Биохимия мышц и биологическая подвижность

Лектор: чл-корр РАН, профессор Н.Б. Гусев

Спецкурс посвящен рассмотрению структуры и свойств основных сократительных и регуляторных белков. Подробно анализируется механизм функционирования биологических моторов (миозина, кинезина, динеина). Рассматривается строение цитоскелета и механизмы регуляции его активности. Описывается структура и функции различных кальций-связывающих белков и молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции сократительной активности различных типов мышц.

Программа курса

Лекция 1. Разнообразие форм биологической подвижности (сокращение хвоста бактериофага, движения растений, перемещение бактерий, амебоидные движения, движение, генерируемое жгутиками простейших, асинхронные летательные мышцы насекомых и запирательные мышцы моллюсков). Функции, выполняемые мышцами (движение, генерация тепла, эластические свойства мышц и соединительных тканей). Типы скелетов (внутренний с жесткими стенками, наружный с жесткими стенками, гидравлический с мягкими и жесткими стенками). Основы миогенеза. Различие путей формирования поперечнополосатых, сердечных и гладких мышц. Регенерация мышц. Классификация мышечных волокон. Различия в скоростях сокращения, скоростях утомления и развиваемого усилия. Классификации, построенные на морфологических, биохимических и физиологических критериях. Сходство и различие приведенных классификаций.

Морфология поперечнополосатых мышц. Саркомер, тонкие и толстые филаменты. Строение анизотропной и изотропной зон. М-линия и Н-зона. Гипотеза скользящих нитей. Экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу правильности гипотезы скользящих нитей. Альтернативные гипотезы, объясняющие механизм мышечного сокращения.

Лекции 2-3. Строение миозина. Представление о легких и тяжелых цепях миозина. Протеолитические фрагменты миозина и функции, выполняемые различными участками молекулы миозина. Строение хвоста молекулы миозина. Суперспирали типа coiled-coil и их роль в создании надмолекулярных структур. Различные способы упаковки двухголового миозина 2. Минорные белки, связанные с миозиновым филаментом. Строение М-линии, миомезин, белок М и креатинкиназа. Роль М-линии в упорядоченном расположении толстых филаментов. С-белок и его аналоги, упаковка центральной части миозинового филамента. Дистальный конец толстого филамента, АМФ-дезаминаза. Система ферментов, связанных с миозиновым филаментом и участвующих в метаболизме АТФ (миокиназа, креатинкиназа, АМФ-дезаминаза, фосфофруктокиназа). Роль титина в поддержании целостности саркомера. Альтернативные способы упаковки миозина в гладких мышцах и мышцах нематод. Изоформы миозина. Современная классификация изомиозинов. Строение миозинов, относящихся к классам 1, 2, 3, 5, 6, 9. Роль различных изоформ миозина в

перемещении органелл, создании цитоскелета, рецепции различных внешних сигналов. Сходство и различие изоформ миозина. Направленность перемещения миозина по нити актина. Современные представления о функционировании миозинового «мотора». Структурные факторы, определяющие величину шага миозиновой головки по нити актина. Кинетические модели АТФ-азной активности актомиозина.

Лекции 4-7. Строение и свойства актина. Посттрансляционные модификации актина. Процесс полимеризации актина. Представление и критической концентрации актина. Полярность нити актина, представление о тредмилинге. Роль нуклеотидов в процессе полимеризации актина. Строение фибриллярного актина, роль отдельных доменов актина в формировании межсубъединичных контактов. Участие белков групп WASP, SCAR и ERM, а также малых G-белков в регуляции процесса полимеризации актина. Белки комплекса ARP2/3 и их роль в полимеризации актина и ветвлении нитей актина.

