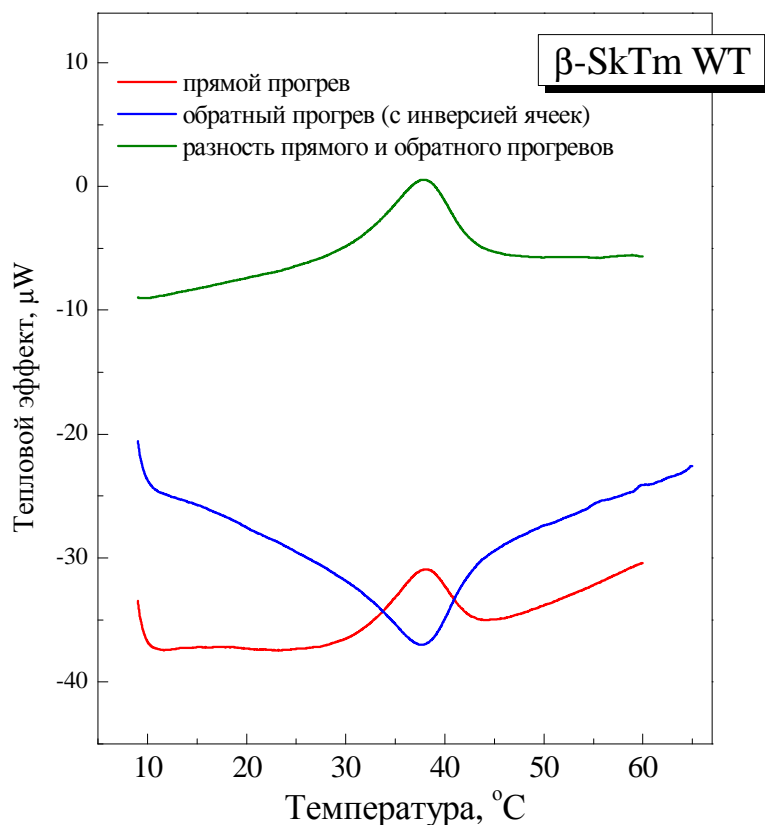
### *Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).*

*Стандартный метод измерения.* Калориметрические исследования проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М (производства Института биологического приборостроения РАН, г. Пущино-на-Оке) с капиллярными платиновыми ячейками объемом 0.47 мл. Измерения проводили при скорости нагрева 1 градус в минуту в диапазоне температур от 10 до 100°C; для предотвращения возможного дегазирования растворов при повышении температуры в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление 2–2.5 атмосферы. Калибровочная мощность W составляла 25 мкВт.



*Модифицированный метод измерения для некооперативных тепловых переходов.* В случаях переходов с низкой кооперативностью применялся модифицированный метод ДСК («метод реверсной съемки») [Kremneva et al., 2006]. Для этого калориметрические измерения проводились двумя способами: стандартным, когда исследуемый белок помещен в опытную ячейку, а контрольный буфер в ячейку сравнения, и модифицированным, когда тот же белок помещен в ячейку сравнения, а буфер – в опытную ячейку. В результате во втором случае белковый пик на термограмме оказывался перевернутым (рис. 6), а все артефакты инструментальной базовой линии располагались в тех же местах, что и при стандартных измерениях. Далее из кривой, полученной стандартным образом, вычиталась кривая, полученная модифицированным способом. Это позволяло избежать артефактов, вызываемых вычитанием инструментальной базовой линии, и удвоить белковый сигнал. Затем результирующую кривую делили на два для получения реального значения этого сигнала. Описанный выше способ основан на том, что инструментальная базовая линия является особенностью каждого конкретного калориметра и не зависит от способа измерения; при этом применение описанной выше процедуры позволяло избегать непосредственного вычитания базовой линии и внесения дополнительных ошибок, связанных с низкой кооперативностью тепловых переходов, которые при стандартных измерениях были практически невидимы. Ранее этот подход, разработанный в нашей лаборатории, был успешно применен для выявления тепловых переходов с очень низкой кооперативностью в препаратах различных изоформ немышечных  $\alpha$ -тропомиозинов фибробластов [Kremneva et al., 2006].

Дальнейший анализ кривых теплопоглощения проводили с использованием того же программного обеспечения, что и при стандартных измерениях. Процедура деконволюции проводилась по методу [Freire & Biltonen, 1978] с использованием программы «Origin 1.16» (MicroCal). Вкратце, суммарную эндотерму с помощью функции наименьших квадратов разлагали на несколько независимых переходов, представляющих собой распределения Гаусса. Другими словами, эта программа позволяла определить количество двухстадийных переходов (калориметрических доменов), участвующих в формировании суммарной эндотермы. Было показано, что для адекватного описания кривых ДСК вполне хватало, как правило, трех независимых доменов, для каждого из которых вводились параметры калориметрической энтальпии ( $\Delta H_{cal}$ ), дающей представление о размере перехода, и температуры максимума перехода ( $T_m$ ).



**Рис. 6.** Применение модифицированного метода ДСК («метод реверсной съемки») на примере скелетного β-тропомиозина (β-SkTm). Подробнее см. в тексте.

*Исследование температурных зависимостей диссоциации комплексов тропомиозина с F-актином методом светорассеяния.*

Температурные зависимости диссоциации комплексов Tm–F-актин, вызванной постепенным нагревом, регистрировали по изменениям светорассеяния под углом в 90° [Levitsky *et al.*, 2000; Kremneva *et al.*, 2004; 2006]. Эксперименты проводили при длине волны 350 нм на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian, Australia), оборудованном температурным блоком, позволяющим поддерживать постоянную скорость нагрева (такую же, как в калориметрических экспериментах, т. е. 1 градус в минуту) и контролировать температуру в ячейках. Перед началом эксперимента измеряли температурную зависимость светорассеяния раствора F-актина той же концентрации, что и в комплексах Tm–F-актин. Светорассеяние возрастало пропорционально с увеличением количества Tm, связанного с F-актином. После диссоциации комплекса Tm–F-актин в результате нагрева величина светорассеяния становилась равной светорассеянию свободного F-актина, так как свободный Tm практически не демонстрировал

собственного светорассеяния. Таким образом, температурная зависимость снижения величины светорассеяния комплекса Tm-F-актин отражает диссоциацию Tm с поверхности актиновых филаментов. Кривые диссоциации комплексов, вместе с температурной зависимостью светорассеяния свободного актина, анализировали с помощью программного обеспечения «Origin 7.0» (MicroCal) на основе сигмоидальной функции Больцмана. Основным параметром, извлекаемый обычно из этих кривых, – это  $T_{diss}$ , т. е. та температура, при которой интенсивность светорассеяния снижается на 50 %.

#### *Метод кругового дихроизма.*

Спектры кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете записывали на дихрографе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics) при 20°C (а в некоторых случаях – при 5°C) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 2 мм. Температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 nm ( $\theta_{222}$ ) регистрировали в интервале от 5°C до 60°C при скорости нагрева 1°C/мин, т. е. при той же скорости нагрева, что и в калориметрических исследованиях. Единственное различие заключалось в том, что в КД экспериментах рабочая концентрация Tm была существенно ниже и составляла 0.1 мг/мл, а Hepes-буфер был заменен на 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.3), содержащий 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ β-ME.

#### *Соосаждение тропомиозина с F-актином.*

Сродство β-тропомиозина к актину определяли методом соосаждения при 20°C. Для этого F-актин (10 μМ) смешивали с Tm (0–5 μМ) в стандартном буфере (30 мМ Hepes, pH 7.3, 100 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ β-ME) до конечного объема 100 μл. Далее пробы, содержащие актин и определенные концентрации Tm центрифугировали при 100000 g в течение 30 мин (Beckman TL100A). Осадок растворяли в исходном объеме буфера, затем к супернатанту и осадку добавляли 100 μл буфера для образцов (см. раздел «Ограниченный протеолиз тропомиозина»), кипятили 3 мин и проводили сравнение супернатантов и осадков с помощью SDS-электрофореза в 16%-м полиакриламидном геле описанным выше способом. Для определения количества белка гели сканировали (сканер Epson 1640SU) и анализировали с помощью программы MatLab.

#### *Аналитическое ультрацентрифугирование.*

Исследования седиментационных свойств различных препаратов β-тропомиозина проводили методом скоростной седиментации на аналитической ультрацентрифуге (модель E, Beckman), снабженной оптической системой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером для сбора данных on-line. Эксперименты проводили,

используя ротор An-F Ti с двухсекторными ячейками, при скорости вращения ротора 52000 об/мин. Седиментационные кривые регистрировали по оптической плотности при 280 нм. Концентрация белка составляла 1 мг/мл для всех препаратов  $\beta$ -тропомиозина. Эксперименты проводили в стандартном буфере (30 mM Hepes, pH 7,3, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>); все препараты исследовали одновременно в одном роторе. Анализ распределения коэффициентов седиментации проводили, используя пакет программного обеспечения SEDFIT. Автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории в.н.с. Н.А. Чеботаревой и м.н.с. А.В. Пивоваровой за помощь в проведении экспериментов по аналитическому центрифугированию и обработке полученных данных.

## Результаты и их обсуждение

### **Немышечный $\beta$ -тропомиозин ( $\beta$ -NmTm).**

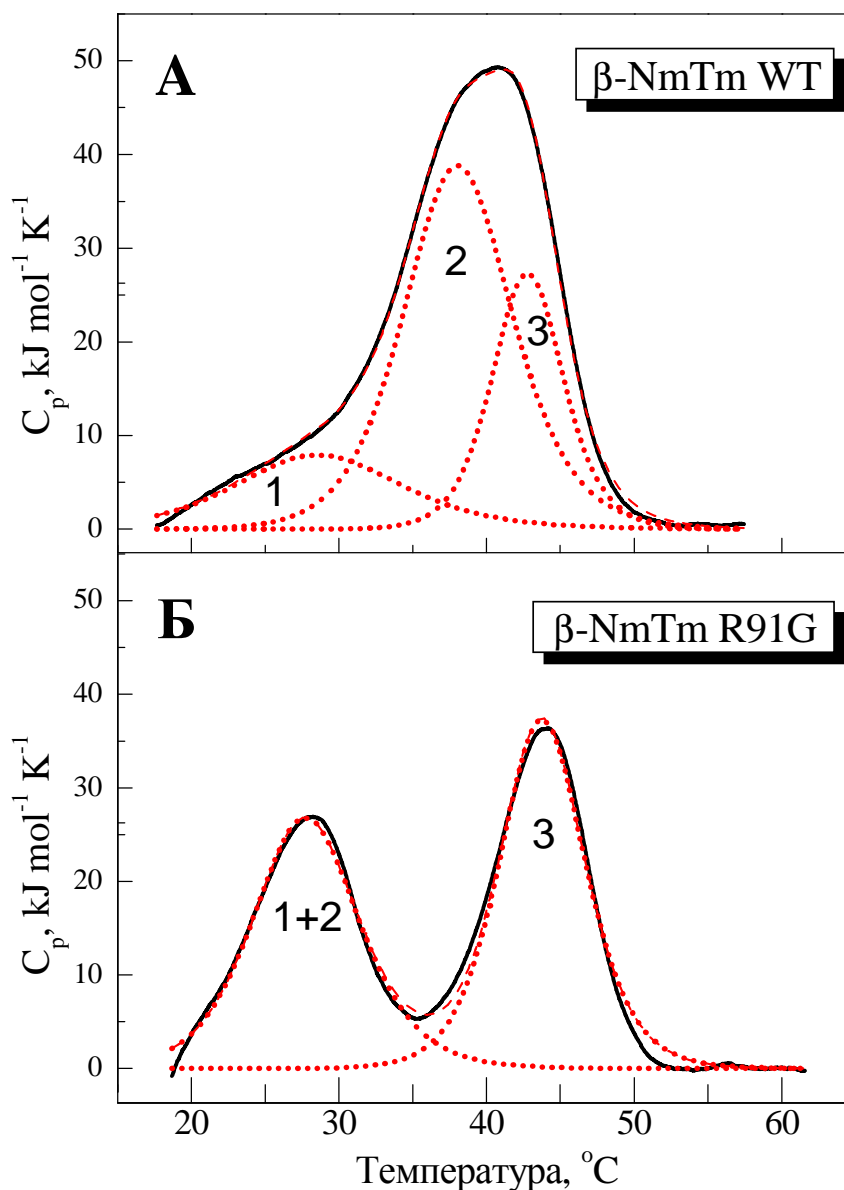
На первом этапе работы мы провели структурные исследования гомодимеров высокомолекулярной (НМВ) неммышечной изоформы  $\beta$ -тропомиозина ( $\beta$ -NmTm), сопоставляя при этом свойства белка дикого типа ( $\beta$ -NmTm w.t.) со свойствами  $\beta$ -NmTm, несущего мутацию R91G ( $\beta$ -NmTm R91G). Эта изоформа  $\beta$ -тропомиозина идентична гладкомышечному  $\beta$ -Tm (рис. 2), однако для упрощения мы будем далее обозначать ее как неммышечную ( $\beta$ -NmTm). Важным преимуществом  $\beta$ -NmTm по сравнению со скелетномышечной изоформой ( $\beta$ -SkTm), содержащей две SH-группы (Cys-36 и Cys-190), является наличие в ней лишь одной SH-группы (Cys-36), что в значительной степени облегчает структурные исследования.

### ***Свойства свободного $\beta$ -тропомиозина дикого типа и несущего мутацию R91G.***

Структурные исследования неммышечной изоформы  $\beta$ -Tm были начаты с изучения методом ДСК тепловой денатурации восстановленных препаратов белка дикого типа и мутанта R91G с применением реверсной съемки (см. «Материалы и методы»). После вычитания химической базовой линии кривые ДСК подвергались деконволюции, т.е. разложению на некоторое количество одностадийных обратимых переходов, соответствующих плавлению отдельных кооперативных участков в молекуле – так называемых калориметрических доменов. Результаты данного анализа представлены на рис. 7. Основные калориметрические параметры доменов, такие как температура максимума пика,  $T_m$ , и калориметрическая энтальпия  $\Delta H_{cal}$ , рассчитанная как площадь под пиком, приведены в таблице 1.

