

*На правах рукописи*

ШЕВЧЕНКО  
Ульяна Владимировна

**АКТИН ЗАПИРАТЕЛЬНОЙ МЫШЦЫ МИДИИ *CRENOMYTILUS GRAYANUS*: ОСОБЕННОСТИ ОЧИСТКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ТРОПОМИОЗИНОМ И МИОРОДОМ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук **Шелудько Николай Семёнович**

**Официальные оппоненты:**

**Бершицкий Сергей Юрьевич**, доктор биологических наук, с.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией биологической подвижности

**Левицкий Дмитрий Иванович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт биохимии им. А.Н. Баха, заведующий лабораторией структурной биохимии белка

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской Академии наук

Защита диссертации состоится «10» ноября 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423) 2310-900, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovets-d-005-008-01/51-shevchenko-ul-yana-vladimirovna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат биологических наук

*Ващенко*

Ващенко Марина  
Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Биологическая подвижность является важной характеристикой всего живого на нашей планете. У многоклеточных животных для реализации функции движения существует мышечная ткань трёх типов, представленная в виде мышечных волокон (поперечнополосатая скелетная) или отдельных клеток (поперечнополосатая сердечная и гладкая мышечная ткань). Свойства и состав основных регуляторных сократительных белков в разных сократительных системах различны, и именно эта вариабельность может определять функциональные свойства систем и их отличие друг от друга. Поэтому одной из важнейших проблем биологической подвижности является сопоставление состава и свойств сократительных белков с физиологическими и структурными особенностями тех мышечных клеток, в которых они синтезируются.

Поперечнополосатые мышцы при помощи молекулярного сократительного аппарата и его основной единицы, саркомера, представляющего собой упорядоченную структуру из толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) нитей, могут обеспечивать два базовых состояния – сокращение и расслабление, являющихся основой мышечного движения. Теория "скользящих нитей" объясняет механизм сокращения и расслабления мышцы через регулируемое ионами кальция и гидролизом молекул АТФ взаимодействие толстых и тонких нитей (Huxley, Hanson, 1954; Huxley, Niedergerke, 1954).

Однако существуют исключения, которые не могут быть объяснены в рамках этой теории. Гладкие мышцы обладают специфической способностью находиться в таком состоянии, при котором высокое и длительное механическое напряжение поддерживается при очень низком уровне гидролиза АТФ. Такое состояние известно в гладких мышцах позвоночных как *latch* (Dillon et al., 1981), и особенно ярко выражено в гладких мышцах моллюсков в виде запирающего тонуса (*catch*) (Twarog, 1967). Такая особенность гладких мышц моллюсков не может быть объяснена в рамках теории "скользящих нитей", поэтому изучение физико-химических и функциональных свойств актина и миозина запирающей мышцы моллюсков имеет большое значение для правильного понимания механизмов сокращения этих мышц.

**Степень разработанности темы.** В исследованиях процессов сокращения и расслабления известным подходом к изучению является метод моделирования молекулярных сократительных систем. Этот метод представляет собой проводимую *in vitro* реконструкцию сократительного аппарата, тонкие и толстые нити которого формируются из очищенных белков, экстрагированных из исследуемой мышцы. При этом используются белковые модели двух типов: *гибридные*, в которых применяются белки из разных типов мышц разных видов животных (например: миозин из гладкой мышцы мидии и актин из поперечнополосатой мышцы кролика) и *негибридные*, в которых белки, используемые в модели, получены из одного типа мышц одного вида животного.

Например, для изучения функциональной активности белков из *catch*-мышцы вместо гладкомышечного актина мидии принято использовать актин из поперечнополосатых мышц позвоночных животных. Такой замене есть объяснение: до выполнения данной работы G-форму актина из мышц мидии получить не могли. В то же время процедура выделения G-актина из скелетных мышц позвоночных известна давно (Straub, 1942). Она позволяет получать препаративные количества устойчивого при комнатной температуре белка, способного перенести процедуру лиофилизации. Допустимость замены актина мидии актином позвоночных при реконструкции сократительных моделей обоснована консервативностью его нуклеотидной

последовательности и, следовательно, аминокислотного состава (Vandekerckhove, Weber, 1978; Vandekerckhove, Weber, 1979; Vandekerckhove, Weber, 1984; Bershadsky et al., 1988; Невзглядова и др., 2007; Perrin, Ervasti, 2010; Vahokoski et al., 2014). До выполнения данной работы использовали только "природный" F-актин мидии – nFA. Но так как в глобулярной форме актин мидии получить невозможно, его свойства и взаимодействие с другими белками запирательной мышцы остаются загадкой, основанной на гибридных (ненативных) комплексах с использованием актина кролика, свойства которого, несмотря на консервативность аминокислотного состава, могут отличаться от актина мидии.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы является формирование биохимически нативной (негибридной) модели *in vitro* для изучения catch-состояния.

В диссертации поставлены следующие **исследовательские задачи**:

1. Оптимизировать основные этапы получения фибриллярной F-формы "природного" актина из гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus* в количествах, достаточных для проведения биохимических исследований.
2. Разработать оригинальную методику очистки мономерной G-формы гладкомышечного актина мидии, подобрать условия для деполимеризации F-формы в G-форму и провести хроматографическую очистку G-формы актина.
3. Провести сравнительный анализ физико-химических и биохимических свойств G-формы и F-формы актина из гладких мышц мидии и из скелетных мышц кролика.
4. Протестировать взаимодействие F-формы актина из гладких мышц мидии и скелетных мышц кролика с тропомиозином в гибридных и негибридных комплексах.
5. Изучить взаимодействие миорода мидии в негибридном комплексе с актином мидии и определить зависимость взаимодействия от фосфорилирования миорода.

**Научная новизна работы.** В диссертационной работе была разработана оригинальная методика получения, деполимеризации и очистки глобулярной формы актина мидии *C. grayanus* от стадии ригоризованных мышц до хроматографически очищенного белка. В ходе работы удалось подобрать комбинацию биохимических процедур, которые приводили к диссоциации поверхностных белков тонкой нити. Ключевым моментом методики стала обработка фракции тонких нитей раствором с высокой ионной силой в присутствии АТФ и пирофосфата натрия. В результате обработки и последующего высокоскоростного осаждения был получен препарат F-актина мидии, который сохранял способность к деполимеризации и реполимеризации. Важно, однако, что в отличие от штраубовского актина скелетных мышц кролика (Straub, 1942), мы получали G-актин без использования ацетона. Помимо этого глобулярный актин из гладкой мышцы моллюсков впервые был очищен при помощи гель-фильтрации, что позволило выявить фактор, влияющий на кинетику полимеризации и на вязкость этого актина.

Впервые было проведено сравнение физико-химических свойств актина из гладкой мышцы беспозвоночных с актином скелетной мышцы позвоночных. Обнаружено значительное сходство между актинами по основным физическим и биохимическим параметрам. Подтверждение этого сходства было важно, так как не всегда можно быть уверенным, что белки, полученные принципиально отличающимися способами экстракции, будут иметь одинаковые свойства. И действительно – было выявлено отличие в вязкости между F-формами исследуемых актинов.

Показано, что гладкомышечный тропомиозин мидии не влияет на вязкость скелетномышечного F-актина, поэтому при реконструкции тонких и толстых нитей для изучения catch механизма, нельзя проводить замену актина, тропомиозина и миозина на

ненативные, создавая гибридные модели. Такие замены влияют на сродство и кинетику белок-белковых взаимодействий, что может существенно исказить полученные результаты.

Методом вискозиметрии и измерения  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности было проанализировано взаимодействие полимерного миорода, белка, который может иметь отношение к запирательному тону, с актинами из скелетных мышц кролика и гладкой мышцы мидии. При этом миород находился в нефосфорилированном и фосфорилированном состояниях. Это позволило подтвердить существование регулируемого фосфорилированием миород-опосредованного взаимодействия между синтетическими тонкими и толстыми нитями.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные расширяют познания о функционировании запирательной мышцы двустворчатых моллюсков и обогащения фундаментальных знаний об уникальном феномене catch-состояния. С практической точки зрения, разработана пошаговая методика экстрагирования и очистки белков из запирательной мышцы моллюсков, которая легко может быть воспроизведена в лабораторных условиях. Данная методика применима для экстракции сократительных белков из гладких мышц других беспозвоночных животных. Материалы диссертации могут быть включены в соответствующие курсы по биохимии белка.

Приведенный в работе анализ и сравнение гибридных и негибридных белок-белковых моделей расставляет некоторые границы применимости метода молекулярного моделирования сократительных систем *in vitro*. Результаты работы гибридных комплексов могут рассматриваться как некорректные с точки зрения достоверности работы белковой системы, но могут быть довольно интересными с точки зрения выявления уникальных особенностей изоформ исследуемых белков.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В работе применяли ряд методов молекулярной биологии и биохимии для получения и анализа белков и их комплексов. Белки из гладких мышц мидии и из скелетных мышц кролика выделяли по классическим (Straub, 1942; Bailey, 1948; Rees, Young, 1967; Margossian, Lowey, 1982; Smillie, 1982) и оригинальным методикам (Шелудько, 1975; Шелудько, Пинаев, 1975; Shelud'ko et al., 2004; Matusovsky et al., 2015; Shelud'ko et al., 2016; Girich et al., 2017). Для определения состава препаратов в процессе выделения белков и для контроля состава белковых смесей при сосаждении использовали электрофорез в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970; Шелудько, 1975; Shelud'ko et al., 1999). Электронная микроскопия была выполнена Орловой А.А. (университет Вирджинии, США). Актин очищали методом гель-фильтрации на носителе "Sephadex G-100". Кинетику полимеризации оценивали при помощи светорассеивания (Sheludko, Kropacheva, 1996). Для тестирования вязкости при низких градиентах скорости применяли метод "падающего шарика" (Pollard, 1982; Pollard, Cooper, 1982). Активность сократительных систем оценивали с помощью определения  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности системы (Tausky, Shorr, 1953; Shelud'ko et al., 2007).