Классификация актин-связывающих белков. Белки, взаимодействующие с мономерным актином (кофилин, профилин, ДНКаза). Участие этих белков в регуляции процесса полимеризации актина. Белки, кепирующие минус-конец актина (β-актинин). Роль этих белков и тропомодулина в регуляции длины актиновых филаментов. Белки, кепирующие плюс-конец актина (гельзолин, cap-Z, другие белки). Строение Z-линии, роль α-актинина и cap-Z. Белки, повреждающие нити актина. Семейство белков гельзолина (гельзолин, северин, виллин, бревин, профилин). Белки, сшивающие нити актина. Филамин (актин-связывающий беолок. ABP) и «гибкие сшивки». Роль «гибких сшивок» в поддержании определенной вязкости цитоплазмы. «Жесткие сшивки», строение α-актинина, виллина, фимбрина, спектрина, фодрина, белков семейства TW 240/260. Ультраструктура микроворсинки кишечника, цитоскелет эритроцитов. Белки, обеспечивающие прикрепление актина к мембране (винкулин, метавинкулин, талин, интегрин, α-актинин). Строение фокальных контактов. Структура и свойства дистрофина. Дистрофин и утрофин. Различные виды мышечных дистрофий (дистрофия Дюшена, дистрофия Беккера). Белки, участвующие в регуляции длины нитей актина (небулин), и белки, располагающиеся вдоль нитей актина (тропомиозин, тропонин, кальдесмон, кальпонин). Гликолитические ферменты, взаимодействующие с нитями актина. Представление о метаболоне. Роль сорбированных на нити актина ферментов в стабилизации концентрации АТФ вблизи сократительного аппарата. Взаимодействие и взаимовлияние различных актин-связывающих белков.

Микротрубочки. Строение и свойства тубулина. Сравнение тубулина и актина. Полимеризация тубулина и полярность микротрубочек. Движения простейших, основанные на полимеризации и деполимеризации тубулина. Белки, связанные с микротрубочками. Строение аксонемы, возможные механизмы генерации движения в жгутиках простейших и хвостах сперматозоидов. Белки-моторы, динеин и кинезин. Сравнение структуры и свойств кинезина и миозина. Роль кинезина и динеина в перемещении органелл и хромосом. Изоформы кинезина. Другие белки-моторы, перемещающиеся по микротрубочкам.

Белки промежуточных филаментов. Строение белков промежуточных филаментов, роль суперспиральной структуры в формировании филаментов, механизм

полимеризации белков промежуточных филаментов. Классификация белков промежуточных филаментов (цитокератины, виментин и десмин, нейрофиламенты, ламины). Участие протеинкиназ в регуляции сборки и разборки промежуточных филаментов. Роль промежуточных филаментов в формировании цитоскелета. Межклеточные контакты.

Лекция 8. Ионные градиенты и механизм инициации мышечного сокращения. Представление о потенциале покоя и потенциале действия. Ион-транспортирующие мембранные АТФазы. Na/K-АТФаза, строение, механизмы функционирования. Система Т-трубочек, сопряжение Т-системы с саркоплазматическим ретикулумом. Дигидропиридиновый рецептор и Са-каналы трансверзальных каналов. Рианодиновый рецептор, возможная роль этого рецептора в передаче сигнала с Т-трубочек на терминальные цистерны ретикулума. Триадин и кальсеквестрин. Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума, сходство и различие Са-транспортирующих систем ретикулума и наружных мембран. Регуляция активности транспортных АТФаз кислыми фосфолипидами, фосфоламбаном и кальмодулином. Возможные пути передачи сигнала с наружной мембраны на различные депо кальция внутри клетки. Роль инозитолтрифосфата, циклической АДФ-рибозы и ионов кальция в передаче внешнего сигнала внутрь клетки. Различные системы, участвующие в поддержании определенной концентрации кальция внутри клетки (потенциал-зависимые и гормон-зависимые каналы наружной мембраны, Na/Ca-обменник, каналы, управляемые циклическими нуклеотидами, транспортные АТФазы и каналы саркоплазматического ретикулума, транспорт кальция в митохондриях). Общая схема инициации сокращения в поперечно-полосатых, сердечных и гладких мышцах.

Лекции 9-10. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Методы определения параметров связывания кальция растворимыми внутриклеточными белками. Непрямые методы определения связывания кальция (оптические методы исследования, использование методов кругового дихроизма. ЭПР и ЯМР для изучения Са-связывающих свойств, химическая модификация белка). Прямые методы исследования связывания кальция с белками. Методы равновесного диализа, ультрафильтрации, гель-фильтрации и ионообменных смол для определения параметров связывания кальция растворимыми белками.