Экспериментальная кривая ДСК для неммышечного  $\beta$ -тропомиозина дикого типа ( $\beta$ -NmTm WT) была разложена на 3 калориметрических домена (рис. 7А): домены 1, 2 и 3 с температурными максимумами соответственно 28,7, 38,1 и 42,8 °С, чьи энтальпии представляют 17%, 57% и 26% от общей  $\Delta H_{cal}$ , соответственно. Необходимо отметить существенный наклон кривой ДСК, который начинается от  $\sim 15^\circ\text{C}$  и включает в себя большую часть домена 1. Наличие этого наклона свидетельствует о том, что  $\beta$ -NmTm w.t. медленно плавится уже при комнатной температуре. Отметим, что зарегистрировать подобную низкокооперативную денатурацию возможно исключительно с помощью

метода реверсной съемки, т.к. при обработке только прямых прогревов некооперативные переходы обычно игнорируются при вычитании химической базовой линии.



**Рис. 7.** Разложение кривых ДСК для  $\beta\text{-NmTm w.t.}$  (А) и  $\beta\text{-NmTm R91G}$  (Б) на обособленные тепловые переходы, соответствующие отдельным калориметрическим доменам в молекуле тропомиозина. Концентрация белков составляла 30 мкМ. Концентрации остальных компонентов: 30 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,3. Скорость нагрева 1 К/мин. Кривые были проанализированы в соответствии с моделью обратимого одностадийного перехода каждого калориметрического домена. Черные линии представляют собой экспериментальные кривые после вычитания инструментальной и химической базовых линий. Красной прерывистой линией показаны отдельные калориметрические переходы, соответствующие доменам 1, 2. и 3.

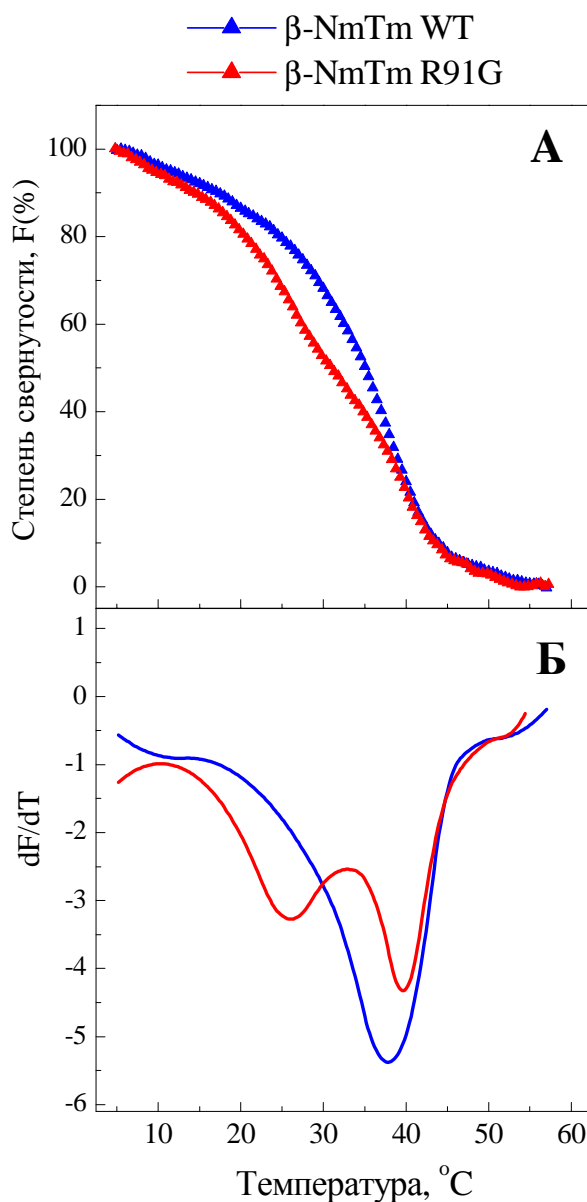
**Таблица 1.** Калориметрические характеристики отдельных доменов, полученных при разложении кривых ДСК для  $\beta$ -NmTm w.t. и  $\beta$ -NmTm R91G на индивидуальные тепловые переходы (рис. 7).

$\beta$ -NmTm	$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kJ/mol)
<b><math>\beta</math>-NmTm w.t.</b>		
Домен 1	28,7	120
Домен 2	38,1	380
Домен 3	42,8	175
<b><math>\beta</math>-NmTm R91G</b>		
Домен 1+2	27,8	255
Домен 3	43,8	290

Присутствие мутации R91G оказывало драматическое влияние на тепловую денатурацию  $\beta$ -NmTm (рис. 7Б и таблица 1), вызывая появление нового низкотемпературного перехода с максимумом при  $\sim 27,8^\circ\text{C}$ . В этом случае кривая ДСК была разложена на два калориметрических домена с максимумами при 27,8 и 43,8°C; значения их калориметрических энтальпий составляли, соответственно, 47% и 53% от общей  $\Delta H_{cal}$ . Таким образом, мутация R91G изменяет доменную структуру  $\beta$ -NmTm, вызывая дестабилизацию почти половины молекулы, что выражается в появлении нового низкотемпературного домена (домен 1+2 на рис. 7Б). Принимая во внимание тот факт, что мутация R91G расположена в N-концевой части молекулы  $\beta$ -NmTm, мы можем предположить, что наименее термостабильные калориметрические домены 1 и 2 в  $\beta$ -NmTm w.t., чья тепловая денатурация сильно затрагивается мутацией (домен 2 исчезает вообще и видимо совмещается по положению с низкотемпературным доменом 1, давая домен 1+2), соотносятся с N-концевой частью молекулы, тогда как более термостабильный домен 3 отражает тепловую денатурацию C-концевой части  $\beta$ -NmTm. 91-й аминокислотный остаток занимает g-положение в гептадной структуре тропомиозина (см. «Обзор литературы»). Следовательно, замена аминокислотного остатка в этом месте на незаряженный или противоположно заряженный должна привести к локальной дестабилизации структуры двойной спирали. Именно с такой заменой мы сталкиваемся в случае мутации R91G. Кроме того, глицин, благодаря наличию атома водорода в качестве радикала, обладает широким диапазоном разрешенных конформаций [Финкельштейн, Птицын, 2002], поэтому он обычно оказывает дестабилизирующее влияние на структуру  $\alpha$ -спирали.

Необходимо отметить, что в нашем случае метод ДСК не позволил ответить на вопрос, происходит ли в случае  $\beta$ -NmTm R91G некооперативное плавление при низких температурах, которое наблюдалось у  $\beta$ -NmTm w.t. Дело в том, что по техническим

причинам на приборе ДАСМ-4М не удалось осуществить запись при температурах ниже 10°C. Чтобы преодолеть эти затруднения, было решено применить метод КД для изучения температурных зависимостей разворачивания  $\alpha$ -спирали тропомиозина. Данный подход позволяет начинать регистрацию при более низких температурах (4–5°C). На рис. 8 приведены нормализованные кривые температурных зависимостей разворачивания для  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G (рис. 8А) и первые производные этих кривых (рис. 8Б).



**Рис. 8.** Нормированные кривые температурных зависимостей тепловой денатурации  $\beta$ -NmTm w.t. (синяя кривая) и  $\beta$ -NmTm R91G (красная кривая), измеренные методом КД по изменениям эллиптичности при 222 нм (А). Скорость нагрева 1 °С/мин, концентрация белка во всех случаях – 0,1 мг/мл. Концентрации других компонентов: 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.3), 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ  $\beta$ -МЕ. (Б) Профили первой производной от данных, представленных на рисунке (А).



Температура максимума пика на графике первой производной  $\beta$ -NmTm WT на рис. 8Б составляет  $37,7^{\circ}\text{C}$ , что согласуется с температурой максимума домена 2 на кривой ДСК для  $\beta$ -NmTm WT (рис. 7А). В случае температурной зависимости содержания  $\alpha$ -спиралей в молекуле  $\beta$ -NmTm R91G кривая имеет выраженный двухфазный характер, который отражается в появлении низкотемпературного пика с максимумом при  $26^{\circ}\text{C}$  на графике первой производной (рис.8Б). Это свидетельствует о существенной дестабилизации структуры  $\beta$ -NmTm R91G, вызываемой заменой аргинина на глицин в 91-ом положении. Таким образом, драматический эффект мутации R91G на структуру  $\beta$ -NmTm регистрируется не только методом ДСК, но и методом КД.

Кроме эффекта мутации, следует отметить, что в обоих случаях – как в случае  $\beta$ -NmTm WT, так и в случае  $\beta$ -NmTm R91G имеет место медленное разворачивание  $\alpha$ -спиралей тропомиозина, которое регистрируется с самого начала записи, т.е. с  $5^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, данные, полученные методом КД (рис. 8), полностью согласуются с данными ДСК (рис. 7).

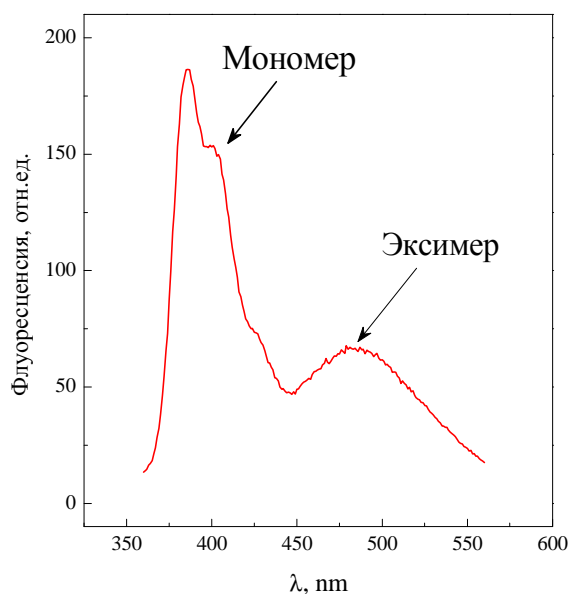
Необходимо отметить, что похожее поведение систем типа coiled-coil было описано ранее Драганом и Приваловым на примере тепловой денатурации «лейцинового zipper» [Dragan, Privalov, 2005]. Структура последнего представляет собой типичный coiled-coil, в *a* и *d*-положениях которого находится преимущественно лейцин. Авторами было показано, что тепловая денатурация модельных пептидов, имеющих структуру лейцинового zipper, не является одностадийной, как это предполагалось ранее, а состоит из нескольких (как минимум двух) этапов. Наиболее ярко выраженная стадия, которая характеризуется наибольшей энтальпией и кооперативностью соответствующего ей перехода на кривой ДСК, представляет собой обратимое расхождение цепей, составляющих coiled-coil. В пользу этого свидетельствует то, что температура максимума этого теплового перехода зависит от концентрации белка, как это и должно быть в случае обратимой диссоциации цепей. Другие переходы, названные также «предпереходами» («pretransitions»), предшествуют расхождению цепей и имеют низкую энтальпию (~15% от ее общего значения) и кооперативность. Данные переходы были обнаружены с помощью методов ДСК и КД и, по мнению авторов, отражают некие, до сих пор неидентифицированные, медленные изменения конформации обеих  $\alpha$ -спиралей лейцинового zipper, происходящие при более низкой температуре, чем главный переход (расхождение спиралей). Отметим, однако, что постулат авторов о наличии некооперативных процессов в  $\alpha$ -спиралях носит спекулятивный характер и не доказан в прямом эксперименте. Кроме того, возникает вопрос, насколько правомерно использовать результаты, полученные на лейциновом zipper, для объяснения феноменов, связанных с

денатураций  $\beta$ -NmTm. Гидрофобный кор тропомиозина (совокупность аминокислотных остатков в положениях *a* и *d*) неоднороден, в отличие от такового у лейцинового zipper, где в аналогичных положениях практически в 100% случаях находится лейцин. Однако, судя по данным Ходжеса и соавт. [Kwok & Hodges, 2004], синтетические пептиды с неоднородным гидрофобным кором также имеют «предпереход» на температурных зависимостях кругового дихроизма, что говорит в пользу гипотезы Драгана и Привалова о некооперативных процессах в двойных  $\alpha$ -спиралях, предшествующих их денатурационному расхождению.

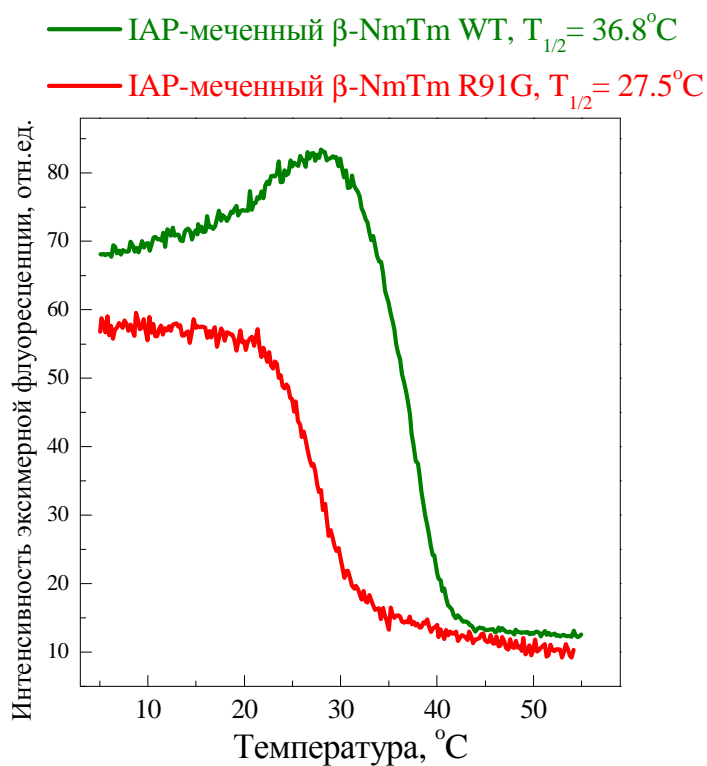
После выявления эффекта мутации R91G методами ДСК и КД встал вопрос о том, почему пик на термограмме, появление которого обусловлено *точечной* мутацией, включает в себя почти половину суммарной калориметрической энтальпии. Иными словами, действительно ли в пределах одного калориметрического домена имеет место столь высокая кооперативность, или же это некий артефакт? Для проверки гипотезы о кооперативности нами были исследованы температурные зависимости эксимерной флуоресценции пиреновой метки, связанной с единственным остатком цистеина (Cys-36) в молекуле  $\beta$ -NmTm. Этот подход основывается на том, что если тропомиозин имеет интактную структуру coiled-coil, то пиреновая метка на Cys-36 (т.е. в *a*-положении) образует эксимер с молекулой пирена, присоединенной к такому же остатку на соседней цепи гомодимера. Метка в мономерной и эксимерной форме имеет разные максимумы на спектре флуоресценции (рис. 9), поэтому регистрируя в режиме нагрева со скоростью 1 К/мин убыль флуоресценции при  $\lambda=485$  нм (максимум флуоресценции эксимера), можно наблюдать за диссоциацией цепей тропомиозина, т.е. за его тепловой денатурацией. Подобные температурные зависимости для  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G приведены на рис. 10.