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора заключается в планировании экспериментов и выполнении работ по экстрагированию, очистке, подготовке к хранению белковых препаратов из запирательных мышц мидии Грея *C. grayanus*; в самостоятельном проведении анализа белковых проб при помощи биохимических и физико-химических методов. Автор выполняла обработку и анализ полученных экспериментальных данных, принимала участие в обсуждении результатов, подготовке

иллюстраций и написании научных публикаций, а также лично участвовала в представлении результатов исследования на конференциях и симпозиумах.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Примеси поверхностных белков тонких нитей препятствуют получению глобулярной формы "природного" F-актина из запирающей мышцы мидии *S. grayanus*.

2. Физико-химические свойства гладкомышечного актина моллюсков схожи со свойствами скелетномышечного актина позвоночных; значительное отличие обнаружено в значениях вязкости между полимерами этих актинов, и оно связано с примесями неидентифицированных белков, кепирующих F-актин.

3. Миород мидии взаимодействует с полимерным актином мидии в зависимости от фосфорилирования и может принимать непосредственное участие в реализации catch-механизма.

**Степень достоверности результатов.** Чистота исходных белковых препаратов была обеспечена оригинальными подходами к экстракции и очистке белков из свежей запирающей мышцы мидии Грея *S. grayanus*. Достоверность результатов была обеспечена использованием классических биохимических и физико-химических методов исследования сократительных белковых систем для выполнения задач, поставленных в работе. О достоверности экспериментальных результатов свидетельствует их воспроизводимость в ходе выполнения работы. Материалы, представленные в работе, соответствуют протоколам исследований и записям в лабораторных журналах. Применение современных методов обработки полученных данных позволило сформулировать адекватные и однозначные научные положения и выводы.

**Апробация результатов и публикации.** Основные результаты работы были представлены на Международных симпозиумах "Биологическая подвижность" (Пушино, 2014, 2016); на I Межрегиональной молодёжной школе-конференции "Актуальные проблемы биологических наук" (Владивосток, 2013); на ежегодных научных конференциях Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, 2013 – 2019). По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 2 статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК.

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 122 страницах, содержит 21 рисунок, состоит из Введения, глав "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты", "Обсуждение", Выводов, а также списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 259 ссылок, из них 245 на иностранных языках.

**Благодарности.** Автор выражает признательность сотрудникам лаборатории биофизики клетки ННЦМБ им. А.В. Жирмунского за совместную работу и неоценимую помощь на всех этапах исследования. Отдельную благодарность выражаю к.б.н. Матусовскому О.С., к.б.н. Вятчину И.В. и д.б.н. Ламаш Н.Е. за ценные рекомендации и критические замечания в ходе написания рукописи. Благодарю д.б.н. Орлову А.А. (университет Вирджинии, США) за выполнение электронной микроскопии препаратов актина мидии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 115081110044) и проекта ДВО РАН № 15-П-6-064 по программе "Дальний Восток".

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

"Природный" F-актин, тропомиозин, кальпонин, миозин и миород моллюсков выделяли из заднего аддуктора мидии *S. grayanus* по оригинальным методикам (Shelud'ko et al., 2001, 2004; Добржанская и др., 2010; Matusovsky et al., 2015; Shelud'ko et al., 2016; Girich et al., 2017). Миозин, актин и тропомиозин из скелетных мышц кролика выделяли по ранее описанным методикам (Rees, Young, 1967; Margossian, Lowey, 1982; Shelud'ko et al., 2007). Хроматографическую очистку актинов проводили на носителе "Sephadex G-100" в присутствии G-буфера; миорода - на носителе "Sephadex CL-6B" в присутствии 6 М мочевины.

Электронная микроскопия была выполнена Орловой А.А. (университет Вирджинии, США). Для определения состава препаратов при выделении белков и для контроля состава белковых смесей при сосаждении, применяли электрофорез в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970; Шелудько, 1975; Shelud'ko et al., 1999). Концентрации белков определяли методом Биурета с модификациями (Itzhaki, Gill, 1964; Пермякова, 1997). Белковые модели тонких и толстых нитей сократительных систем реконструировали из белков мидии и кролика в экспериментальных соотношениях, в гибридных и негибридных комбинациях. Кинетику полимеризации актина оценивали при помощи светорассеивания. Для тестирования вязкости при низких градиентах скорости применяли метод "падающего шара" (Pollard, Cooper, 1982). Активность сократительных систем оценивали с помощью определения  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности системы, измеряя неорганический фосфат колориметрически по методу Херса с модификациями (Shelud'ko et al., 2007).

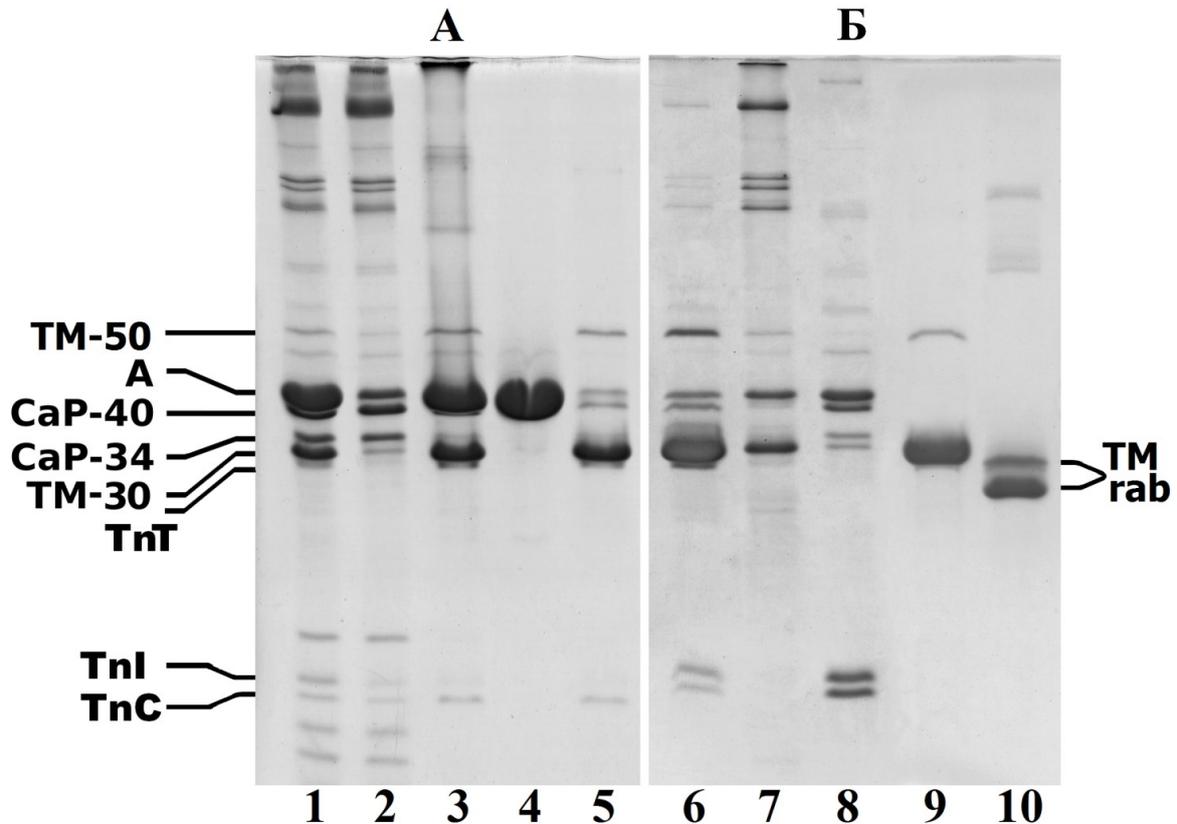
### Результаты и обсуждение

#### 1. Актин из гладкой запирающей мышцы моллюсков: особенности выделения, очистки и деполимеризации

На рисунке 1 представлена электрофореграмма основных препаратов, получаемых в ходе очистки актина и тропомиозина. На первом этапе проводили ригоризацию, гомогенизацию и отмывку мышц по ранее отработанной методике (Shelud'ko et al., 2007). Следующим этапом было экстрагирование "нативных" тонких нитей (ТНН) (рис. 1, дорожка 1) в присутствии 15 мМ (АТФ) и 5 мМ пиродифосфата натрия ( $Na_4P_2O_7$ ) с последующим высокоскоростным осаждением (рис. 1, дорожки 2 и 3). Фракция ТНН содержала актин, две изоформы кальпонина с молекулярным весом 40 кДа (CaP-40) и 34 кДа (CaP-34) (Dobrzhanskaya et al., 2013), тропомиозин (ТМ-30) и его высокомолекулярную изоформу (ТМ-50) (наши неопубликованные данные масс-спектрометрии) и компоненты тропонинового комплекса – ТnТ, ТnI и ТnС (Vyatchin et al., 2015).