Строение Са-связывающих белков EF-руки. Функции отдельных аминокислотных остатков, входящих в состав Са-связывающей петли. Пространственное расположение лигандов, координирующих кальций в катион-связывающем центре. Попытки предсказать катион-связывающие свойства на основе первичной структуры белка. Роль спиралей, фланкирующих кальций-связывающую петлю. Создание фармакологических соединений, способных изменять параметры связывания кальция внутриклеточными белками. Кинетика и термодинамика связывания кальция белками семейства EF-руки.

Классификация белков EF-руки. Белки, имеющие 2 катион-связывающих центра (кальбиндин, белки семейства S100, метастазин). Димерные и мономерные Са-связывающие белки. Белки, содержащие 3 кальций-связывающих центра (парвальбумины, онкомодулин). Возможная роль этих белков в регуляции мышечного сокращения и функционирования немышечных клеток. Белки, содержащие 4 кальций-

связываюших центра (легкие цепи миозина, тропонин С, кальмодулин, визинин, рековерин). Сходство и различие в строение этих белков. Изменения структуры, вызываемые связыванием ионов кальция. Регуляция активности различных ферментов кальмодулином. Представление о автоингибиторном участке, роль кальмодулина в устранении автоингиброваниия. Белки, содержащие в своей структуре более 4 кальций-связывающих участков (кальретикулин, кишечные Са-связывающие белки). Эволюция Са-связывающих белков. Использование мотива EF-руки для создания химерных белков, активность которых регулируется ионами кальция. Примеры белков-химер (кальпаин, Са-зависимая протеинкиназа растений, актинины, спектрин, дистрофин, аквеорин).

Кальций-фосфолипид-связывающие белки. Сравнение структуры этих белков со строением белков семейства EF-руки. Классификация Са-фосфолипид-связывающих белков. Возможное родство с белками EF-руки. Функции, выполняемые Са-фосфолипид-связывающими белками внутри клетки.

Внеклеточные Са-связывающие белки. Связывание кальция белками, содержащими кластеры фосфорилированных остатков серина и треонина (казеин и фосвитин). γ-карбоксилгутаминовая кислота и связывание кальция белками системы свертывания крови. Механизм посттрансляционной модификации этих белков. Внеклеточные Са-связывающие белки с низким сродством к кальцию (трипсин, термолизин). Сходство и различие в структурах Са-связывающих центров.

Лекции 11-12. Регуляция активности мышц на уровне сократительных белков. Миозиновый тип регуляции. Участие регуляторных и щелочных легких цепей миозина в регуляции сокращения мышц моллюсков. Необычный центр связывания кальция, формируемый в области контакта тяжелых и легких цепей миозина. Регуляция сокращения гладких мышц путем фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина. Строение и свойства киназы легких цепей миозина. Три белковых продукта, кодируемых в гене киназы легких цепей миозина. Киназа легких цепей миозина и телокин. Регуляция активности киназы легких цепей миозина кальмодулином и фосфорилирование фермента под действием других протеинкиназ. Протеинкиназы, отличные от киназы легких цепей миозина, способные фосфорилировать регуляторные легкие цепи миозина. Влияние фосфорилирования легких цепей миозина на свойства миозина гладких мышц. Сборка миозиновых филаментов гладких мышц. Фосфорилирование регуляторных легких цепей миозина поперечнополосатых мышц и сердца. Роль этого процесса в модуляции сократительной активности.

Актиновый тип регуляции. Строение и свойства тропомиозина. Изоформы тропомиозина, упаковка тропомиозина на актиновом филаменте. Строение тропонина. Структура тропонина С, сравнение структуры и свойств тропонина С и кальмодулина. Молекулярно-биологические подходы, используемые для изучения структуры и функций тропонина С. Тропонин I и ингибирование АТФ-азной активности актомиозина. Ингибиторные участки тропонина I. Взаимодействие тропонина I с актином и тропонином С. Способность тропонина С обращать ингибирующее влияние тропонина I. Фосфорилирование тропонина I и роль этого процесса в регуляции сократительной активности сердца. Строение тропонина Т. Альтернативный сплайсинг как способ получения большого количества изоформ тропонина Т с одного

гена. Соответствие изоформ тропонина Т и тропомиозина друг другу. Модуляция сократительной активности мышц путем синтеза изоформ сократительных белков. Роль тропонина Т в функционировании полного тропонинового комплекса. Индуцируемые кальцием изменения структуры полного тропонинового комплекса. Фосфорилирование тропонина Т и тропомиозина, возможная роль в сборке актинового филамента и регуляции сократительной активности. Стерическая и аллостерическая модели регуляции сократительной активности мышц на уровне актинового филамента.