Отметим, что в случае обоих препаратов наблюдалось незначительное температурное тушение флуоресценции (это было проверено и для одиночной метки). На рис. 11 приведено сопоставление кривых ДСК для  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G с первыми производными температурных зависимостей эксимерной флуоресценции пиреновой метки для этих препаратов (кривые с рис. 10). Видно, что как по форме, так и по положению на температурной шкале, пики первых производных эксимерной флуоресценции совпадают с некоторыми калориметрическими доменами, полученными в результате деконволюции кривых ДСК, что подтверждает корректность проведенного анализа. Кроме того, данный подход позволил идентифицировать переходы, полученные в результате деконволюции кривых ДСК: как домен 2 для  $\beta$ -NmTm WT (рис. 7А), так и домен 1+2, появившийся на кривой ДСК для  $\beta$ -NmTm R91G (рис. 7Б), соответствуют N-

концевой части молекулы  $\beta$ -NmTm, где находится присоединенная к остатку Cys-36 пиреновая метка.

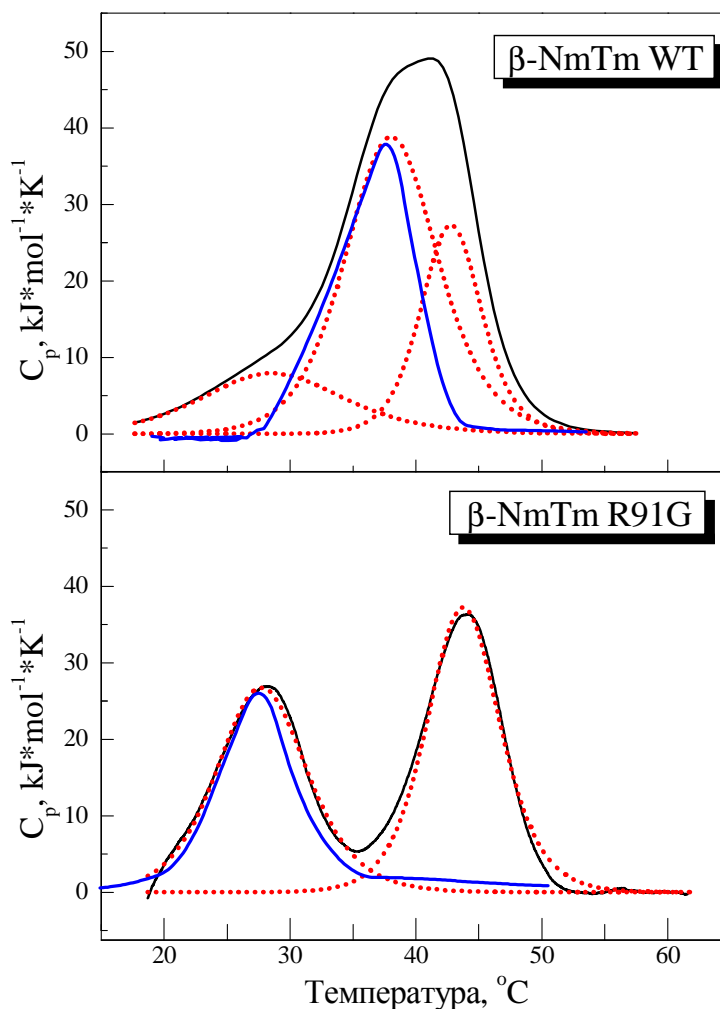


**Рис. 9.** Спектр флуоресценции пиреновой метки, присоединенной к остатку Cys-36 в  $\beta$ -NmTm WT. Длина волны возбуждения 340 нм. Концентрация меченого тропомиозина составляла 1 мкМ. Ширина щелей монохроматора 10 нм.



**Рис. 10.** Температурные зависимости эксимерной флуоресценции при 485 нм пиреновой метки, присоединенной к остатку Cys-36 в  $\beta$ -NmTm WT (зеленая кривая) и в  $\beta$ -NmTm R91G (красная кривая). Длина волны возбуждения 340 нм. Концентрация меченого тропомиозина 1 мкМ. Прочие условия: 30 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,3. Скорость нагрева 1 К/мин. Ширина щели монохроматора 10 нм.

Необходимо отметить, что температурная зависимость эксимерной флуоресценции отражает локальный процесс – расхождение двух  $\alpha$ -спиралей в районе остатка Cys-36. Но поскольку дифференциальная форма кривой, описывающей этот процесс (синие кривые на рис. 11), совпадает с соответствующим переходом на кривой ДСК, то можно говорить о высокой кооперативности внутри одного калориметрического домена.

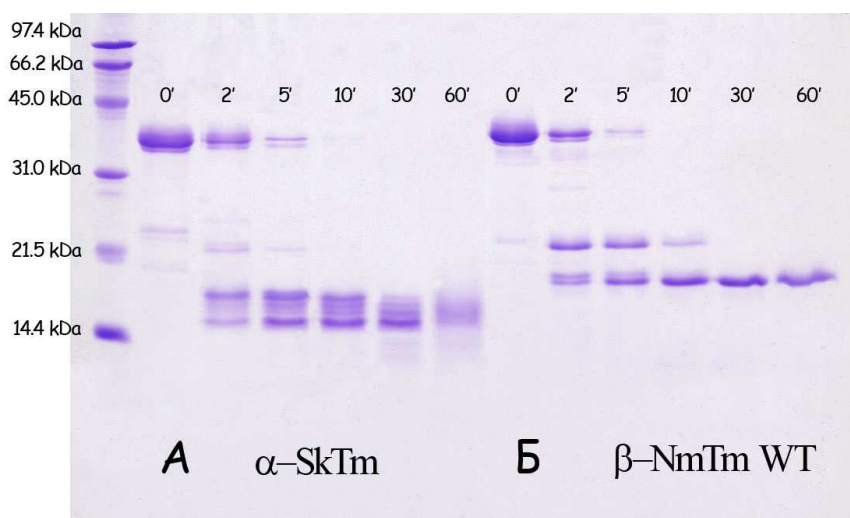


**Рис. 11.** Сопоставление кривых ДСК для  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G (черные кривые) с первыми производными температурных зависимостей эксимерной флуоресценции пиреновой метки (кривые на рис. 10). Отдельные калориметрические домены, полученные в результате деконволюции кривых ДСК, обозначены красным пунктиром, а первые производные температурных зависимостей эксимерной флуоресценции пиреновой метки – синим цветом.

Это предположение было проверено нами для случая скелетного  $\alpha$ -тропомиозина ( $\alpha$ -SkTm). Этот белок демонстрирует на кривой ДСК два тепловых перехода с примерно равными энтальпиями, соответствующие двум половинам молекулы [Williams & Svenson, 1981; Kremneva et al., 2004]. Мы поместили пирен-иодацетамидом остаток Cys-190,

находящийся в С-концевом домене, и наблюдали полное совпадение формы и максимумов кривой первой производной температурной зависимости эксимерной флуоресценции и перехода на кривой ДСК, соответствующего С-концевому домену (данные не представлены). Таким образом, внутренняя кооперативность в участках молекул исследованных тропомиозинов, соответствующих отдельным тепловым переходам на кривой ДСК, действительно существует. Такая кооперативность, вероятно, предусматривает наличие коммуникации или непосредственного контакта между участниками кооперативной единицы, но остается совершенно непонятным, как это может реализоваться в случае линейной молекулы тропомиозина.

Для того, чтобы проверить предположение о том, что в молекуле  $\beta$ -тропомиозина существуют некая структурная неоднородность – а именно, присутствуют два кооперативных блока, плавление которых соответствует двум отдельным переходам на кривой ДСК (как в случае  $\beta$ -NmTm WT, так и в  $\beta$ -NmTm R91G), мы решили поставить эксперименты по трипсинолизу  $\beta$ -тропомиозина. Отметим, что в молекулах всех изоформ тропомиозинов присутствует большое количество сайтов расщепления трипсином, однако реально доступны для действия протеазы лишь те участки, где  $\alpha$ -спираль существенно дестабилизирована [Anfinsen & Scheraga, 1975]. Таким образом, применение метода ограниченного трипсинолиза в случае тропомиозина позволяет «сканировать» молекулу на наличие локальных участков дестабилизации. Полученные результаты показывают, что в случае  $\beta$ -NmTm WT при температуре 25°C в диапазоне соотношения трипсин/тропомиозин от 1/1000 до 1/100 на начальных этапах трипсинолиза (первые 5–10 мин) образуются два мажорных фрагмента с кажущимися молекулярными массами 20 кДа и 17,5 кДа (рис. 12Б). Данные фрагменты различаются по своей устойчивости к действию протеазы – наименее стабилен более тяжелый из них (20 кДа), который почти полностью расщепляется уже на 10-й минуте реакции при соотношении трипсин/Tm, равном 1/300. Далее мы решили сравнить характер расщепления трипсином  $\beta$ -NmTm WT и скелетного  $\alpha$ -тропомиозина ( $\alpha$ -SkTm), трипсинолиз которого был ранее подробно изучен Уено [Ueno, 1984] и в группе С. Лерера [Sumida et al., 2007]. Результаты эксперимента показывают, что в результате трипсинолиза обеих изоформ тропомиозина на начальных этапах образуются два мажорных фрагмента, которые различаются по своим электрофоретическим подвижностям. Если при расщеплении  $\beta$ -NmTm WT, как указано выше, образуются фрагменты 20 кДа и 17,5 кДа (рис. 12Б), то в результате трипсинолиза  $\alpha$ -SkTm по нашим данным (и по данным Лерера) образуются фрагменты 17 кДа и 15 кДа (Рис. 12А).

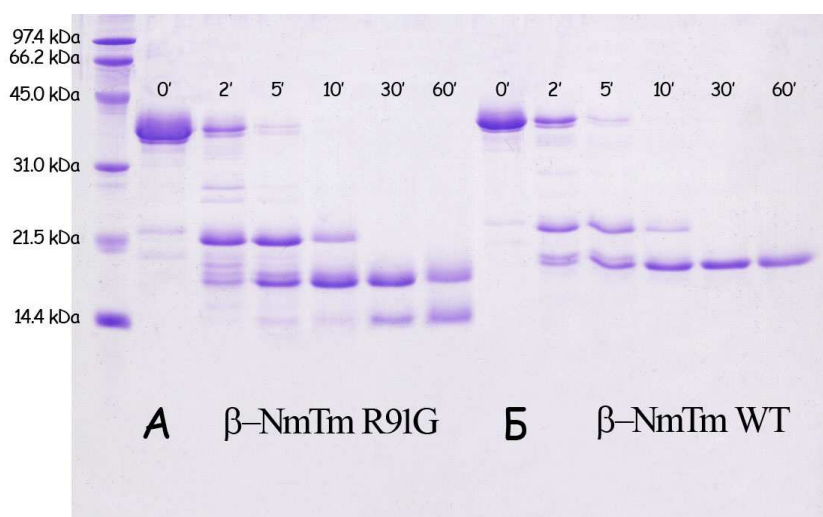


**Рис. 12.** Трипсинолиз  $\alpha$ -SkTm (A) и  $\beta$ -NmTm дикого типа (Б) при весовом соотношении трипсин/тропомиозин, равном 1/300. Представлены электрофореграммы 16%-х полиакриламидных гелей после электрофореза по методу Лэммли. Цифры над дорожками обозначают время инкубации (мин) при 25°C.

Это очевидное противоречие кажется странным – с учетом того, что между  $\alpha$ -SkTm и  $\beta$ -NmTm WT имеется 85%-ая гомология по первичной структуре. Из литературы известно [Sumida et al., 2007], что в случае  $\alpha$ -SkTm участок начального расщепления трипсином располагается после остатка Arg133. В непосредственной близости находится высококонсервативный остаток Asp137, который занимает *d*-положение в гептадной структуре и, таким образом, локально дестабилизирует гидрофобный кор двойной спирали coiled-coil, что влечет за собой дестабилизацию входящих в его состав  $\alpha$ -спиралей и приводит к повышению доступности для трипсинолиза расположенного рядом сайта. В молекуле  $\beta$ -тропомиозина этот участок молекулы обладает аналогичной структурой, но, тем не менее, образующиеся в результате трипсинолиза фрагменты имеют электрофоретические подвижности, отличные от ожидаемых. Можно предложить по крайней мере два объяснения этому феномену. Во-первых, в результате трипсинолиза как  $\alpha$ -SkTm, так и  $\beta$ -NmTm WT могут образовываться одинаковые фрагменты, однако в случае  $\beta$ -NmTm WT они обладают аномальной электрофоретической подвижностью. Второй вариант предусматривает существование в молекуле  $\beta$ -NmTm WT иного сайта расщепления трипсином, более доступного, чем в случае  $\alpha$ -SkTm. Для того, чтобы установить конкретную причину различий характера трипсинолиза  $\beta$ -NmTm WT и  $\alpha$ -SkTm, необходимо идентифицировать фрагменты, образующиеся в результате трипсинолиза  $\beta$ -NmTm WT (например, с помощью масс-спектрометрического анализа), что нам пока сделать не удалось. Несмотря на очевидную нехватку достаточного количества данных, уже на данном этапе исследования можно сделать вывод, что

структура  $\beta$ -NmTm WT (а точнее, его гидрофобного кора) неоднородна. В центральной части молекулы существует район локальной дестабилизации двойной спирали, что повышает скорость расщепления трипсином по этому участку. Мажорными продуктами такого расщепления являются два фрагмента с сопоставимыми электрофоретическими подвижностями, что согласуется с разложением кривой ДСК на два главных калориметрических домена.