Полученные в результате экстрагирования ТНН переводили в раствор с высокой ионной силой посредством суспендирования осадков в растворе с добавлением KCl до 0.6 М и снова центрифугировали (рис. 1, дорожки 4 и 5). Очищенный в таких условиях "природный" полимерный актин мидии (nFA) по результатам электрофореза не содержал

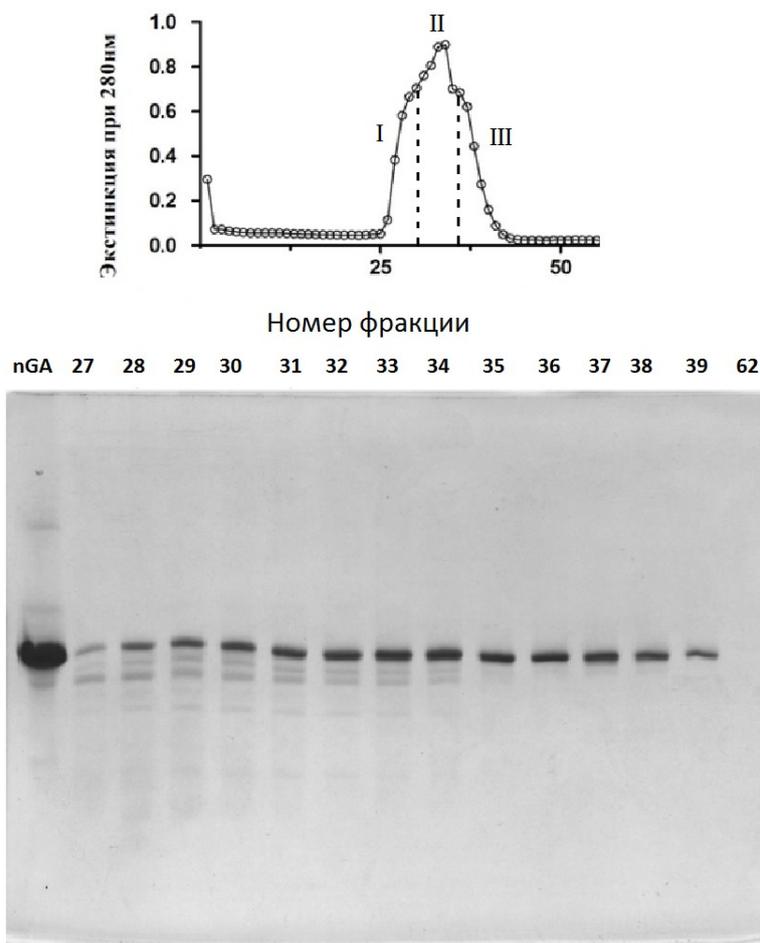
примесей других белков (рис. 1, дорожка 4) и сохранял способность к деполимеризации в низкоионном растворе с низкой концентрацией АТФ и ионов кальция.



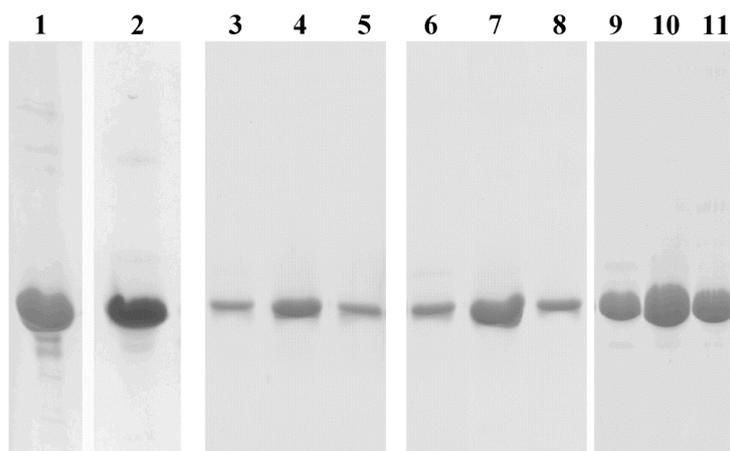
**Рисунок 1** – Этапы очистки "природного" актина (А) и тропомиозина (Б) из запирающей (catch) мышцы мидии *C. grayanus* (ПААГ-14 %).

Дорожка 1 – тонкие нити, состоящие из актина (А), кальпонинов с молекулярным весом 40 кДа (CaP-40) и 34 кДа (CaP-34), двух изоформ тропомиозина (ТМ-50 и ТМ-30), компонентов тропонинового комплекса (ТnТ, ТnI и ТnС); дорожка 2 – супернатант высокоскоростного осаждения тонких нитей; дорожка 3 – осадок высокоскоростного осаждения тонких нитей; дорожка 4 – препарат "природного" фибриллярного актина (осадок ультраосаждения актин-тропомиозинового комплекса в среде с высокой ионной силой); дорожки 5 и 6 – супернатант ультраосаждения актин-тропомиозинового комплекса в среде с высокой ионной силой (неочищенный препарат тропомиозина); дорожки 7 и 8 – примеси, удалённые из препарата тропомиозина в ходе очистки; дорожка 9 – очищенный препарат тропомиозина мидии; дорожка 10 – препарат тропомиозина кролика (ТМ rab).

Способность к деполимеризации пФА из запирающих мышц *C. grayanus* показана впервые. После диализа деполимеризованный актин мидии в мономерной G-форме осветляли при помощи высокоскоростного осаждения и далее очищали при помощи гель-фильтрации. Профиль элюции был типичный для глобулярного актина из поперечно-полосатых мышц кролика (рис. 2). Хроматографически чистые актины из мышц мидии и кролика имели одинаковую электрофоретическую подвижность, что свидетельствует об одинаковых значениях их молекулярных масс (рис. 3).

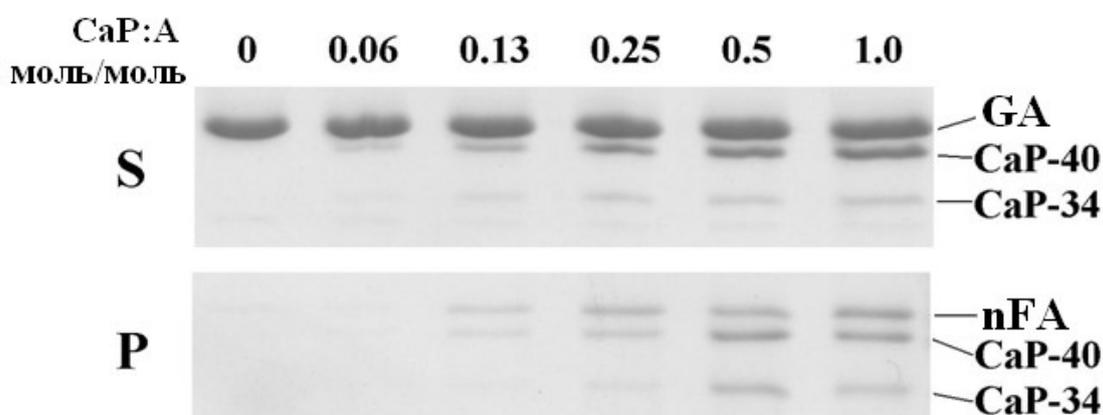


**Рисунок 2** – Гель-фильтрационная хроматография глобулярного актина мидии на носителе "Sephadex G-100" с соответствующей электрофореграммой фракций (ПААГ-13%). Пик хроматографии был разделён на три части (I, II и III) для дальнейшего сравнения.

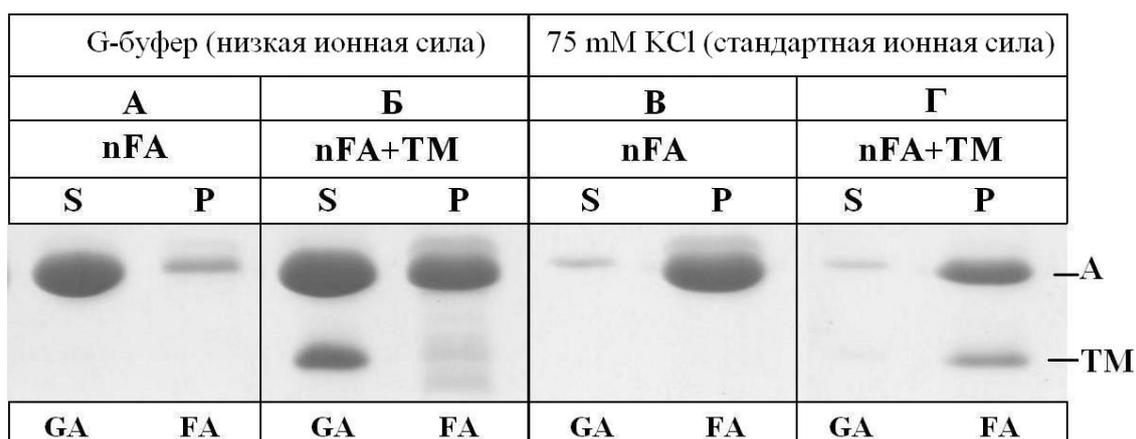


**Рисунок 3** – Электрофореграммы актина мидии и актина кролика (ПААГ-14 %). Дорожка 1 – проба глобулярного актина кролика перед хроматографией; дорожка 2 – проба глобулярного актина мидии перед хроматографией; дорожки 3, 4, 5 – хроматографически очищенный актин кролика – три фракции пика хроматографии (по рис. 2): I (3), II (4) и III (5); дорожки 6, 7, 8 – хроматографически очищенный актин мидии – три фракции пика хроматографии (по рис. 2): I (6), II (7) и III (8); дорожки 9, 10, 11 – аналогичны дорожкам 6, 7, 8, но с трехкратно увеличенной нагрузкой.