Лекции 13-14. Регуляторные белки актинового филамента гладких мышц. Кальдесмон и кальпонин, сходство и различие с тропонином. Роль Са-связывающих белков и фосфорилирования в регуляции активности кальдесмона и кальпонина. Возможное участие кальдесмона и кальпонина в формировании цитоскелета. Согласованное действие актиновой и миозиновой систем регуляции в гладких мышцах и мышцах некоторых беспозвоночных.

Современные представления о механизме перемещения головки миозина по поверхности актина. Регуляция сила-генерирующего перемещения головки миозина на уровне шарнира в структуре молекулы миозина и на уровне замыкания определенных контактов на поверхности актина.

Представление о молекулярных механизмах сократительной активности мышц различного типа.

Список рекомендуемой литературы

Основная литература:

1. Современные оригинальные статьи в научных журналах, приведенные в ежегодно обновляемых презентациях к лекциям, а также классические учебники и учебные пособия, перечисленные ниже
2. Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон. Молекулярная биология клетки М. Мир, 1994
3. Д.И. Левицкий, С.Ю. Хайтлина, Н.Б. Гусев. Двигательные белки в Сб. Белки и пептиды, том 1, Москва, Наука 1995
4. Н.Б. Гусев. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Соросовский образовательный журнал 1998, № 5, стр.2-16
4. Н.Б. Гусев. Молекулярные механизмы мышечного сокращения. Соросовский образовательный журнал 2000, том. 6, № 8, стр.24-32
5. А.М. Рубцов. Роль саркоплазматического ретикулума в регуляции сократительной активности мышц. Соросовский образовательный журнал 2000, том 9, № 6, стр. 17-24.
6. Н.Б. Гусев. Движение немышечных клеток и реорганизация актиновых микрофиламентов. Соросовский образовательный журнал 2001, том 7, №7, стр. 9-1
7. Е.А. Шубникова, Н.А. Юрина, Н.Б. Гусев, О.П. Балезина, Г.Б. Большакова. Мышечные ткани. Москва, Медицина, 2001.

Дополнительная литература:

1. Б.Ф. Поглазов, Д.И. Левицкий. Миозин и биологическая подвижность М, Наука, 1982
2. П. Каппуччинелли. Подвижность живых клеток. Москва, М. 1982
3. Л. Бэгшоу. Мышечное сокращение. Москва, Мир, 1985
5. Е.С. Севери, М.Н. Кочеткова. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности. Москва, Наука, 1985
6. В.С. Гурфинкель, Ю.С. Левик. Скелетная мышца, структура и функции. Москва, Наука. 1985
7. А. Фултон. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. Москва, Мир, 1987
8. Сб. Структура и функции белков сократительных систем. Ленинград, Наука, 1987
9. В.И. Мельгунов. Са-зависимые, фосфолипидсвязывающие белки. Итоги науки и техники ВИНИТИ Биофизика т.34. 1990
10. G.H. Pollack. Muscles and Molecules. Uncovering the principles of biological motion. Ebner and Sons Publishers, 1990
11. Е.А. Пермяков. Кальцийсвязывающие белки. Москва, Наука, 1993
12. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor proteins. Ed. T.Kreis, R.Vale. Oxford University Press 1993
13. I. Rayment, H.M. Holden. The three-dimensional structure of molecular motor. Trends in Biochemical Sciences. 19, 129-134, 1994

14. B.G. Allen, M.P. Walsh. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. Trends in Biochemical Sciences 19, 362-368, 1994
15. Ed. M. Barany. Biochemistry of smooth muscle contraction, Academic Press, 1995
16. M. Jamie, T.V. Cope, J. Whisstock, I. Rayment, J. Kendrick-Jones. Conservation within the myosin motor domain: implications for structure and function. Structure, 4, 969-987, 1996
17. Н.В. Богачева, Н.Б. Гусев. Структура и функции кальдесмона и кальпонина. Успехи биологической химии 1997, т.37, стр.3-48.