Далее мы изучили влияние мутации R91G на характер трипсинолиза  $\beta$ -NmTm (рис. 13). Реакцию проводили при температуре 25°C, которая приблизительно соответствует максимуму низкотемпературного перехода на кривой ДСК для  $\beta$ -NmTm R91G (рис. 7Б). На ранних этапах расщепления как мутантного белка, так и белка дикого типа образуются фрагменты с близкими электрофоретическими подвижностями. Однако позднее (~ на 10-й минуте протеолиза при соотношении трипсин/ $\beta$ -NmTm = 1/100) в случае  $\beta$ -NmTm R91G (рис. 13А) образуется новый фрагмент с кажущейся молекулярной массой 14 кДа. Отметим, что образование подобного фрагмента не наблюдалось при трипсинолизе белка дикого типа (рис. 13Б) – даже при более высоких соотношениях трипсин/тропомиозин (вплоть до 1/100) и при более длительной инкубации (до 90 мин). Таким образом, мутация R91G оказывает существенное влияние на характер трипсинолиза  $\beta$ -NmTm. Видимо, локальная дестабилизация  $\alpha$ -спирали в районе мутации вызывает увеличение доступности расположенных поблизости участков для расщепления трипсином.



**Рис. 13.** Трипсинолиз  $\beta$ -NmTm R91G (А) и  $\beta$ -NmTm дикого типа (Б) при весовом соотношении трипсин/тропомиозин, равном 1/300. Представлены электрофореграммы 16%-х полиакриламидных гелей после электрофореза по методу Лэммли. Цифры над дорожками обозначают время инкубации (мин) при 25°C.

Завершая этот раздел, следует отметить главное: мутация R91G самым драматическим образом изменяет структуру молекулы  $\beta$ -NmTm, резко снижая термостабильность всей ее N-концевой части и открывая в ней новые участки для протеолиза трипсином.

***Свойства немышечного  $\beta$ -тропомиозина дикого типа и с мутацией R91G в комплексе с F-актином.***

*Тепловая денатурация  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G в присутствии F-актина*

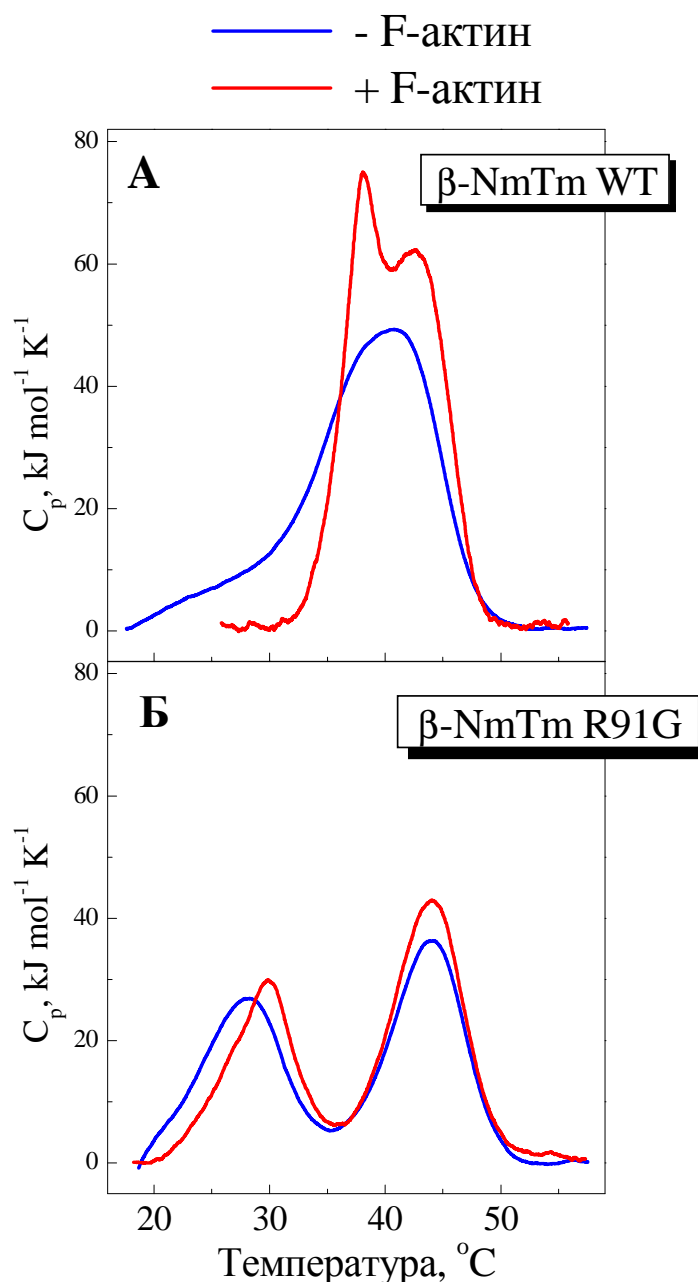
На рис. 14 изображены кривые ДСК, полученные для комплексов F-актина с  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G. Видно, что в случае  $\beta$ -тропомиозина дикого типа в присутствии актина на термограмме появляется новый пик (рис. 14А). Температура максимума этого пика ( $T_{AT} = 38^\circ\text{C}$ ) коррелирует с температурой диссоциации  $T_{diss}$  ( $37,2^\circ\text{C}$ ), т.е. с температурой полуперехода на кривой диссоциации комплексов  $\beta$ -Tm–F-актин, определенной при измерениях температурных зависимостей светорассеяния (рис. 15, зеленая кривая).

Появление нового пика на кривой ДСК хорошо объясняется с позиций механизма тепловой денатурации тропомиозина в присутствии F-актина [*Kremneva et al., 2004; Левицкий, 2004б*]. До диссоциации тропомиозина с поверхности актинового филамента он неспособен денатурировать. Когда происходит диссоциация (с полупереходом при  $37,2^\circ\text{C}$ ), менее термостабильная часть молекулы тропомиозина быстро плавится в узком температурном диапазоне диссоциации. Другая, более термостабильная часть, которая плавится при температурах выше  $T_{diss}$ , при этом денатурирует независимо от наличия актина в системе. Таким образом, новый калориметрический пик, появляющийся на кривой ДСК в присутствии актина, соответствует тепловой денатурации той (не слишком значительной) части N-концевой половины молекулы NmTm WT, которая в отсутствие актина плавится при температурах ниже  $T_{diss}$ .

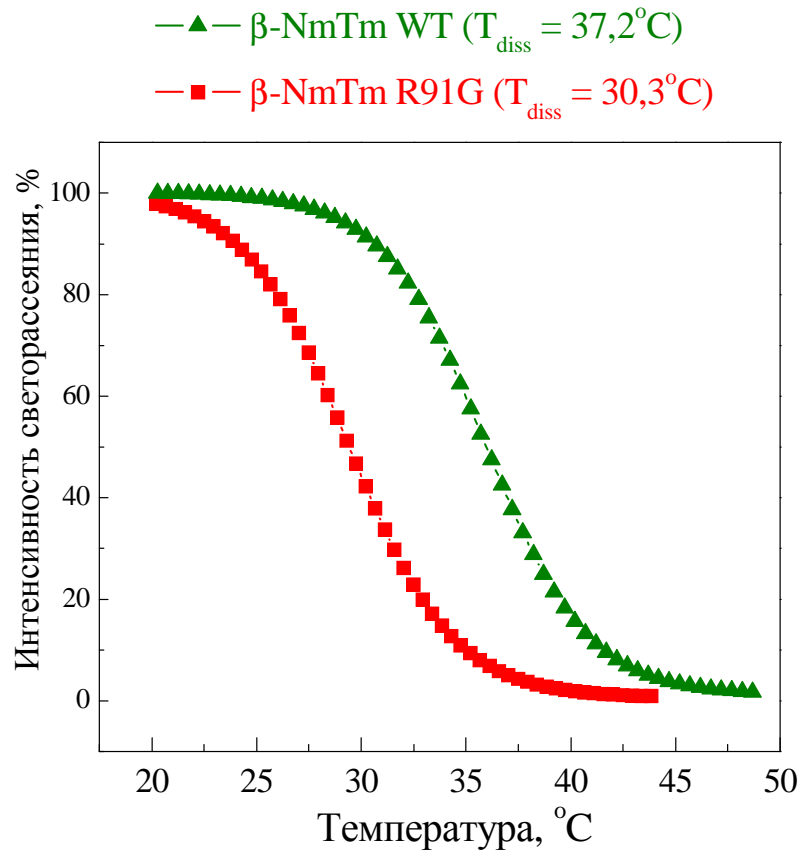
В случае  $\beta$ -NmTm R91G нами не было замечено какого-либо существенного влияния F-актина на тепловую денатурацию этого мутантного белка (рис. 14Б). Термограммы, полученные в присутствии и в отсутствие F-актина в системе, были почти полностью идентичны; наблюдалось лишь очень незначительное смещение (всего на  $1-1,5^\circ\text{C}$ ) термолабильного перехода в сторону более высокой температуры (рис. 14Б). Этот факт можно объяснить, анализируя результаты экспериментов по температурным зависимостям светорассеяния (рис. 15), которые демонстрируют, что мутантный



тропомиозин диссоциирует с поверхности актинового филамента при очень низкой температуре ( $T_{\text{diss}} = 30,3^{\circ}\text{C}$ ), т.е. до начала его собственной денатурации в отсутствие актина.



**Рис. 14.** Тепловая денатурация комплексов  $\beta\text{-NmTm w.t.}$  (А) и  $\beta\text{-NmTm R91G}$  (Б) с F-актином, стабилизированным фаллоидином (красные кривые). Диапазон температур выше  $65^{\circ}\text{C}$ , в котором происходит тепловая денатурация стабилизированного фаллоидином F-актина, не показан. Синие кривые соответствуют тепловой денатурации свободного тропомиозина. Они были получены в ходе повторного прогрева тех же образцов, следовавшего после прогрева до  $90^{\circ}\text{C}$  и охлаждения до  $5^{\circ}\text{C}$ , т.е. после полной необратимой денатурации F-актина. Концентрация всех тропомиозинов составляла  $10 \mu\text{M}$ . Концентрации остальных компонентов:  $46 \mu\text{M}$  F-актин,  $70 \mu\text{M}$  фаллоидин,  $30 \text{ mM}$  Hepes,  $100 \text{ mM}$  KCl,  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  и  $1 \text{ mM}$   $\beta\text{-ME}$ , pH 7,3. Скорость нагрева  $1 \text{ K/мин}$ .



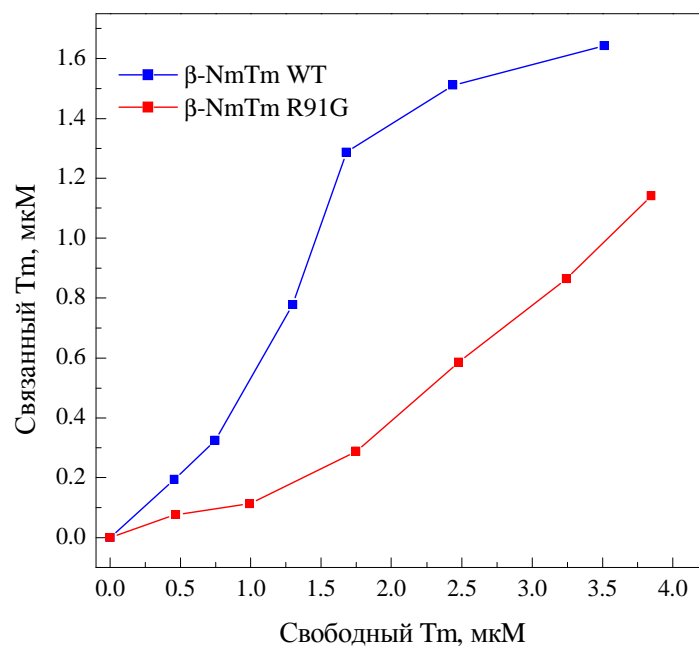
**Рис. 15.** Нормализованные температурные зависимости светорассеяния для комплексов  $\beta$ -NmTm w.t. и  $\beta$ -NmTm R91G с F-актином, стабилизированным фаллоидином. Падение светорассеяния отражает диссоциацию данных комплексов. За 100% принята разница в светорассеянии при  $25^{\circ}\text{C}$  между комплексами Tm–F-актин и чистым F-актином, стабилизированным фаллоидином. Условия совпадают с условиями эксперимента по ДСК, представленного на рис. 14. Скорость нагрева  $1\text{ K/мин}$ .  $T_{\text{diss}}$  – температура полумаксимальной диссоциации комплекса тропомиозина с F-актином, т.е. температура, при которой снижение светорассеяния составляет 50%.

*Температурные зависимости диссоциации комплексов  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G с F-актином.*

На рис. 15 изображены температурные зависимости светорассеяния для комплексов F-актина с  $\beta$ -NmTm WT и его мутантом  $\beta$ -NmTm R91G. Уменьшение светорассеяния отражает распад комплексов, т.е. диссоциацию тропомиозина с поверхности актинового филамента.

Мутантный  $\beta$ -тропомиозин  $\beta$ -NmTm R91G диссоциирует с поверхности F-актина при значительно более низких температурах ( $T_{\text{diss}} = 30,3^{\circ}\text{C}$ ), чем тропомиозин дикого типа ( $T_{\text{diss}} = 37,2^{\circ}\text{C}$ ) (рис. 15). Таким образом, наличие мутации существенно снижает температуру диссоциации тропомиозина с поверхности актинового филамента и, следовательно, энергию их взаимодействия. Это наводит на мысль о том, что по сравнению с  $\beta$ -NmTm WT,  $\beta$ -тропомиозин, несущий мутацию R91G, связан с F-актином

довольно слабо. Для проверки этого предположения мы поставили эксперимент по соосаждению  $\beta$ -тропомиозина с актиновыми филаментами. Эксперимент основывается на том, что F-актин полностью осаждается при ультрацентрифугировании на скоростях 100000–120000 g. Следовательно, белки, взаимодействующие с актином (например, тропомиозин), также оказываются в осадке. Варьируя концентрации тропомиозина при постоянной концентрации актина можно получить зависимость количества связанного с актином тропомиозина (т.е. того, который обнаруживается в осадке) от количества свободного тропомиозина, остающегося в супернатанте. Подобные кривые для  $\beta$ -NmTm w.t. (синие) и  $\beta$ -NmTm R91G (красные) представлены на рис. 16. Заметим, что полученные нами данные по различию в сродстве к актину между  $\beta$ -NmTm w.t. и  $\beta$ -NmTm R91G хорошо согласуются с результатами, полученными в группе Ч. Редвуда [Robinson et al., 2007].