Получив глобулярный актин из запирающей мышцы мидии без использования денатурирующих агентов, мы протестировали влияние кальпонины и тропомиозина, белков, локализованных на поверхности ТНН гладких мышц мидии, на процесс деполимеризации пФА. Для этого пФА в смеси с различным содержанием кальпонины (CaP:nFA = 0 – 1.0 моль/моль) диализовали против G-буфера и центрифугировали. Было показано, что без кальпонины весь актин был деполимеризован и при высокоскоростном осаждении оставался в супернатанте (рис. 4, дорожка "0 моль/моль"). По мере добавления кальпонины в осадке появлялся недеполимеризованный актин (рис. 4P, дорожки "0.06 – 1.0 моль/моль"). Тем не менее, большая часть актина при этом была деполимеризована и переходила в супернатант. G-актин (супернатант) при этом был контаминирован кальпонином (рис. 4S, дорожки "0.06 – 1.0 моль/моль").



**Рисунок 4** – Влияние кальпонины на деполимеризацию актина мидии Грея (ПААГ-13%). S – ультрасупернатант; P – ультраосадок; пФА – актин в фибриллярной форме; GA – актин в глобулярной форме; CaP-34 и CaP-40 – кальпонины 34 и 40 кДа соответственно.



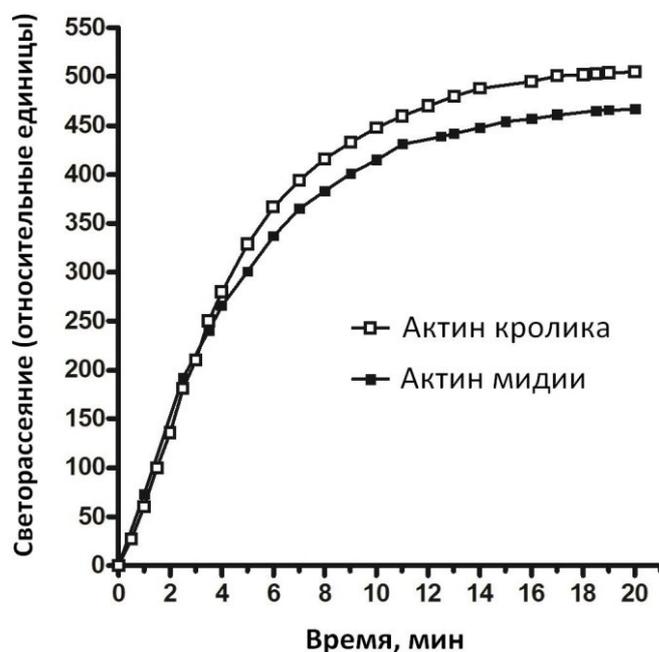
**Рисунок 5** – Влияние тропомиозина мидии (ТМ) на деполимеризацию актина мидии (пФА, А) (ПААГ-14%). GA – глобулярный актин; FA – фибриллярный актин; S – ультрасупернатант; P – ультраосадок.

Другим поверхностным белком тонкой нити, влияние которого на деполимеризацию F-актина мы изучали, был тропомиозин. Его в смеси с пФА диализовали против G-буфера параллельно с чистым пФА. В качестве контроля такие же пробы диализовали против раствора с ионной силой 75 mM KCl. В результате

полимерный актин, который диализовали против G-буфера после высокоскоростного центрифугирования почти весь был в супернатанте, т.е. перешёл в G-форму (рис. 5А). Контрольный препарат, который диализовали против 75 мМ КСl, при этом полностью был осаждён (рис. 5В). В осадке так же наблюдали и комплекс актина с тропомиозином, который диализовали против DS/75 (рис. 5Г). Однако, в случае комплекса актина с тропомиозином, который диализовали против G-буфера, было деполимеризовано лишь около половины актина (рис. 5Б). Таким образом, было показано, что кальпонин может оказывать небольшое влияние на деполимеризацию актина, в то время как тропомиозин её значительно ингибирует.

## 2. Актин гладких мышц мидии и актин скелетных мышц кролика имеют схожие свойства

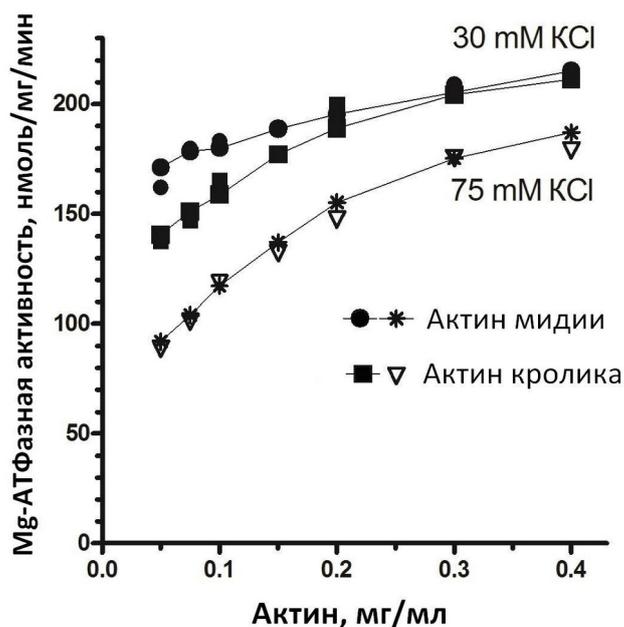
Несмотря на известную консервативность актина, после получения его глобулярной формы из запираемых мышц мидии *S. grayanus*, его было необходимо сравнить с актином скелетных мышц, полученным по классической методике. В первую очередь, мы выяснили, что актины были способны к полимеризации и деполимеризации в одинаковых условиях. Полимеризация является важным свойством не инактивированного актина, так как связана с его функционированием в *in vitro* моделях и в живой клетке. Кинетику полимеризации актинов мы определяли по изменению светорассеяния раствора, в котором происходит переход актина из G-формы в F-форму после добавления полимеризующего раствора. Было показано, что в одинаковых условиях кинетика полимеризации актинов мидии и кролика практически совпадает (рис. 6).



**Рисунок 6** – Кинетика полимеризации актина мидии и актина кролика, регистрируемая при помощи светорассеяния.

В растворе (мМ): 1.2 АТФ, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 1 DTT, 3 NaN<sub>3</sub>, 5 трис–НСl (рН 7.5); концентрация G-актина: 0.84 мг/мл; полимеризацию запускали добавлением КСl до 25 мМ и MgCl<sub>2</sub> до 2 мМ при 25°С. Представлены средние значения данных трёх измерений.

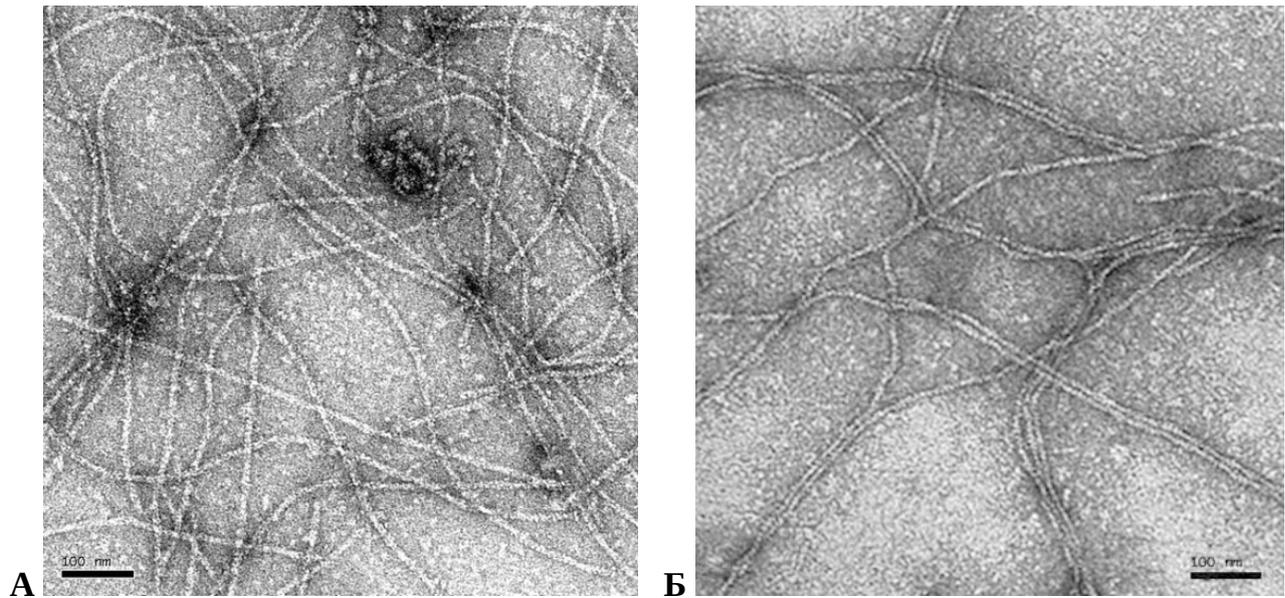
Другим важным свойством актина является его способность активировать миозиновую  $Mg^{2+}$ -АТФазу в синтетическом актомиозине. Это свойство актина является ключевым в исследованиях сократительных систем. Мы не обнаружили отличий между актином мидии и актином кролика при тестировании  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности скелетномышечного миозина при физиологической ионной силе (рис. 7): они одинаково активируют миозин в растворе, содержащем 75 мМ КСl. При этом некоторые отличия в активировании АТФазы наблюдаются при переходе к пониженной ионной силе (30 мМ КСl) в области низких концентраций актина (менее 0.15 мг/мл).