**Рис. 16.** Сродство  $\beta$ -NmTm w.t. и  $\beta$ -NmTm R91G к F-актину. F-актин (10  $\mu$ M) смешивали с Tm (0–5  $\mu$ M) в стандартном буфере (30 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM  $\beta$ -ME, pH 7.3) до конечного объема 100  $\mu$ l. Далее пробы, содержащие актин и определенные концентрации Tm, центрифугировали при 100000 g в течение 30 мин. Осадок растворяли в исходном объеме буфера для образцов (см. «Материалы и методы»). Анализ количества белка в супернатанте и осадке проводили при помощи SDS-электрофореза. Сродство Tm к F-актину выражено в виде зависимости доли Tm, обнаруживаемой в осадке F-актина после соосаждения, от концентрации свободного Tm, остающегося в супернатанте после центрифугирования.

Ранее в экспериментах на комплексах  $\alpha\beta$ -гетеродимеров гладкомышечного Tm с F-актином было установлено, что величина  $T_{diss}$  (и, соответственно, величина  $T_{AT}$ , т.е. температура максимума нового пика, появляющегося на кривой ДСК в присутствии F-

актина) сильно зависит от молярного отношения Т<sub>м</sub>/актин, заметно увеличиваясь при повышении этого соотношения [Levitsky *et al.*, 2000]. Таким образом, резкое снижение Т<sub>diss</sub>, вызываемое мутацией R91G в β-NmTm (рис. 15), легко объясняется снижением сродства β-NmTm к F-актину в результате этой мутации (рис. 16). В идентичных условиях (при равных концентрациях β-NmTm w.t. и β-NmTm R91G) с F-актином связано меньше мутантного белка, чем белка дикого типа. В результате β-NmTm R91G диссоциирует с поверхности актинового филамента при значительно более низких температурах, чем β-NmTm w.t. (рис. 15), и его диссоциация при столь низкой температуре (Т<sub>diss</sub> = 30,3°C), сравнимой с температурой денатурации самого термолabileного домена 1+2 в молекуле свободного β-NmTm R91G (Т<sub>м</sub> = 27,8°C) (рис. 7Б, табл. 1), приводит лишь к очень незначительному (всего на 1–1.5°C) повышению термостабильности этого домена, отражающего плавление N-концевой части молекулы β-NmTm R91G (рис. 14Б).

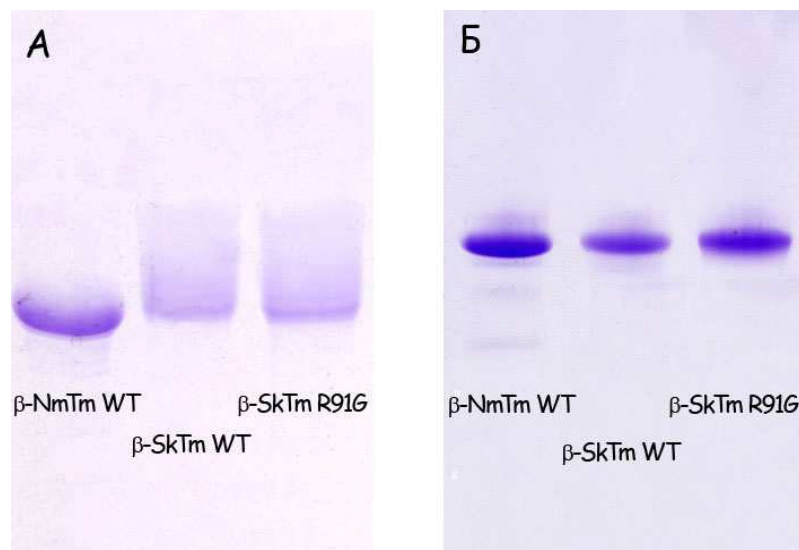
Подводя итоги этой части работы, посвященной изучению влияния мутации R91G на структуру и свойства немышечного/гладкомышечного β-Tm, важно отметить следующее. Эта мутация оказывает очень сильное влияние на структуру N-концевой части молекулы β-NmTm, резко снижая ее термостабильность, что, в свою очередь, приводит к значительному снижению сродства β-NmTm к F-актину и существенно изменяет, судя по всему, характер взаимодействия этого белка с актиновыми филаментами.

### **Скелетный β-тропомиозин (β-SkTm).**

Итак, как следует из предыдущей части, мутация R91G вызывает драматические изменения в структуре немышечного (гладкомышечного) β-тропомиозина. Из литературы [Robinson *et al.*, 2005] следует, что дистальный артрогрипоз, вызываемый в том числе мутацией R91G в гене β-тропомиозина, характеризуется значительными морфологическими изменениями в структуре скелета конечностей, а также контрактурами (высокой сократительной активностью) мышц. Ранее Ч. Редвудом и соавторами [Robinson *et al.*, 2005] было показано, что присутствие мутантного тропомиозина β-NmTm R91G в составе реконструированного тонкого филамента, по сравнению с β-NmTm WT, увеличивает активность актин-активируемой АТФазы миозина в диапазоне концентрации кальция от 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-5</sup> М. Это, по мнению авторов, может обуславливать деформацию скелета конечностей в процессе эмбриогенеза на более ранних этапах, чем дифференциация поперечно-полосатой мускулатуры. Именно поэтому важно было исследовать структурные свойства высокомолекулярного немышечного β-тропомиозина (β-NmTm). На следующем этапе работы нами были исследованы свойства скелетномышечной изоформы β-тропомиозина (β-SkTm, см. рис. 2) и влияние на них мутации R91G, поскольку дистальный артрогрипоз проявляется и в зрелом возрасте.

**Некоторые трудности, возникшие при работе с  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G.**

Необходимо отметить, что работа с имевшимися у нас препаратами лиофилизированного  $\beta$ -SkTm и его мутанта  $\beta$ -SkTm R91G была осложнена целым рядом обстоятельств. Во-первых, это присутствие в полипептидной цепи  $\beta$ -SkTm двух остатков цистеина (Cys-36 и Cys-190), что делает невозможным стереоспецифичное мечение белка флуоресцентной меткой. Во-вторых, заметные трудности возникли при определении концентрации белка. Дело в том, что после растворения лиофилизированного препарата в стандартном буфере (30 mM Hepes, pH 7,3, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) и последующего диализа против того же буфера, раствор белка показывал заметное светорассеяние на спектрах поглощения (оптическая плотность при 360 нм составляла 15–20 % от поглощения белка на 280 нм). Это предполагало наличие агрегатов белка в растворе, поэтому было решено определить концентрацию с помощью электрофореза по методу Лэммли, сопоставляя оптические плотности пятен  $\beta$ -SkTm и  $\beta$ -NmTm, концентрация которого известна. Однако как  $\beta$ -SkTm WT, так и  $\beta$ -SkTm R91G показывали аномальное поведение при электрофорезе (рис. 17А), демонстрируя отсутствие способности концентрироваться в виде узкой зоны, как это делают большинство белков, в том числе  $\beta$ -NmTm.



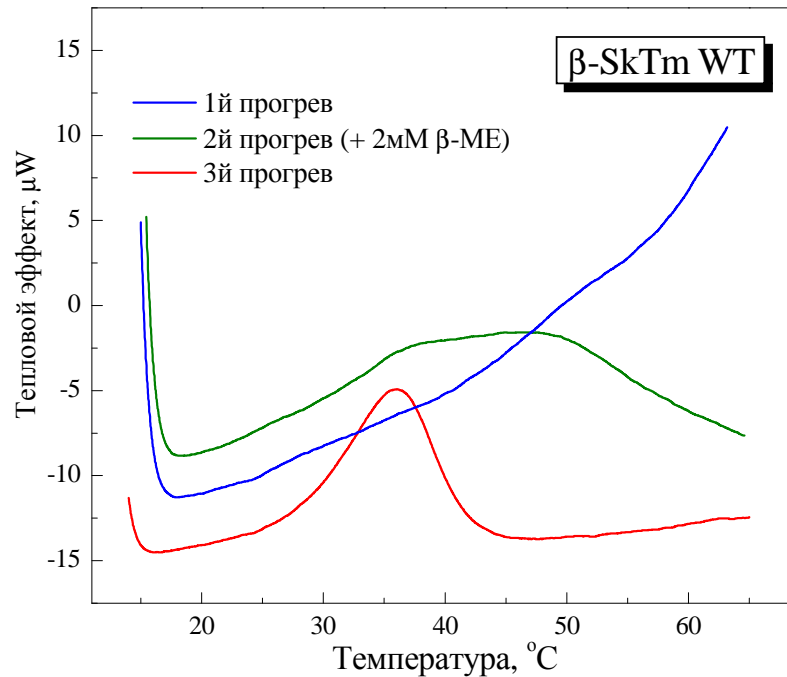
**Рис. 17.** Электрофореграммы полиакриламидных гелей (16%), полученные для различных препаратов тропомиозина ( $\beta$ -NmTm WT,  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G) после SDS-электрофореза по методу Лэммли в отсутствие мочевины (А) и в присутствии 6 М мочевины (Б). Подробнее см. в тексте.

Данный артефакт не устранялся при проведении электрофореза в градиентных гелях (6–20 % и 10–17 %). Добиться существенного концентрирования пятен  $\beta$ -SkTm WT

и  $\beta$ -SkTm R91G удалось только после добавления в концентрирующий и в разделяющий гели мочевины в концентрации 6 М (рис. 17Б). Следует отметить, что в этих условиях (в присутствии мочевины) заметно снижалась электрофоретическая подвижность белков, причем все исследованные препараты  $\beta$ -тропомиозина (как  $\beta$ -NmTm, так и  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G) мигрировали с одинаковой скоростью (рис. 17Б). Таким образом, мы предположили присутствие в препарате лиофилизированного белка агрегатов, которые не разрушаются при кипячении в 2% SDS в присутствии избытка  $\beta$ -МЕ, но солюбилизируются в 6 М мочевины.

После подбора условий электрофореза мы решили изучить термические свойства лиофилизированного препарата белка с помощью метода ДСК. При этом на первом прогреве на термограмме не наблюдалось никаких тепловых переходов: полученная кривая ДСК (синяя кривая на рис. 18) практически не отличалась от базовой линии буфера. Отметим, что  $\alpha$ -SkTm без всякой предварительной подготовки (например, восстановления) всегда демонстрировал кооперативные тепловые переходы на кривой ДСК [Kremneva et al., 2004]. Поэтому мы решили провести процедуру восстановления  $\beta$ -SkTm прямо в процессе калориметрического эксперимента. Сразу после первого прогрева  $\beta$ -SkTm WT (синяя кривая на рис. 18) и последующего охлаждения белок извлекли из измерительной ячейки калориметра, добавили к нему  $\beta$ -МЕ до конечной концентрации 2 мМ и снова загрузили в ячейку прибора. Второй и третий прогревы данного препарата приведены на рис. 18. Видно, что после восстановления, которое происходило в процессе второго прогрева (зеленая кривая на рис. 18), при третьем прогреве (красная кривая на рис. 18) на термограмме появляется хорошо выраженный пик, соответствующий тепловой денатурации  $\beta$ -SkTm WT, который полностью воспроизводится и при четвертом прогреве образца (не показан). Исходя из этого, мы заключили, что в лиофилизированном препарате белок находится в состоянии, далеком от нативного (возможно, денатурированном). При обработке  $\beta$ -меркаптоэтанолом наблюдается полное или частичное восстановление структуры  $\beta$ -SkTm WT, благодаря чему появляется кооперативный пик на кривой ДСК (рис. 18). Отметим, что в литературе имеются сведения [Константино и соавт., 1998] о том, что в ходе лиофилизации при нейтральных и щелочных рН (в нашем случае это рН 7,3) может наблюдаться агрегация белка вследствие образования межмолекулярных дисульфидных связей. Таким образом, мы предполагаем, что в процессе лиофилизации имеющегося у нас препарата  $\beta$ -SkTm произошло его повреждение – образование межмолекулярных кросс-сшивков дисульфидными связями, вследствие чего белок утратил нативность (агрегировал и, возможно, денатурировал), что видно на кривой ДСК, полученной при первом прогреве

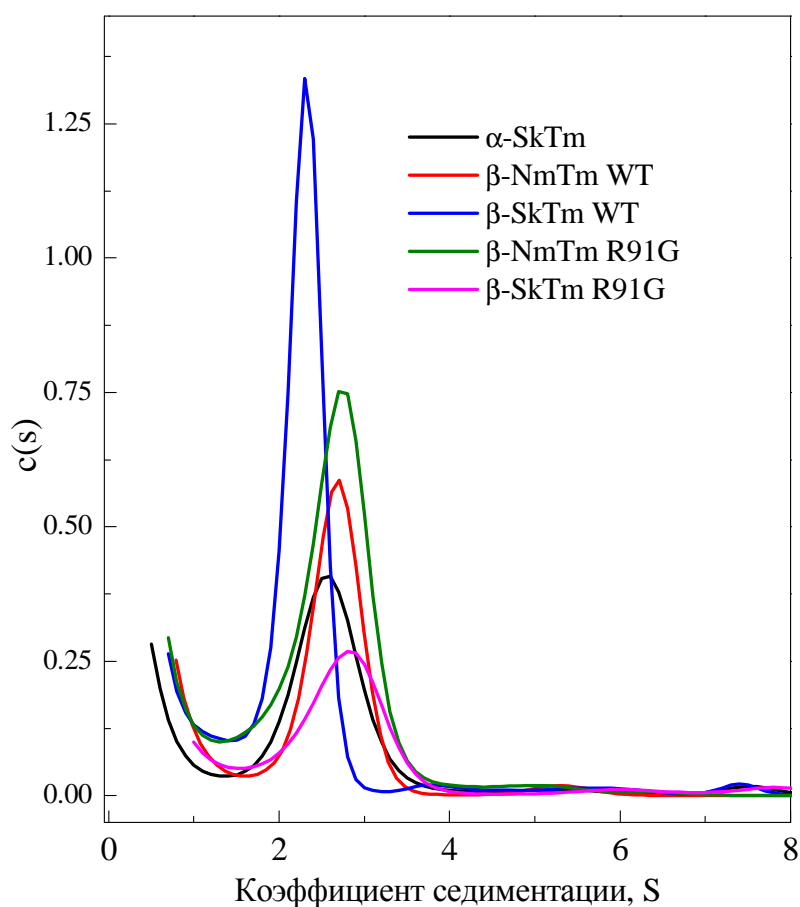
образца (рис. 18). Косвенным подтверждением этого является то, что при работе с лиофилизированными препаратами других тропомиозинов (например,  $\alpha$ -SkTm), имеющих в своем составе только один остаток цистеина (Cys-190), никогда не наблюдалось наличие подобных артефактов на кривых ДСК.



**Рис. 18.** Кривые ДСК, полученные при трех последовательных прогревах препарата  $\beta$ -SkTm WT, не подвергавшегося предварительной обработке (восстановлению). После первого прогрева препарата (синяя кривая) и последующего охлаждения белок извлекли из измерительной ячейки калориметра, добавили к нему  $\beta$ -МЕ до конечной концентрации 2 мМ и вновь загрузили в ячейку прибора. Зеленая и красная кривые соответствуют двум последующим прогревам данного препарата. Концентрация белка составляла 30 мкМ. Прочие условия: 30 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,3. Скорость нагрева 1 К/мин. Подробнее см. в тексте.

Предположение о наличии агрегатов в лиофилизированном препарате  $\beta$ -SkTm не согласуется с его аномальным поведением при электрофорезе (рис. 17А), поскольку при подготовке проб проводилось их восстановление путем кипячения в присутствии избытка  $\beta$ -МЕ, что по идее должно было приводить к восстановлению межмолекулярных дисульфидных связей и солюбилизации агрегатов. Для того, чтобы разрешить это противоречие, мы решили сравнить седиментационные свойства восстановленных препаратов  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G с изученными ранее свойствами препаратов  $\beta$ -NmTm и  $\alpha$ -SkTm, применив для этих целей метод аналитического ультрацентрифугирования. Полученные данные (распределения коэффициентов седиментации для всех исследованных препаратов тропомиозина в восстановленном

состоянии) приведены на рис. 19. Все препараты седиментировали в диапазоне от 2 S до 4 S со средним значением коэффициента седиментации от 2,3 S до 2,8 S. Важно отметить полное отсутствие более тяжелых фракций, наличие которых явно предполагалось в случае агрегации  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G (рис. 19). Следовательно, если в исходном препарате действительно присутствуют агрегаты белка, то обработка  $\beta$ -МЕ вызывает их сольubilизацию. Таким образом, аномальное поведение  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G при SDS-электрофорезе в отсутствие мочевины (рис. 17A) объясняется исключительно свойствами самого белка и никак не связано с его агрегацией.



**Рис. 19.** Анализ скоростной седиментации различных препаратов тропомиозина. Приведены распределения коэффициентов седиментации  $c(s)$ , полученных в экспериментах по аналитическому ультрацентрифугированию при скорости ротора 52000 об/мин. Концентрация белка составляла 1 мг/мл. Прочие условия: 30 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,3.

В дальнейших экспериментах с  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G было решено восстанавливать сульфгидрильные группы этих белков с помощью  $\beta$ -МЕ. Соответственно,

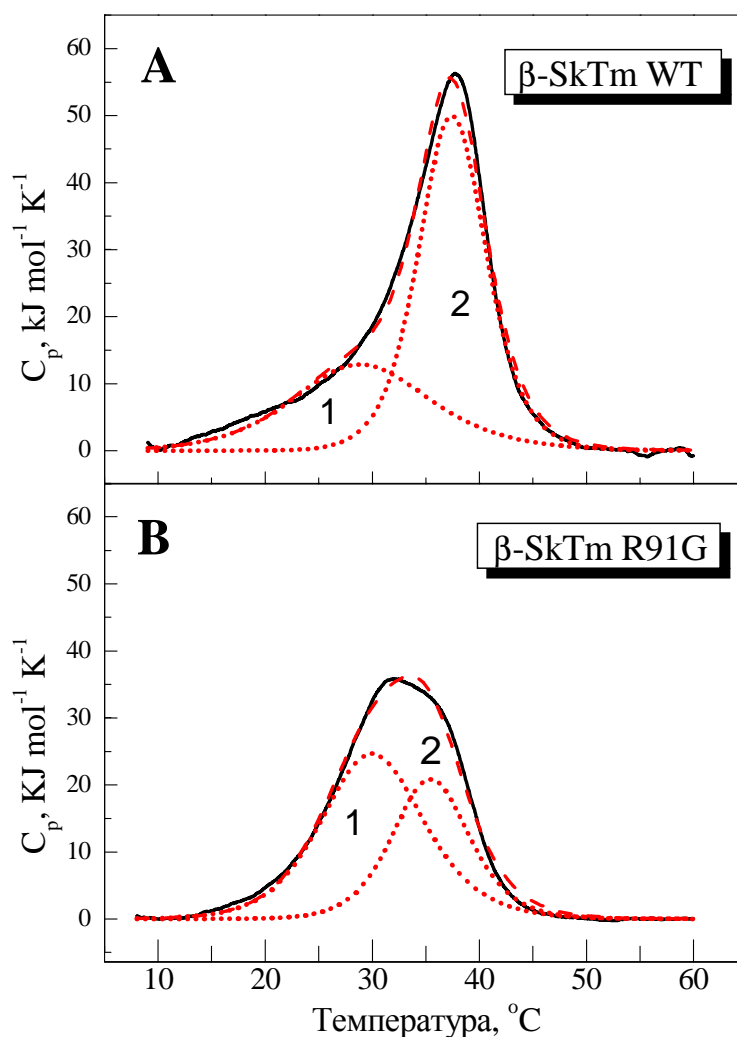


все приведенные ниже данные были получены с использованием полностью восстановленных препаратов  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G. Важно отметить, что  $\beta$ -МЕ при взаимодействии с белком может образовывать смешанные дисульфиды, что, в принципе, может оказывать влияние на структуру исследуемого белка. Для проверки этого предположения мы провели восстановление SH-групп в молекуле  $\beta$ -SkTm WT при помощи DTT, который не образует смешанных дисульфидов, а затем сравнили кривые ДСК для  $\beta$ -SkTm WT, восстановленного при помощи DTT, с кривыми, полученными после восстановления  $\beta$ -SkTm WT при помощи  $\beta$ -МЕ. Кривые ДСК для  $\beta$ -SkTm WT, восстановленного обоими этими способами, были практически идентичны. Таким образом, если  $\beta$ -МЕ и образует смешанные дисульфиды при восстановлении  $\beta$ -SkTm, то это не оказывает заметного влияния на тепловую денатурацию белка. Поэтому во всех описанных ниже экспериментах использовались препараты  $\beta$ -SkTm, восстановленные при помощи  $\beta$ -МЕ.

### ***Исследование тепловой денатурации свободных $\beta$ -SkTm WT и $\beta$ -SkTm R91G.***

Тепловая денатурация  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G была изучена нами с помощью методов ДСК и КД на полностью восстановленных препаратах белка.

Кривые ДСК для  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G представлены на рис. 20. После вычитания химической базовой линии кривые ДСК, как и в случае  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G, подвергались деконволюции – разложению на некоторое количество одностадийных обратимых переходов, соответствующих плавлению отдельных кооперативных участков в молекуле (так называемых калориметрических доменов). Экспериментальная кривая ДСК для  $\beta$ -SkTm WT была разложена на 2 калориметрических домена (домены **1** и **2** на рис. 20А), чьи энтальпии составляют 34% и 67% от общей  $\Delta H_{cal}$ , соответственно (Таблица 2). Следует отметить, что в случае  $\beta$ -SkTm WT наблюдается существенная некооперативная денатурация в низкотемпературной области (рис. 20А), подобная той, которая наблюдалась в случае  $\beta$ -NmTm WT (переход, обозначенный цифрой «1» на рис. 7А). Природа этого перехода обсуждалась выше, при анализе тепловой денатурации  $\beta$ -NmTm WT (рис. 7А). Отметим также, что домен **2** на кривой ДСК для  $\beta$ -SkTm WT сопоставим по температуре максимума соответствующего ему перехода с таковой для домена **2** в  $\beta$ -NmTm WT (рис. 7А), идентифицированного нами как N-концевой сегмент молекулы.



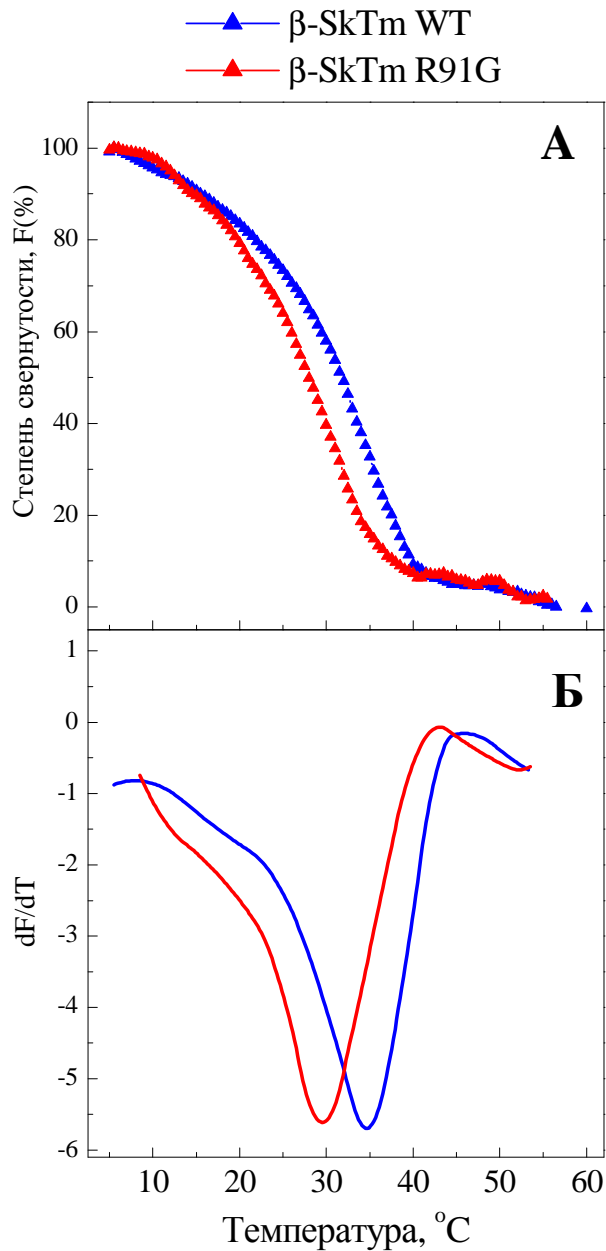
**Рис. 20.** Разложение кривых ДСК для  $\beta\text{-SkTm w.t.}$  (А) и  $\beta\text{-SkTm R91G}$  (Б) на обособленные тепловые переходы, соответствующие отдельным калориметрическим доменам в молекуле тропомиозина. Концентрация белков составляла 30 мкМ. Концентрации остальных компонентов: 30 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,3. Скорость нагрева 1 К/мин. Кривые были проанализированы в соответствии с моделью обратимого одностадийного перехода каждого калориметрического домена. Черные линии представляют собой экспериментальные кривые после вычитания инструментальной и химической базовых линий. Красной прерывистой линией показаны отдельные калориметрические переходы, соответствующие доменам 1 и 2.

**Таблица 2.** Калориметрические характеристики отдельных доменов, полученных при разложении кривых ДСК для  $\beta\text{-SkTm w.t.}$  и  $\beta\text{-SkTm R91G}$  на индивидуальные тепловые переходы (рис. 20).

$\beta\text{-SkTm}$	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H_{\text{cal}}$ (kJ/mol)
<b><math>\beta\text{-SkTm w.t.}</math></b>		
Домен 1	29,1	215
Домен 2	37,5	420
<b><math>\beta\text{-SkTm R91G}</math></b>		
Домен 1	29,3	315
Домен 2	35,4	200

В случае  $\beta$ -SkTm R91G с помощью деконволюционного анализа кривая ДСК была разложена на 2 перехода, **1** и **2**, чьи энтальпии составляют 61% и 39% от общего значения  $\Delta H_{cal}$ , соответственно (рис. 20Б, таблица 2). Отметим, что значения температуры перехода домена **2** сопоставимы у  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G (37,5°C и 35,4°C, соответственно), но калориметрическая энтальпия этого домена в случае  $\beta$ -SkTm R91G вдвое ниже, чем у  $\beta$ -SkTm WT (рис. 20, таблица 2). Домен **1** в случае  $\beta$ -SkTm R91G имеет температуру максимума при 29,3°C, что сопоставимо с температурой максимума индуцированного мутацией низкотемпературного перехода на кривой ДСК для  $\beta$ -NmTm R91G (переход 1+2 с максимумом при 27,8°C на рис. 7Б). Исходя из этих предпосылок, мы можем предложить следующую интерпретацию природы калориметрических доменов на кривой ДСК для  $\beta$ -SkTm WT (рис. 20А). В случае  $\beta$ -SkTm WT домен **2** представляет собой сумму двух перекрывающихся тепловых переходов, обладающих одинаковой термостабильностью и соответствующих N-концевому и С-концевому доменам молекулы. N-концевой домен  $\beta$ -NmTm WT (домен 2 на рис. 7А) и аналогичный домен в составе  $\beta$ -SkTm WT (соответствующий ему переход является частью перехода **2** на рис. 20А) плавятся при одинаковых температурах (38,1 и 37,5°C, соответственно). Это согласуется с тем фактом, что молекулы  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -NmTm WT обладают полностью идентичной первичной структурой вплоть до аминокислотного остатка Ser-188, и все различия между ними относятся к С-концевой части молекулы (из-за альтернативного сплайсинга экзонов **6** и **9**, см. рис. 2 в «Обзоре литературы»). Таким образом, мы логично приходим к тому, что термостабильность С-концевого домена в молекуле  $\beta$ -SkTm WT (составляющего часть перехода 2 при 37,5°C на рис. 20А) ниже, чем у  $\beta$ -NmTm WT (домен 3 при 42,8°C на рис. 7А). В результате этот С-концевой домен в молекуле  $\beta$ -SkTm WT совмещается по положению на термограмме ДСК с N-концевым доменом **2**, одинаковым для обеих изоформ  $\beta$ -Tm, и совмещение этих доменов дает в результате единый тепловой переход с максимумом при 37,5°C и высокой энтальпией. В пользу такой интерпретации свидетельствуют данные о том, что замена участка в С-концевой половине молекулы тропомиозина, кодируемого немышечным экзоном **6a**, на участок, кодируемый скелетномышечным экзоном **6b**, приводит к заметному снижению термостабильности всей С-концевой части молекулы тропомиозина [Maytum et al., 2004; Kremneva et al., 2006]. Что же касается калориметрического домена **1** на кривой ДСК для  $\beta$ -SkTm WT, то он отражает, скорее всего, денатурацию некоторых нестабильных участков в середине

молекулы  $\beta$ -SkTm WT (ориентировочно остатки 130–188), которая происходит с низкой кооперативностью в достаточно широком температурном диапазоне.