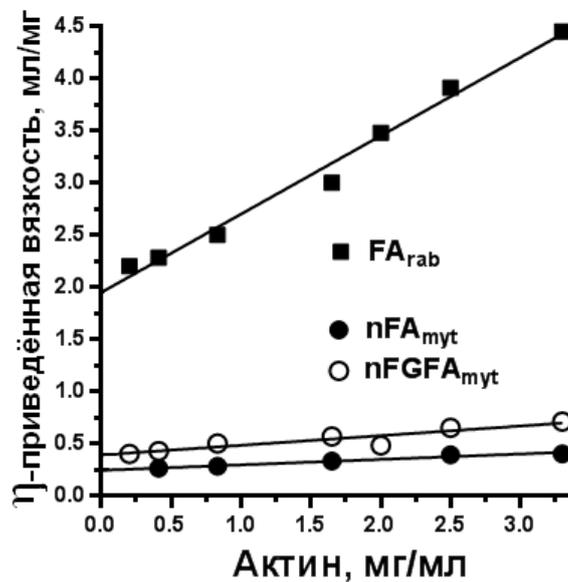
**Рисунок 7** – Активация  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности миозина кролика "природным" актином мидии и штраубовским актином кролика при разной ионной силе раствора (75 мМ или 30 мМ КСl), рН 7.0, 0.4 мМ АТФ, 25°C. Представлены средние значения результатов трёх измерений.

Методами электронной микроскопии были получены микрофотографии полимеров актина *S. grayanus* (рис. 8А). Сравнение изображений полимерного актина гладких мышц мидии и полимерного актина поперечнополосатых мышц кролика не выявило видимых морфологических отличий в их структуре (рис. 8).

Однако мы обнаружили значительные отличия при тестировании вязкости их растворов. На рисунке 9 представлены зависимости приведённой вязкости от концентрации белка и экстраполяция к нулевой концентрации для определения характеристической вязкости (пересечение с осью Y). Характеристическая вязкость "природного" гладкомышечного актина мидии значительно, в 6–8 раз, отличалась от таковой штраубовского скелетно-мышечного актина. Процедура реполимеризации лишь незначительно увеличивала вязкость актина мидии (рис. 9, pFGFAMyt) по сравнению с исходным pFA.



**Рисунок 8** – Электронные микрофотографии полимеров "природного" актина мидии *C. grayanus* и полимеров актина кролика. А – актин мидии (2 – 5  $\mu\text{M}$ ) в растворе, содержащем (мМ): 50 KCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 АТФ, 1 DTT, 5 Na-фосфат (pH 7.2), масштабный отрезок 100 нм. Б – актин кролика (17  $\mu\text{M}$ ) (по: Galińska-Rakoczy et al., 2009) в растворе, содержащем (мМ): 2  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 АТФ, 0.5 DTT, 10 HEPES (pH 7.0), масштабный отрезок 100 нм.



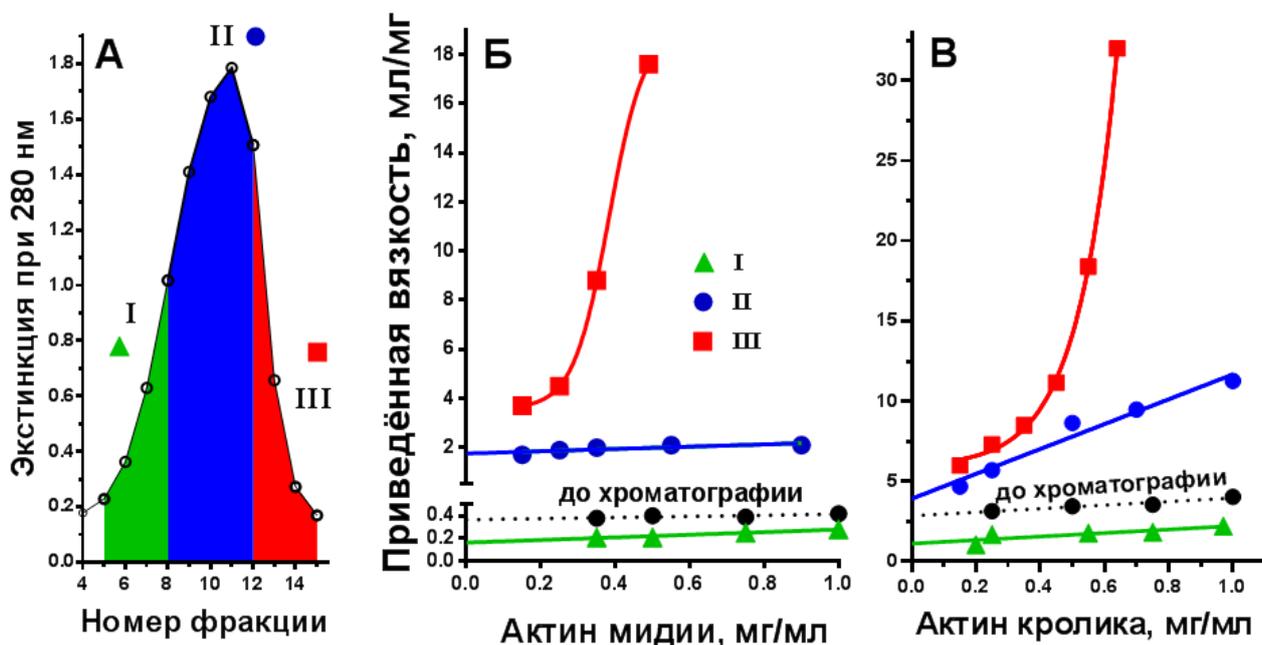
**Рисунок 9** – Приведённая и характеристическая вязкость штраубовского актина кролика (FA<sub>rab</sub>), "природного" актина мидии (nFA<sub>myt</sub>) и переполимеризованного "природного" актина мидии (nFGFA<sub>myt</sub>). В растворе (мМ): 50 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 1.2 АТФ, 0.2  $\text{CaCl}_2$ , 1 DTT, 3  $\text{NaN}_3$ , 5 Трис–HCl (pH 7.5); 23°C. Представлены данные по результатам трёх измерений.

Отличия в вязкости между актинами могут быть объяснены как существованием между ними отличий *per se*, так и могут быть связаны с длиной полимеров актина. Как известно, на длину актинового полимера могут влиять примеси белков концевой

фактора (англ. "capping proteins"), эффект которых значителен даже при их присутствии в минорном количестве. Примеси концевых белков могут быть удалены из препаратов актина в ходе очистки белка на хроматографическом носителе. Для того, чтобы проверить данное предположение, мы рассмотрели отдельно три части пика хроматографии глобулярного актина мидии и кролика.

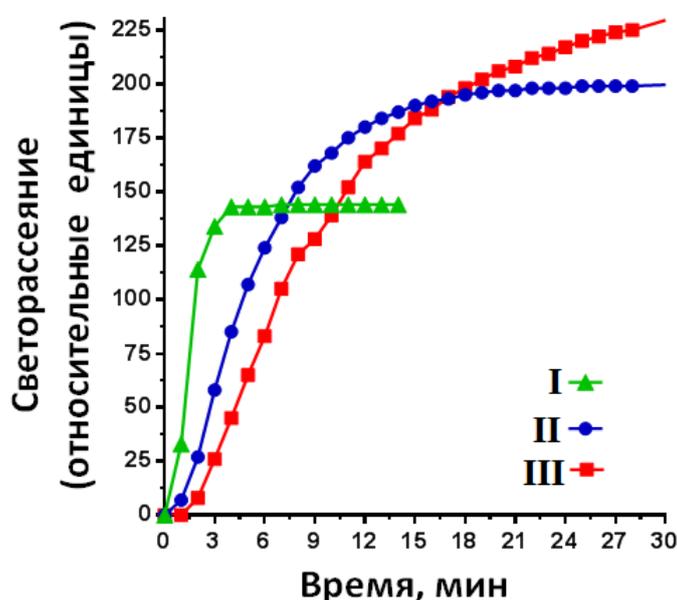
### 3. В препаратах актина содержатся примеси кепирующих белков

Для изучения примесей, которые могут влиять на вязкость актинов из гладких мышц мидии и скелетных мышц кролика, мы разделили пик элюции G-актина на три отдельно объединённые фракции, соответствующие началу элюирования (I), основному выходу белка (II) и окончанию элюирования (III) (рис. 2; рис. 3, дорожки 3–11; рис. 10А). На электрофореграмме мы не обнаружили видимых различий между ними (рис. 3). Однако, тестирование вязкостей актинов этих трёх фракций, переведённых в F-форму, выявило значительные отличия, характерные как для актина мидии, так и для актина кролика (рис. 10Б, В). В качестве контроля измеряли вязкость F-формы дохроматографического актина. Фракция I (начало пика элюции G-актина на хроматографическом носителе) имела самую низкую вязкость, которая оказалась даже ниже вязкости актина до хроматографии (рис. 10).



**Рисунок 10** – Фракционирование актина мидии и актина кролика при помощи гель-фильтрационной хроматографии. Приведённая и характеристическая вязкость дохроматографического актина и разных фракций (I, II и III) пика хроматографии. А – типичная кривая профиля элюции G-актина; Б – вязкость препаратов актина кролика из разных частей хроматографического пика; В – вязкость препаратов актина мидии из разных частей хроматографического пика. В растворе (мМ): 50 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 АТФ, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 1 DTT, 3 NaN<sub>3</sub>, 5 Трис–HCl (рН 7.5) при 23 °С. Представлены средние значения по данным трёх измерений.

Мы предположили, что низкая вязкость полимеров актина в I фракции может быть обусловлена их небольшой длиной. В свою очередь, длина полимеров актина этой фракции, на наш взгляд, может быть связана с присутствием в препарате большего (в отличие от II и III фракции) количества минорных примесей белков концевой фактора, типа  $\beta$ -актинина или CapZ. Для подтверждения предположения о том, что примеси относятся к кепирующим белкам, мы провели сравнение кинетики полимеризации актина из I, II и III фракций (рис. 11). Они отличались по характеру их полимеризации: у III фракции была самая медленная скорость полимеризации и самая высокая её степень. Полимеры III фракции актина имели ярко выраженную тиксотропию (Cooper, Pollard, 1982): вязкость увеличивалась в состоянии покоя и уменьшалась при механическом воздействии. Фракция I полимеризовалась примерно в 1.5–2 раза быстрее двух других, но степень её полимеризации была низкая и тиксотропность почти отсутствовала. У II фракции были промежуточные свойства.

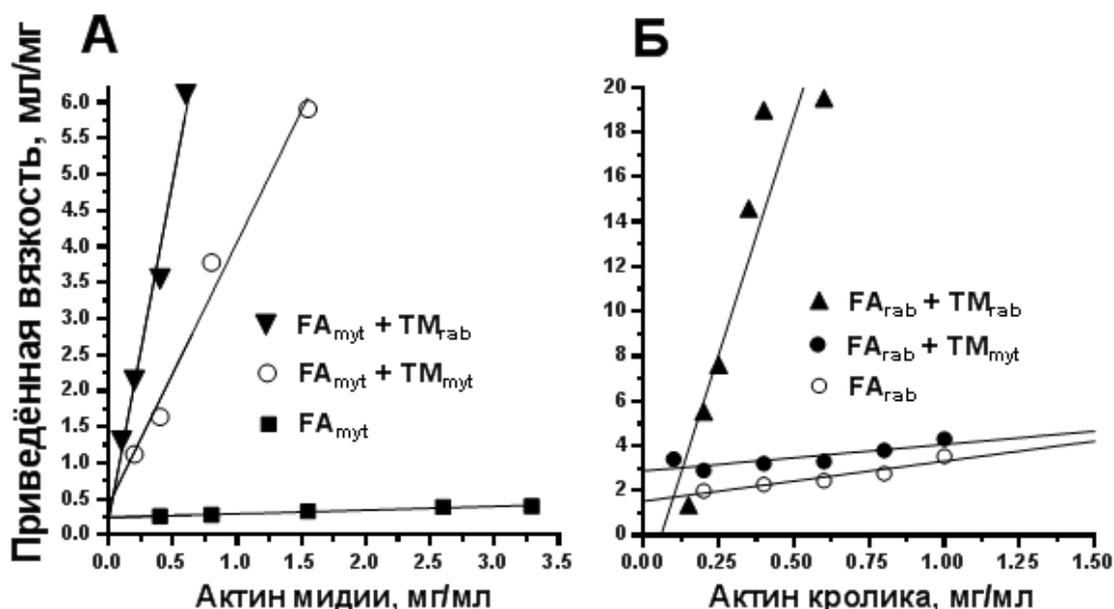


**Рисунок 11** – Кинетика полимеризации актина *S. grayanus* из разных фракций пика хроматографии (I – фракция начала хроматографии, II – фракция середины хроматографии и III – фракция окончания хроматографии). В растворе (мМ): 1.2 АТФ, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 1 DTT, 3 NaN<sub>3</sub>, 5 Трис–HCl (pH 7.5); концентрация G-актина 0.45 мг/мл. Полимеризацию запускали добавлением KCl до 25 мМ и MgCl<sub>2</sub> до 2 мМ при 25°C. Представлены результаты по данным трёх измерений.

Таким образом, было показано, что в хроматографических фракциях актина мидии и кролика присутствует минорный компонент с концевой активностью. Кепирующий белок может оказывать влияние на сократительные модели за счёт уменьшения длины актиновых нитей и, соответственно, влиять на количество актин-миозиновых контактов. Предположительно, примесью является белок  $\beta$ -актинин или белок CapZ (Maruyama et al., 1977; Isenberg et al., 1980; Casella et al., 1987), в дальнейшем это ещё предстоит уточнить.

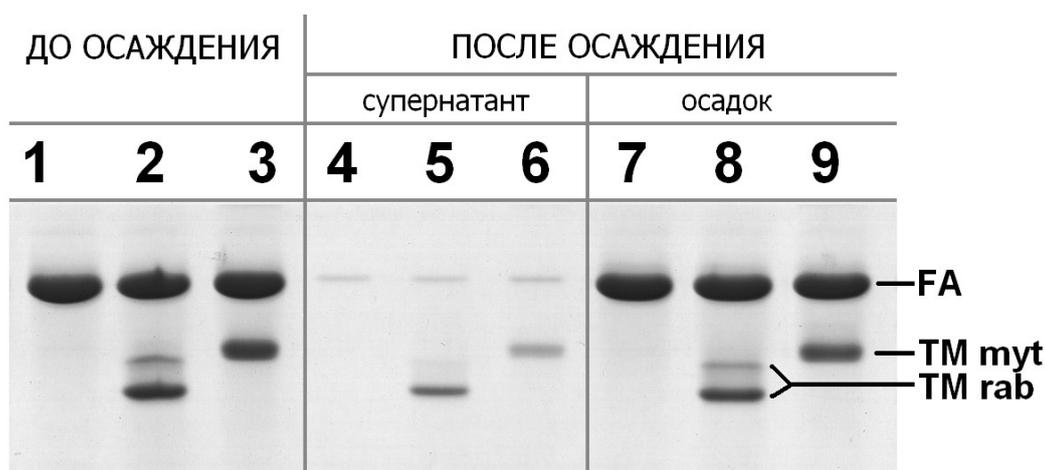
#### 4. Гибридные белковые комплексы не подходят для исследования catch-состояния

На данном этапе работы мы исследовали функциональные свойства актина мидии и актина кролика в гибридных и негибридных комплексах с тропомиозином (рис. 12). Из белков мидии и кролика было сформировано 2 гибридных комплекса: F-актин мидии + тропомиозин кролика (FA<sub>myt</sub>-TM<sub>rab</sub>), F-актин кролика + тропомиозин мидии (FA<sub>rab</sub>-TM<sub>myt</sub>) и 2 негибридных: F-актин мидии + тропомиозин мидии (FA<sub>myt</sub>-TM<sub>myt</sub>), F-актин кролика + тропомиозин кролика (FA<sub>rab</sub>-TM<sub>rab</sub>). В трех случаях (FA<sub>myt</sub>-TM<sub>rab</sub>, FA<sub>myt</sub>-TM<sub>myt</sub> и FA<sub>rab</sub>-TM<sub>rab</sub>) образование белкового комплекса приводило к резкому увеличению приведённой вязкости с сохранением значения характеристической. Исключением являлось лишь гибридное сочетание FA кролика + TM мидии, при образовании которого не происходило увеличения вязкости (рис. 12Б, FA<sub>rab</sub> + TM<sub>myt</sub>). Мы предположили, что актин и тропомиозин в этой смеси либо не образуют комплекс, либо их взаимодействие было слабым и не оказывало влияния на вязкость смеси.



**Рисунок 12** – Приведённая и характеристическая вязкость актина мидии (FA<sub>myt</sub>) и актина кролика (FA<sub>rab</sub>) в присутствии тропомиозина мидии (TM<sub>myt</sub>) и кролика (TM<sub>rab</sub>). А – влияние тропомиозина кролика и мидии на вязкость актина мидии. Б – влияние тропомиозина кролика и мидии на вязкость актина кролика. В растворе (мМ): 50 КСl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 АТФ, 0.2 CaCl<sub>2</sub>, 1 ДТТ, 3 NaN<sub>3</sub>, 5 Трис-НСl (рН 7.5); 23°С при измерении вязкости; соотношение А:ТМ = 4:1 мг/мг (что соответствует 7:1 моль/моль). Представлены средние значения по данным трёх измерений.