**Рис. 21.** Нормированные кривые температурных зависимостей тепловой денатурации  $\beta$ -SkTm w.t. (синяя кривая) и  $\beta$ -SkTm R91G (красная кривая), измеренные методом КД по изменениям эллиптичности при 222 нм (А). Скорость нагрева 1 °С/мин, концентрация белка во всех случаях – 0,1 мг/мл. Концентрации других компонентов: 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7.3), 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ  $\beta$ -МЕ. (Б) Профили первой производной от данных, представленных на рисунке (А).

Теперь обратимся к эффекту мутации R91G в молекуле  $\beta$ -SkTm (рис. 20Б). В случае  $\beta$ -NmTm R91G ее присутствие вызывает драматическое снижение

термостабильности N-концевого домена молекулы (рис. 7Б). По аналогии, нечто подобное можно предположить и в случае  $\beta$ -SkTm R91G. По-видимому, мутация R91G и в этом случае вызывает резкое снижение термостабильности N-концевого домена молекулы. В результате этот домен плавится при значительно более низкой температуре (домен 1 на рис. 20Б с максимумом при 29,3°C) – как раз в той же области, где происходит денатурация N-концевого домена  $\beta$ -NmTm R91G (рис. 7Б). При этом в два раза уменьшается энтальпия домена 2 по сравнению с белком дикого типа (рис. 20Б, таблица 2). Это лишний раз подтверждает, что домен 2 в случае  $\beta$ -SkTm WT в действительности представляет собой сумму двух доменов – N-концевого и C-концевого.

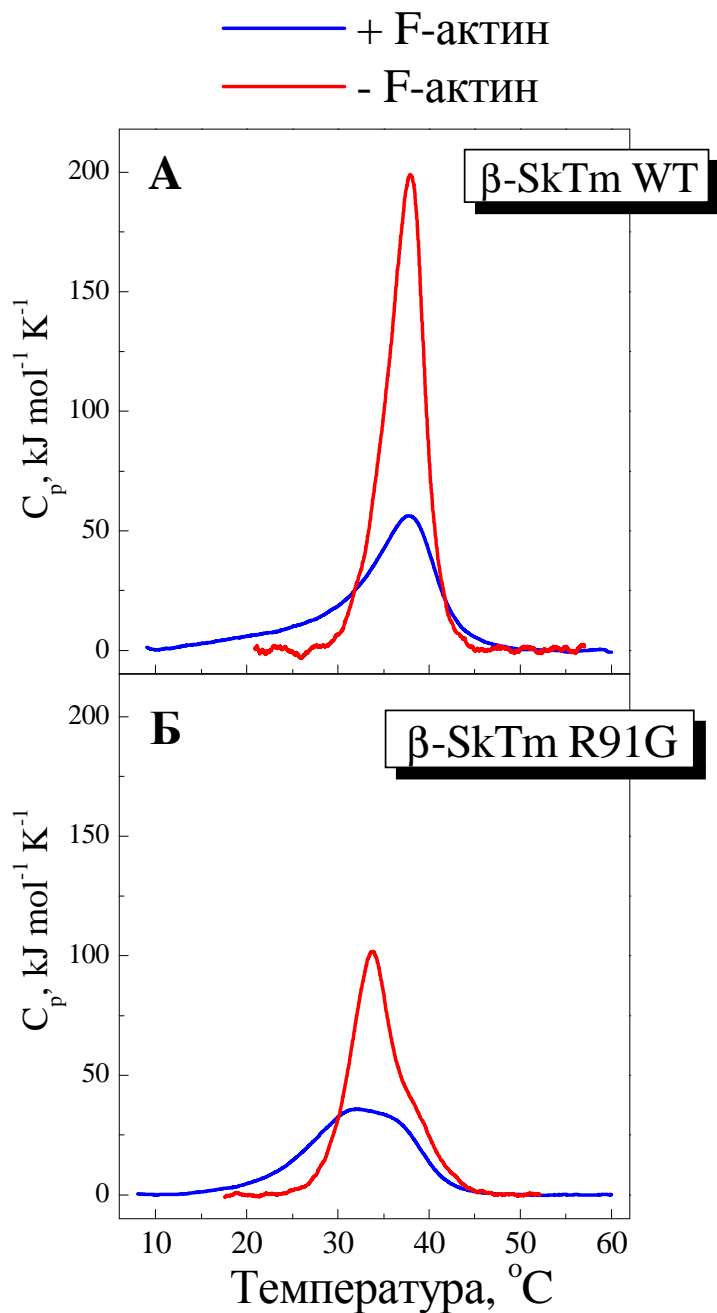
Исследования температурных зависимостей КД для  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G показали, как и в случае  $\beta$ -NmTm, наличие существенной некооперативной денатурации в низкотемпературной области (с самого начала записи, т.е. с 5°C) (рис. 21А). На графиках первых производных кривых температурных зависимостей КД (рис. 21Б) хорошо видно, что мутация R91G заметно снижает термостабильность  $\beta$ -SkTm.

### ***Свойства скелетного $\beta$ -тропомиозина дикого типа и с мутацией R91G в комплексе с F-актином.***

#### *Тепловая денатурация $\beta$ -SkTm WT и $\beta$ -SkTm R91G в присутствии F-актина*

На рис. 22 изображены кривые ДСК, полученные для комплексов F-актина с  $\beta$ -SkTm WT и  $\beta$ -SkTm R91G. Видно, что в случае  $\beta$ -тропомиозина дикого типа в присутствии актина на термограмме появляется новый пик (рис. 22А). Температура максимума этого пика ( $T_{AT} = 37.9^\circ\text{C}$ ) совпадает с температурой максимума пика денатурации свободного  $\beta$ -SkTm WT, однако энтальпия этого перехода увеличивается в присутствии актина в 1,7 раза, и при этом резко возрастает его кооперативность (более чем в 2 раза). Кроме того, наблюдается полная корреляция максимума пика денатурации связанного с актином  $\beta$ -SkTm WT с температурой диссоциации  $T_{diss}$  (37,5°C), т.е. с температурой полуперехода на кривой диссоциации комплексов  $\beta$ -Tm–F-актин, определенной при измерениях температурных зависимостей светорассеяния (рис. 23, зеленая кривая). Возникает закономерный вопрос: «Откуда же взялась лишняя энергия?». Можно предположить, что прирост энтальпии дает энергия связи тропомиозина и актина, однако это вряд ли реализуется, поскольку взаимодействие этих двух белков осуществляется за счет электростатических сил, которые по своей природе достаточно

слабые. Кроме того, в случае ранее исследованного препарата  $\alpha$ -SkTm не наблюдалось столь существенного увеличения энтальпии денатурации при связывании с актином.



**Рис. 22.** Тепловая денатурация комплексов  $\beta$ -SkTm w.t. (А) и  $\beta$ -SkTm R91G (Б) с F-актином, стабилизированным фаллоидином (красные кривые). Диапазон температур выше  $65^{\circ}\text{C}$ , в котором происходит тепловая денатурация стабилизированного фаллоидином F-актина, не показан. Синие кривые соответствуют тепловой денатурации свободного тропомиозина. Они были получены в ходе повторного прогрева тех же образцов, следовавшего после прогрева до  $90^{\circ}\text{C}$  и охлаждения до  $5^{\circ}\text{C}$ , т.е. после полной необратимой денатурации F-актина. Концентрация всех тропомиозинов составляла  $10 \text{ мкМ}$ . Концентрации остальных компонентов:  $46 \text{ мкМ}$  F-актин,  $70 \text{ мкМ}$  фаллоидин,  $30 \text{ mM}$  Hepes,  $100 \text{ mM}$  KCl,  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  и  $1 \text{ mM}$   $\beta$ -МЕ, pH 7,3. Скорость нагрева  $1 \text{ K/мин}$ .

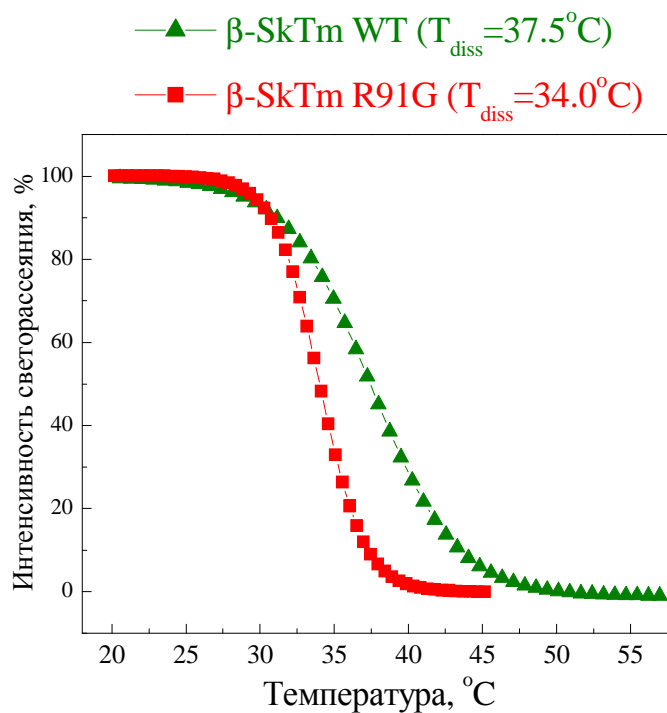
Объяснение тому, что при связывании с актином энтальпия денатурации тропомиозина увеличивается в 1,7 раза, строится, скорее всего, на основе предложенного ранее (см. «Обзор литературы») механизма денатурации тропомиозина на поверхности актинового филамента. Выше неоднократно указывалось на некооперативную тепловую денатурацию в низкотемпературной области, присущую как  $\beta$ -NmTm, так и  $\beta$ -SkTm. Поскольку тропомиозин не может денатурировать до диссоциации с поверхности актина, вся «невидимая» до этого энтальпия некооперативной денатурации концентрируется в виде пика денатурации связанного с актином тропомиозина. Подобное поведение было уже описано ранее в экспериментах по влиянию F-актина на тепловую денатурацию немышечных  $\alpha$ -тропомиозинов фибробластов [Kremneva et al., 2006].

Подобная картина наблюдается и в случае скелетного  $\beta$ -тропомиозина, несущего мутацию R91G (рис. 22Б). И в этом случае добавление актина не оказывает заметного влияния на температуру максимума тепловой денатурации  $\beta$ -SkTm, но существенно увеличивает энтальпию теплового перехода (в 1,4 раза) и его кооперативность. Интересно отметить, что на кривой ДСК связанного с F-актином  $\beta$ -SkTm R91G хорошо видно выраженное плечо в области 36–44°C (рис. 22Б). Оно явно соответствует тепловой денатурации C-концевой части молекулы, которая плавится как раз в этом температурном диапазоне (домен 2 на рис. 20Б). Тепловая денатурация этого домена происходит после диссоциации  $\beta$ -SkTm R91G с поверхности актина ( $T_{\text{diss}} = 34^\circ\text{C}$ , рис. 23) и потому, согласно предложенному ранее механизму денатурации тропомиозина на поверхности актинового филамента (см. «Обзор литературы»), актин не оказывает никакого влияния на этот процесс.

#### *Температурные зависимости диссоциации комплексов $\beta$ -SkTm WT и $\beta$ -SkTm R91G с F-актином*

Исследование температурных зависимостей светорассеяния (рис. 23) показало, что  $\beta$ -SkTm, несущий мутацию R91G, диссоциирует с поверхности актинового филамента при более низкой температуре ( $T_{\text{diss}} = 34^\circ\text{C}$ ), чем белок дикого типа ( $T_{\text{diss}} = 37,5^\circ\text{C}$ ). Этим обусловлена и разница в температурах максимума теплового перехода, появляющегося в присутствии актина на термограммах ДСК ( $T_{\text{AT}} = 37,9^\circ\text{C}$  для SkTm WT и  $33,8^\circ\text{C}$  для  $\beta$ -SkTm R91G). Отметим, однако, что эта разница ( $3,5^\circ\text{C}$  между значениями  $T_{\text{diss}}$  и  $4,1^\circ\text{C}$  между величинами  $T_{\text{AT}}$ ) была в случае  $\beta$ -SkTm существенно ниже, чем в случае  $\beta$ -NmTm, для которого разница в величине  $T_{\text{diss}}$  между  $\beta$ -NmTm WT и  $\beta$ -NmTm R91G составляла почти  $7^\circ\text{C}$  (рис. 15). Как указывалось выше, температура диссоциации тропомиозина с поверхности актинового филамента в значительной мере определяется прочностью связи

тропомиозина с актином. Исходя из этого, можно прийти к заключению, что в случае скелетного  $\beta$ -Tm мутация R91G ослабляет эту связь не столь значительно, как это наблюдалось в случае немышечного (гладкомышечного)  $\beta$ -Tm.



**Рис. 23.** Нормализованные температурные зависимости светорассеяния для комплексов  $\beta$ -SkTm w.t. и  $\beta$ -SkTm R91G с F-актином, стабилизированным фаллоидином. Падение светорассеяния отражает диссоциацию данных комплексов. За 100% принята разница в светорассеянии при  $25^{\circ}\text{C}$  между комплексами Tm–F-актин и чистым F-актином, стабилизированным фаллоидином. Условия совпадают с условиями эксперимента по ДСК, представленного на рис. 22. Скорость нагрева  $1\text{ К/мин}$ .  $T_{diss}$  – температура полумаксимальной диссоциации комплекса тропомиозина с F-актином, т.е. температура, при которой снижение светорассеяния составляет 50%.



## Заключение

Подводя итоги, проанализируем основные заключения, вытекающие из данной работы.

Прежде всего, обратимся к влиянию мутации R91G на свойства изученных  $\beta$ -тропомиозинов. Применяя методы ДСК и КД, мы показали, что замена остатка Arg-91 на остаток глицина оказывает драматическое влияние на термостабильность как  $\beta$ -NmTm, так и  $\beta$ -SkTm. Введение данной точечной мутации резко снижает стабильность всего N-концевого сегмента молекулы, что выражается в появлении нового низкотемпературного перехода на кривой ДСК. При этом заметим, как это следует из спектров КД, что при 5°C вторичные структуры (содержание  $\alpha$ -спиралей) идентичны для белка дикого типа и его мутанта. Это означает, что данная точечная мутация (R91G) не препятствует образованию  $\alpha$ -спирали, которая является основой структуры тропомиозина, однако критически меняет ее стабильность, причем этот эффект проявляется не локально, а распространяется на всю N-концевую половину молекулы. Помимо этого, мутация R91G существенно снижает температуру диссоциации тропомиозина с поверхности актинового филамента. Это объясняется уменьшением прочности связи между этими двумя белками при введении данной мутации в тропомиозин.