Для того чтобы удостовериться в том, что в этой пробе тропомиозин мидии действительно связался с актином кролика, мы провели высокоскоростное осаждение гибридной и негибридной смесей (рис. 13). В осадке вместе с F-актином кролика наблюдали как тропомиозин кролика, так и тропомиозин мидии (рис. 13, дорожки 8 и 9, соответственно). Такое соосаждение при ультрацентрифугировании указывает на прочное связывание с актином кролика тропомиозинов как кролика, так и мидии. Образование комплекса актина кролика с тропомиозином мидии, таким образом, подтверждено, но остаётся не ясным, по какой причине он не увеличивает вязкость актина подобно тропомиозину кролика.



**Рисунок 13** – Взаимодействие фибриллярного актина кролика (FA) и тропомиозинов (TMrab и TMmyt,) в гибридном и в негибридном комплексах (ПААГ-14%). Дорожки 1, 4, 7 – фибриллярный актин кролика. Дорожки 2, 5, 8 – фибриллярный актин кролика + тропомиозин кролика. Дорожки 3, 6, 9 – фибриллярный актин кролика + тропомиозин мидии. В растворе (в mM): 75 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 EGTA, 2 NaN<sub>3</sub>, 2 DTT, 20 Трис–HCl (pH 7.2); соотношение А:ТМ = 4:1 мг/мг (7:1 моль/моль).

Таким образом, было показано, что получаемый по нашей методике актин из запираемых мышц моллюсков, так же как штраубовский актин кролика и "природный" актин мидии, может применяться при реконструкции тонкой нити. Однако гибридная модель с актином кролика и тропомиозином мидии искажает картину взаимодействия актина с тропомиозином в таком типе экспериментов. Вязкость этого комплекса не увеличивалась, возможно, из-за специфического или неполного взаимодействия белков в гибридном комплексе. Ранее уже было показано, что тропомиозин из гладких мышц мидии в сочетании со скелетным миозином кролика придавал аномальные свойства актомиозиновым моделям - значительно ингибировал Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность (Shelud'ko et al., 2015).

Из вышесказанного следует, что для корректного изучения запираемой мышцы (в частности catch-состояния) необходимо использовать негибридные модели. Далее нам было важно протестировать вязкость негибридного комплекса актина с миородом. Миород является белком толстой нити, уникальным для гладких мышц моллюсков, содержащим С-концевую часть схожую с миозином (830 а.к.) и уникальный N-головной домен (156 а.к.). Наш интерес к актин-миородовому взаимодействию объясняется тем, что миород и его взаимодействие с F-актином может быть ключевым моментом в объяснении catch-состояния.

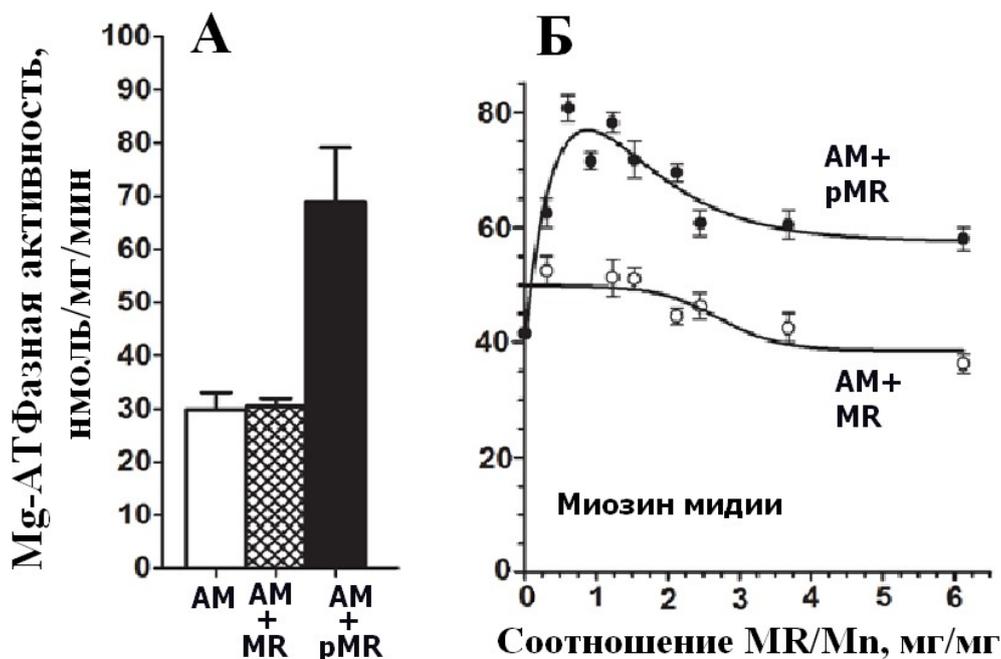
## 5. Миород может являться активным участником в реализации catch-состояния

Миород является уникальным белком запираемой мышцы, вероятно вовлеченным в формирование запираемого тонуса. Выяснение участия миорода в реализации catch-состояния сопряжено с изучением влияния миорода на актомиозиновый комплекс, как на функциональную основу сократительного аппарата. Основной характеристикой актомиозина, позволяющей оценить его функциональную активность, является Mg<sup>2+</sup>-АТФазная активность входящего в него миозина. Поэтому, мы изучали влияние миорода на Mg<sup>2+</sup>-АТФазную активность комплексов, содержащих F-

актин кролика, миозин мидии, а также миород мидии в нефосфорилированном (MR) и фосфорилированном (pMR) состояниях.

При реконструкции сократительного комплекса мы использовали миозин-миородовые сополимеры. Необходимость предварительной сополимеризации этих белков обусловлена тем, что полимеры миорода по структуре и свойствам отличаются от полимеров миозина, несмотря на идентичность их С-концевых участков. Однако при их сополимеризации образуются толстые нити миозинового типа, которые пригодны для реконструкции сократительной системы. Сополимеризацию проводили, смешивая миород и миозин при 500 мМ KCl с дальнейшим понижением ионной силы до физиологических значений – 75–100 мМ KCl (Shelud'ko et al., 2001).

В ходе работы было показано, что фосфорилированный миород увеличивал активность актин-активируемой  $Mg^{2+}$ -АТФазы миозина в два раза, в то время как нефосфорилированный миород её не изменял (рис. 14А). Возможно, это увеличение активности миозина обусловлено взаимодействием фосфорилированного N-концевого домена миорода с головками миозина. Такое взаимодействие может усиливать сродство тонких и толстых нитей и, соответственно, увеличивать количество контактирующих с актином головок миозина.

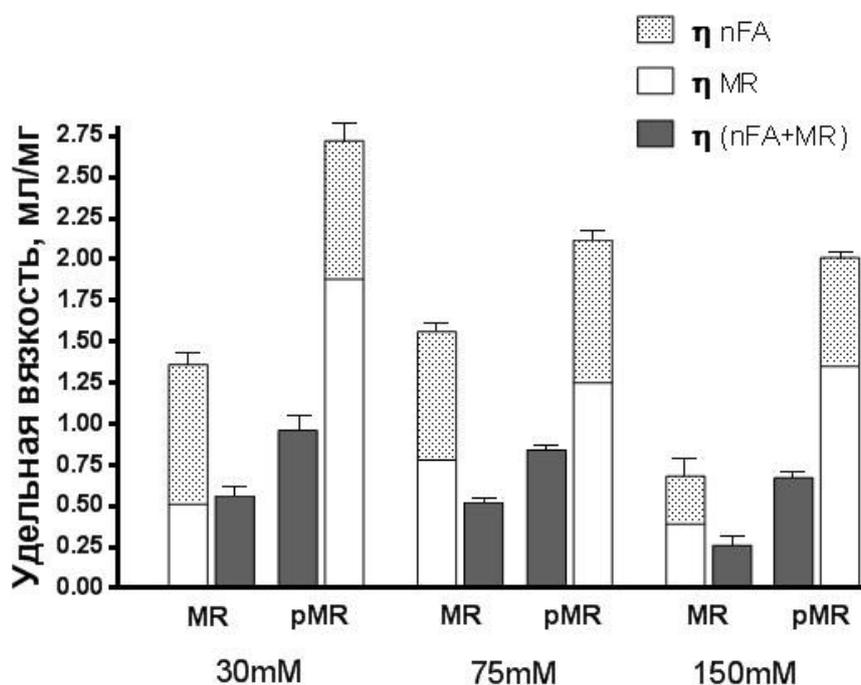


**Рисунок 14** – Влияние фосфорилирования миорода на актин-активированную  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность миозина. А – зависимость  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности миозина от фосфорилирования миорода при реконструкции актомиозина (AM) из сополимеров миозина с миородом, соотношение Mn:MR:FA = 1:1:2. Б – изменения  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности миозина мидии при сополимеризации его с фосфорилированным (pMR) или нефосфорилированным (MR) миородом в различных молярных соотношениях. В растворе (мМ): 100 KCl, 0.5  $MgCl_2$ , 0.5 DTT, 0.1  $CaCl_2$ , 10 имидазол-HCl (pH 7.2); Mn, 0.1 мг/мл; FA, 0.2 мг/мл; pMR и MR, 0.1 мг/мл (для А) и 0.025-0.5 мг/мл (для Б). Представлены средние значения результатов трёх измерений.