Рассмотрим теперь особенности денатурации  $\beta$ -тропомиозинов. Обе исследованные изоформы ( $\beta$ -NmTm и  $\beta$ -SkTm) обладают низкой термостабильностью. Это проявляется, главным образом, в наличии у них медленной некооперативной тепловой денатурации при низких температурах (10–20°C и даже ниже). Кроме того, температура максимума кооперативных переходов у обоих  $\beta$ -тропомиозинов имеет достаточно низкие значения. Например, у  $\beta$ -SkTm WT (рис. 20А) температура максимума на кривой ДСК составляет 37,5°C, тогда как у  $\alpha$ -SkTm переход, соответствующий плавлению самого термолабильного домена, имеет максимум при 43°C [Kremneva et al., 2004]. Важно отметить, что имея столь низкую термостабильность,  $\beta$ -тропомиозин дикого типа (а уж тем более мутант R91G!) просто не может существовать в свободном виде в виде гомодимеров при физиологических температурах. Связывание с актином не увеличивает термостабильность тропомиозина, поскольку его диссоциация с поверхности актинового филамента также происходит в диапазоне физиологически допустимых температур. Следовательно, встает вопрос о самой возможности существования гомодимеров  $\beta$ -тропомиозина в клетке. Проведенные нами предварительные эксперименты по изучению тепловой денатурации  $\beta$ -тропомиозина в составе реконструированного тонкого филамента показали, что добавление тропонина, по крайней мере в отсутствие кальция, увеличивает

термостабильность как  $\beta$ -SkTm WT, так и  $\beta$ -SkTm R91G в среднем на 6°C. Таким образом, присутствие гомодимеров  $\beta$ -SkTm в составе тонкого филамента в мышцах представляется вполне возможным.

В заключение остановимся на сравнении особенностей тепловой денатурации двух изоформ  $\beta$ -тропомиозина –  $\beta$ -NmTm и  $\beta$ -SkTm. Необходимо отметить, что  $\beta$ -SkTm в целом обладает меньшей термостабильностью, чем  $\beta$ -NmTm. При этом доменная структура обеих изоформ тропомиозина идентична – в молекуле имеется два основных домена, соответствующих ее N- и C-концевым сегментам. Поскольку  $\beta$ -NmTm и  $\beta$ -SkTm имеют одинаковую первичную структуру вплоть до 188 аминокислотного остатка, различия их термостабильности объясняются разной структурой C-концевого домена (остатки 188–284). Мы предполагаем, что более низкая термостабильность этого домена у  $\beta$ -SkTm по сравнению с  $\beta$ -NmTm обусловлена присутствием в нем участка, кодируемого экзоном **6b** (рис. 2). Ранее было показано [Kremneva *et al.*, 2006], что наличие данного участка вызывает снижение термостабильности молекулы тропомиозина – в отличие от участка, кодируемого экзоном **6a**, который характерен для  $\beta$ -NmTm. Различия изоформ также проявляются и в их взаимодействии с актином. Тепловая денатурация связанного с актином  $\beta$ -SkTm характеризуется значительными большими значениями энтальпии и кооперативности, чем в случае  $\beta$ -NmTm. Вероятно, это объясняется более выраженной низкокооперативной денатурацией при низких температурах в случае  $\beta$ -SkTm. Белки дикого типа обеих изоформ характеризуются одинаковой температурой диссоциации с поверхности актинового филамента, тогда как при введении мутации температура диссоциации значительно ниже в случае  $\beta$ -NmTm R91G, чем у  $\beta$ -SkTm R91G. Видимо, это можно объяснить различиями в структуре C-концевых сегментов (см. рис. 2) и, соответственно, в характере межмолекулярных концевых взаимодействий между данными изоформами  $\beta$ -тропомиозина.

## **Выводы**

1. Методом ДСК в сочетании с другими методами установлено, что точечная мутация R91G вызывает значительные структурные изменения в молекуле  $\beta$ -тропомиозина, резко снижая термостабильность всей N-концевой части молекулы.
2. Показано, что эта мутация существенно снижает прочность связи  $\beta$ -тропомиозина с F-актином.
3. Установлено, что некоторая часть молекулы  $\beta$ -тропомиозина плавится некооперативно при низких температурах. В целом, термостабильность исследованных изоформ  $\beta$ -тропомиозина оказалась гораздо ниже, чем у изученных ранее изоформ  $\alpha$ -тропомиозина.

### Список цитированной литературы

- Гусев Н.Б. (1998) Внутриклеточные Ca-связывающие белки. *Соросовский образовательный журнал*, **5**, 2-16.
- Гусев Н.Б. (2000) Молекулярные механизмы мышечного сокращения. *Соросовский образовательный журнал*, **6(8)**, 24-32.
- Кремнева Е.В., Николаева О.П., Гусев Н.Б., Левицкий Д.И. (2003) Влияние тропонина на тепловую денатурацию связанного с актином тропомиозина. *Биохимия*, **68**, 976-984.
- Константино, Г.Р., Швендман, С.Р., Лангер., Р., Клибанов, А.М. (1998). Повреждение препаратов лиофилизированных белков. *Биохимия*. т. **63**, вып. 3., 422-429.
- Кремнева Е.В. (2005) Тепловая денатурация различных изоформ тропомиозина в отсутствие и в присутствии F-актина. Автореферат канд. диссертации, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 2005.
- Левицкий Д.И. (2004а) Актомиозиновые системы биологической подвижности. *Биохимия*, **69**, 1447-1462.
- Левицкий Д.И. (2004б) Применение метода дифференциальной сканирующей калориметрии для структурно-функциональных исследований мышечных белков (обзор). *Успехи биол. химии*, **44**: 133-170.
- Левицкий Д.И., Хайтлина С.Ю., Гусев Н.Б. (1995). Белки актомиозиновой системы биологической подвижности. В книге “Белки и пептиды”, том 1: 249-293, (под ред. Иванова В.Т., Липкина В.М.), Наука, Москва.
- Финкельштейн, А.В., Птицын, О.Б. «Физика белка». 2-е изд. Книжный дом «Университет», Москва, 2002.
- Anfinsen, C.V., and Scheraga, H.A. (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.* **29**, 205-300.
- Astbury, W.T., Reed, R., and Spark, L.C. (1948). An X-ray and electron microscope study of tropomyosin.
- Bailey, K. (1948). Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.* **43**, 282-287.
- Branden, C. and Tooze, J. “Introduction to protein structure”, 2<sup>nd</sup> ed., Garland Publishing Inc., NY, 393 pp., 1999.
- Brown, J.H., Zhou, Z., Reshetnikova, L., Robinson, H., Yammani, R. D., Tobacman, L.S., and Cohen, C. (2005) Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18878-18883.
- Cooper, J.P. (2002) Actin dynamics: tropomyosin provides stability. *Curr. Biol.* **12**, R523-R525.
- Coulton, A.T., Koka, K., Lehrer, S.S., and Geeves, M.A. (2008) Role of the head-to-tail overlap region in smooth and skeletal muscle  $\beta$ -tropomyosin. *Biochemistry* **47**, 388-397.
- Donner K. Ollikainen M., Ridanpaa M., Chretien H.-J., Goebel, H., Visser, M. de., Pelin, K., and Wallgren-Petersson, C. (2002) Mutations in the  $\beta$ -tropomyosin (TPM-2) gene – a rare cause of nemaline myopathy. *Neuromuscular Disorders* **12**, 151-158.

- Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, N., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83**, 433-478.
- Fatkin, D., and Graham, R.M. (2002) Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* **82**, 945-980.
- Golitsina, N., Yougmi, A., Greenfield, N., Thierfelder, L., Iizuka, K., Seidman, J., Seidman C., Lehrer, S., and Hitchcock-DeGregori, S.E. (1992) Effects of two FHC-causing mutations on  $\alpha$ -Tm structure and function. *Biochemistry* **36**, 4637-4642.
- Gunning, P.W., Schevzov, G., Kee, A.J., and Hardeman, E.C. (2005) Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeletal function. *Trends in Cell Biol.* **15**, 333-341.
- Hitchcock-DeGregori, S.E., Song, Y., and Greenfield, N.J. (2002) Functions of tropomyosin's periodic repeats. *Biochemistry* **41**, 15036-15044.
- Holmes, K. C. and Geeves, M. A. (2000) The structural basis of muscle contraction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **355**, 419-431.
- Ishii, Y., and Lehrer, S. (1990). Excimer fluorescence of pyreniliodacetamide-labeled tropomyosin: A probe of the state of tropomyosin in the reconstituted muscle thin filaments. *Biochemistry* **29**, 1160-1166.
- Kohn, W.D., Kay, C.M., and Hodges, R.S. (1997). Salt effects on protein stability: two stranded  $\alpha$ -helical coiled-coils containing intrahelical ion pairs. *J. Mol. Biol.* **267**, 1039-1052.
- Kremneva, E., Boussof, S., Nikolaeva, O., Maytum, R., Geeves, M.A., and Levitsky, D.I. (2004) Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in  $\alpha$ -tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin. *Biophys. J.* **87**, 3922-3933.
- Kremneva E., Nikolaeva O., Maytum, R., Arutyunyan A.M., Geeves M.A., and Levitsky D.I. (2006) Thermal unfolding of smooth muscle and non-muscle tropomyosin  $\alpha$ -homodimers with alternatively spliced exons. *FEBS Journal* **273**, 588–600.
- Kwok, S.C., and Hodges, R.S. (2004). Stabilizing and destabilizing clusters in the hydrophobic core of long two stranded  $\alpha$ -helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* **279**, 21576-21588.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Levitsky, D., Rostkova, E., Orlov, V., Nikolaeva, O., Moiseeva, L., Teplova, M., and Gusev, N. (2000) Complexes of smooth muscle tropomyosin with F-actin studied by differential scanning calorimetry. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1869-1877.
- Libri, D., Mouly, V., Lemonnier, M., and Fiszman, M.Y. (1990). A nonmuscle tropomyosin is encoded by the smooth/skeletal  $\beta$ -tropomyosin gene and mRNA is transcribed from an internal promoter. *J. Biol. Chem.* **265**, 3471-3473
- Maytum, R., Bathe, F., Konrad, M., and Geeves, M. (2004). Tropomyosin exon 6b is a specific and required for correct acto-myosin regulation. *J. Biol. Chem.* **279**, 18203-18209.
- McKillop, D.F., and Geeves, M.A. (1993) Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* **65**, 693-701.

- McLeod, A.R., Houlker, C., Reinach, F.C., Smillie, L.B., Talbot, K., Modi, G., and Walsh, F.S. (1985). A muscle type tropomyosin in human fibroblasts: evidence for expression by an alternative RNA splicing mechanism. *J. Biol. Chem.* **82**, 7835-7839.
- Mirza, M., Marston, S., Willott, R., Ashley, C., Mogensen, J., McKenna, W., Robinson, P., Redwood, C., and Watkins, H. (2005) Dilated cardiomyopathy mutations in three thin filament regulatory proteins result in a common functional phenotype. *J. Biol. Chem.* **280**, 28498-28506.
- Mirza, M., Robinson, P., Kremneva, E., Copeland, O., Nikolaeva, O., Watkins, H., Levitsky, D., Redwood, C., El-Mezgueldi, M., and Marston, S. (2007) The effects of mutations in  $\alpha$ -Tm (E40K and E54K) that cause familial DCM on the regulatory mechanism of cardiac muscle thin filaments. *J. Biol. Chem.* **282**, 13487-13497.
- Nilsson, J., and Taijsharghi, H. (2008).  $\beta$ -Tropomyosin mutations alter tropomyosin isoform composition. *Eur. Journal of Neurology* **15**, 573–578.
- Orlov, V., Rostkova, E., Nikolaeva, O., Drachev, V., Gusev, N., Levitsky, D. (1998). Thermally induced chain exchange of smooth muscle tropomyosin dimers studied by differential scanning calorimetry. *FEBS lett.* **433**, 241-244.
- Perry, S.V. (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**, 5-49.
- Pittenger, M.F., Kistler, A., and Helfman, D.M. (1995) Alternatively spliced exons of  $\beta$ -tropomyosin gene exhibit different affinities for F-actin and effects with nonmuscle caldesmon. *J. Cell. Sci.* **108**, 3253-3265.
- Phillips, G.N.Jr., Filler J.P., and Cohen, C. (1986) Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* **192**, 111–131.
- Privalov, P. ., and Potekhin, S.A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Meth. Enzymol.* **131**, 4-51.
- Privalov, P.L., and Dragan, A.I. (2007) Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophys. Chem.*, **126**, 16-24.
- Robinson, P., Lipscomb, S., Preston, L., Altin, E., Watkins, H., Ashley, C., and Redwood, C. (2007) Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and  $\beta$ -tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function. *The FASEB Journal*, **21**, 896-905.
- Seidman, J.G. and Seidman C. (2004) The genetic bases of cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, **104**, 557-567.
- Squire, J. M., and Morris., E. P. (1998) A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *FASEB J*, **12**, 761-771.
- Stewart, M., and McLachlan, A.D. (1975) Fourteen actin-binding sites on tropomyosin? *Nature*, **257**, 331-333.
- Sumida J.P, Wu, E, and Lehrer S.S. (2008) Conserved Asp-137 imparts flexibility to tropomyosin and affects function. *J Biol Chem.* **14**, 6728-6734.
- Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., and Maeda, Y. (2003) Structure of the core domain of human cardiac troponin in the  $\text{Ca}^{2+}$ -saturated form. *Nature*. **424**, 35-41.

- Tsalkova, T. N., and Privalov, P. L. (1980) Stability of troponin C. *Biochim. Biophys. Acta* **624**, 196-204.
- Ueno, H. (1984). Local structural changes in tropomyosin detected by a trypsin probe method. *Biochemistry* **23**, 4791-4798.
- Vinogradova, M. ., Stone, D.B., Malanina, G.G., Karatzaferi, C., Cooke, R., Mendelson, R.A., and Fletterick, R.J. (2005) Ca<sup>2+</sup>-induced structural changes in troponin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5038-5043.
- Wang, Y.-C., and Rubenstein, P. (1992) Splicing of two alternative exon pairs in  $\beta$ -tropomyosin pre-mRNA is independently controlled during myogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 12004-12010.
- Williams, D.L.J., and Swenson, C.A. (1981) Tropomyosin stability: assignment of thermally induced conformational transitions to separate regions of the molecule. *Biochemistry*, **20**, 3856-3864.