При изменении молярного соотношения фосфорилированного миорода к миозину в сополимерах,  $Mg^{2+}$ -АТФазная активность миозина возрастала до соотношения миорода к миозину = 1:1 и далее снижалась (рис. 14Б). Мы предполагаем, что максимальная активность определяется максимальным количеством дополнительных контактов между

миородом и миозином при их эквимолярном соотношении. С другой стороны, это может быть связано с увеличением контактов миорода с актином, однако не совсем ясно, почему такие контакты влияют на  $Mg^{2+}$ -АТФазу миозина. При сополимеризации миозина с нефосфорилированным миородом, активность оставалась неизменной до соотношения MR:Mn = 2:1 и далее снижалась (рис. 14Б). Возможно, это связано с тем, что соседние молекулы миозина более упорядочены при высоком содержании миорода в сополимерах. Тогда связывание и циклирование одной головы миозина по актину оказывает действие на соседние миозин-актиновые поперечные мостики, препятствуя их  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности.

Результаты по влиянию миорода на активность  $Mg^{2+}$ -АТФазы миозина были получены на гибридной модели с использованием актина из скелетных мышц кролика (рис. 14). Для уточнения возможности вовлечения миорода в запирательный тонус посредством миород-актинового взаимодействия, мы при помощи вискозиметрии изучали негибридный комплекс F-актина мидии с миородом. Мы измеряли вязкости F-актина, нефосфорилированного и фосфорилированного миорода (MR и pMR) по отдельности и в смеси (рис. 15). Было выявлено, что при измерении вязкости при низких силах сдвига сумма вязкостей отдельно измеренных белков (рис. 15, столбики, состоящие из двух типов штриховки) в 2–3 раза больше, чем вязкость их смеси (рис. 15, тёмные столбики). Снижение вязкости при смешивании полимеров свидетельствовало о взаимодействии этих белков. При этом фосфорилирование миорода приводило к увеличению вязкости в полтора-два раза:  $\eta(pMR)/\eta(MR) = 1.7, 1.6$  и  $2.6$  для и.с. 30, 75 и 150 мМ KCl, соответственно; в комплексе с актином ( $\eta(pMR+nFA)/\eta(MR+nFA) = 2.0, 1.4$  и  $1.5$  для и.с. 30, 75 и 150 мМ KCl, соответственно). В представленном диапазоне физиологических ионных сил результаты зависимости схожи, что может говорить об устойчивом и физиологичном взаимодействии актина с миородом.



**Рисунок 15** – Вязкость актина и миорода *S. grayanus* по отдельности и в смеси. nFA – "природный" актин мидии, 0.2 мг/мл; pMR и MR – фосфорилированный и нефосфорилированный миород, 0.1 мг/мл; среда с ионной силой 30, 75 и 150 мМ KCl, в присутствии 0.2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Представлены средние значения результатов трёх измерений.

Проиллюстрированное таким образом актин-миородовое взаимодействие, наряду с увеличением  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности сократительной системы при фосфорилировании миорода, может свидетельствовать о вовлечённости миорода во взаимодействие между тонкими и толстыми нитями. Недавно было показано, что содержание миорода в запирающих мышцах мидии *S. grayanus* количественно сопоставимо с содержанием миозина (Vyatchin et al., 2019). Таким образом, миород может быть активным игроком при реализации запирающего тонуса наряду с твитчином и миозином и даже оказаться искомым "мостиком", а именно – "сшивать" толстые и тонкие нити во время развития catch-состояния.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе был впервые получен и хроматографически очищен глобулярный актин из гладких мышц мидии *S. grayanus*. Это стало возможным благодаря пересмотру устоявшейся методики получения "природного" F-актина из гладких мышц моллюсков. В первую очередь, оказалось важным введение в раствор для экстракции тонких нитей 15 mM АТФ и 5 mM пиродифосфата натрия ( $Na_4P_2O_7$ ) с последующим повышением ионной силы до 0.6 M KCl. Совместно с серией центрифугирований, такой подход к экстракции позволил получить pFA, способный к деполимеризации в низкоионном растворе. Полученный таким образом глобулярный актин мидии впервые был очищен на хроматографическом носителе "Sephadex G-100".

Было обнаружено значительное сходство между актином из гладкой мышцы беспозвоночных (мидия) и актином скелетной мышцы позвоночных (кролик) по основным физико-химическим и биохимическим свойствам их глобулярной и фибриллярной форм. Однако были выявлены отличия в вязкости F-форм этих актинов. При этом в ходе хроматографической очистки был обнаружен фактор, влияющий на кинетику полимеризации и на вязкость F-актина. Изучение литературы позволило предположить, что это может быть белок концевой фактора типа CapZ ( $\beta$ -актинин) или тропомодулин.

При тестировании вязкости F-форм актинов мидии и кролика в гибридных и негибридных комплексах с тропомиозинами, было показано, что гладкомышечный тропомиозин мидии не влияет на вязкость F-актина скелетных мышц кролика. Это коррелирует с полученным ранее эффектом ингибирования активности миозиновой АТФазы в синтетических гибридных сократительных моделях. Это ингибирование АТФазной активности (до 90%) происходило при сочетании миозина кролика с тропомиозином мидии независимо от источника актина; в случае тропомиозина кролика такого ингибирующего действия не было. Поэтому, для корректного изучения catch-состояния гладких мышц двустворчатых моллюсков, при реконструкции тонких и толстых нитей не рекомендуется создавать гибридные комплексы, заменяя белки моллюсков (актин, тропомиозин или миозин) на белки кролика. Такие замены влияют на сродство и кинетику белок-белковых взаимодействий, что может существенно исказить полученные результаты.

При тестировании вязкости F-актина мидии в комплексе с полимерным миородом мидии была показана зависимость их взаимодействия от состояния фосфорилирования миорода. Обнаруженное значительное активирование  $Mg^{2+}$ -АТФазной активности актомиозина при фосфорилировании миорода позволяет говорить о регулируемом фосфорилированием вовлечении миорода в процесс взаимодействия синтетических тонких и толстых нитей.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения глобулярного актина из тонких нитей запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* по оригинальной методике – без использования денатурирующих агентов – что позволило получить хроматографически чистый белок в количествах, достаточных для проведения биохимических исследований сократительных систем *in vitro*.

2. Сравнение физико-химических и биохимических свойств актина мидии *Crenomytilus grayanus* со скелетномышечным актином кролика *Oryctolagus cuniculus* показало значительное их сходство. Актин моллюсков достоверно отличался от актина позвоночных только показателями вязкости полимеров, что может быть связано с примесями ещё неидентифицированного белка концевое фактора.

3. При тестировании гибридных и негибридных комплексов F-актин + тропомиозин было обнаружено, что тропомиозин моллюсков не увеличивал вязкость актина позвоночных, что коррелирует с полученным ранее эффектом ингибирования активности миозиновой АТФазы в гибридных моделях. Это подтверждает тезис о том, что для корректного изучения catch-состояния гладких мышц двустворчатых моллюсков необходимо использовать только негибридные модели.

4. Подтверждено, что F-актин из мышц мидии взаимодействует с полноразмерным миородом зависимым от фосфорилирования образом. В сократительных моделях фосфорилированный миород увеличивает  $Mg^{2+}$ -АТФазную активность миозина и может играть важную роль в реализации catch-механизма – быть белковым "мостиком", сшивающим толстые и тонкие нити.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:*

1. Matusovsky O.S., **Shevchenko U.V.**, Matusovskaya G.G., Sobieszek A., Dobrzhanskaya A.V., Shelud`ko N.S. Catch muscle myorod modulates ATPase activity of myosin in a phosphorylation-dependent way // PloS One. 2015. V. 10, № 4. Article No. e0125379.
2. Shelud`ko N.S., **Girich U.V.**, Lazarev S.S., Vyatchin I.G. Non-Straub type actin from molluscan catch muscle // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016. V. 474, № 2. P. 384–387.

### *Работы в других журналах и в материалах конференций:*

3. **Girich U.V.**, Lazarev S.S., Vyatchin I.G., Matusovsky O.S., Shelud`ko N.S. Natural actin and tropomyosin from molluscan catch muscle // Journal of Physical Chemistry and Biophysics. 2017. V. 7, № 2. Article No. A1000249.
3. **Shevchenko U.V.**, Shelud`ko N.S. Non-straub type G-actin from molluscan smooth muscle: comparison with mytilus "natural" F-actin and straub type rabbit skeletal actin // Proceedings of International Symposium "Biological motility: new facts and hypotheses" (Puschino, May 11–15, 2014). Puschino: ITEB RAS, 2014. P. 258–260.
4. **Girich U.V.**, Shelud`ko N.S. Comparison of the properties of "natural" molluscan actin with Straub-type rabbit actin // Proceedings of International Symposium "Biological motility" (Puschino, May 12–14, 2016). Puschino: Synchrobook, 2016. P. 71–72.
6. **Шевченко У.В.** Свойства "природного" актина запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Годичная научная конференция Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 22–23 апреля 2019: сборник материалов. Владивосток: Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, 2019. С. 151–156. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41424243>.

ШЕВЧЕНКО  
Ульяна Владимировна

**АКТИН ЗАПИРАТЕЛЬНОЙ МЫШЦЫ МИДИИ *CRENOMYTILUS GRAYANUS*:  
ОСОБЕННОСТИ ОЧИСТКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ТРОПОМИОЗИНОМ И  
МИОРОДОМ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук