

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Шелудько Николай Семёнович

ВЛАДИВОСТОК – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Мышечная подвижность, теория "скользящих нитей" и исключения из неё.....	13
1.2. Белки тонких и толстых нитей.....	15
1.2.1. Тонкие нити.....	16
1.2.1.1. Актин.....	16
1.2.1.2. Тропомиозин.....	21
1.2.2. Толстые нити.....	25
1.2.2.1. Миозин.....	26
1.2.2.2. Миород.....	29
1.2.2.3. Твитчин.....	32
1.3. Особенности функционирования гладких запирательных (catch) мышц моллюсков.....	33
1.4. Гипотезы реализации catch-механизма.....	35
1.4.1. "Мостиковая".....	36
1.4.2. "Парамиозиновая".....	36
1.4.3. "Твитчиновая".....	37
1.4.4. "Миородовая".....	39
1.4.5. "Кальпониновая".....	40
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Экспериментальные методы	
2.1.1. Выделение сократительных белков из запирательных мышц мидии.....	42
2.1.2. Выделение сократительных белков из скелетных мышц кролика.....	45
2.1.3. Реконструкция белок-белковых моделей.....	47

2.2. Биохимические методы	
2.2.1. Гель-фильтрационная хроматография.....	49
2.2.2. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле.....	49
2.2.3. Фосфорилирование миорода.....	51
2.2.4. Определение концентрации белков.....	51
2.2.5. Определение Mg^{2+} -АТФазной активности миозина.....	52
2.3. Физико-химические методы	
2.3.1. Измерение вязкости.....	53
2.3.2. Высокоскоростное осаждение белковых комплексов.....	54
2.3.3. Измерение рассеяния света.....	54
2.3.4. Полимеризация лиофилизированного G-актина мидии в F-актин.....	54
2.4. Электронная микроскопия.....	55
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	
3.1. Получение глобулярной формы актина из запирающих мышц двустворчатых моллюсков.....	56
3.1.1. Очистка глобулярного актина мидии при помощи гель- фильтрации.....	59
3.1.2. Факторы, ингибирующие деполимеризацию "природного" актина мидии.....	60
3.2. Сравнение гладкомышечного актина моллюсков со скелетномышечным актином позвоночных животных.....	63
3.2.1 Молекулярная масса и электронная микроскопия актина из мышц мидии и актина из мышц кролика.....	63
3.2.2. Кинетика полимеризации актина мидии и актина кролика.....	64
3.2.3. Активирование актином мидии и актином кролика Mg^{2+} -АТФазной активности скелетномышечного миозина.....	64
3.2.4. Тестирование вязкости растворов актина из мышц мидии и актина из мышц кролика.....	65

3.3. Хроматографические фракции гладкомышечного актина моллюсков и скелетномышечного актина позвоночных могут иметь примеси белков концевых факторов.....	67
3.4. Измерения вязкости полимерного актина мидии в присутствии тропомиозина в гибридных и негибридных комплексах.....	70
3.5. Актин как основа тонкой нити в сократительных моделях и его взаимодействие с миородом в зависимости от фосфорилирования миорода.....	72
3.5.1. Очистка миорода гелевой фильтрацией в присутствии мочевины....	72
3.5.2. Влияние фосфорилирования миорода на Mg^{2+} -АТФазную активность миозина мидии в гибридном комплексе с актином кролика....	74
3.5.3. Вязкость негибридного актин-миородового комплекса.....	76
4. ОБСУЖДЕНИЕ	
4.1. Гладкомышечный актин из запирающих мышц моллюсков: особенности выделения, очистки и деполимеризации.....	78
4.2. О свойствах гладкомышечного актина моллюсков и скелетномышечного актина позвоночных, их вязкости и примесях.....	83
4.3. Тропомиозин мидии проявляет необычные свойства в гибридных комплексах с актином кролика.....	89
4.4. Взаимодействие F-актина и миорода в <i>in vitro</i> моделях	93
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- А – актин
 АА – акриламид
 АДФ – аденозиндифосфат
 АТФ – аденозинтрифосфат
 АМ – актомиозин
 ВИС – высокая ионная сила
 ДСН – додецилсульфат натрия
 кДа – килодальтон
 КЛЦМ – киназа лёгких цепей миозина
 ПААГ – полиакриламидный гель
 СА – сульфат аммония
 ТХУ – трихлоруксусная кислота
 ТНН – нативные тонкие нити
 цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
 bis-AA – N,N'-метилен-бис-акриламид
 β-MET – β-меркаптоэтанол
 CaP – кальпонин
 DTT – дитиотреитол
 EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота
 EGTA – триэтиленгликольдиаминтетрауксусная кислота
 F_{Arab} – фибриллярный актин кролика
 F-актин, F-форма, FA – фибриллярная форма актина
 G-актин, G-форма, GA – глобулярная форма актина
 LPN – леупептин
 Mg²⁺-АТФазная активность – актин-активируемая Mg²⁺-зависимая АТФазная активность миозина
 M_n – миозин
 MR – миород
 nFA, nFA_{mut} – "природный" фибриллярный актин мидии
 nGA – глобулярный актин мидии из nFA
 P_i – неорганический фосфат
 pMR – фосфорилированный миород
 PMSF – фенилметилсульфонилфторид
 PSA – пероксодисульфат аммония
 TEMED – тетраметилэтилендиамин
 ТМ – тропомиозин
 Тп – тропонин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Биологическая подвижность является важной характеристикой всего живого на нашей планете. У многоклеточных животных для реализации функции движения наблюдается тканевая специализация, представленная в виде мышечных волокон или отдельных клеток (поперечнополосатая и гладкая мышечная ткань). Свойства основных и состав 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.

В мышцах при помощи молекулярного сократительного аппарата и его основной единицы, саркомера, представляющего собой упорядоченную структуру из толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) нитей, обеспечивается 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, Niedergerke, 1954; Huxley, Hanson, 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 *in vitro* простым и проверенным способом изучения 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 мидии из гладкой мышцы и актин кролика из поперечнополосатой мышцы) 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 принято использовать актин из поперечнополосатых скелетных мышц позвоночных животных вместо гладкомышечного актина мидии. Такой замене есть объяснение: существует оптимальная процедура очистки G-формы актина из скелетных мышц позвоночных, позволяющая получить белок в препаративных количествах, устойчивый при комнатной температуре и к процедуре лиофилизации. Замена актина мидии актином позвоночных при реконструкции сократительных моделей обосновывалась 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; Vahokoski et al., 2014). До выполнения данной работы G-форму актина из мышц мидии не могли получить и использовали только "природный" F-актин мидии – nFA.

Однако в ходе исследований выяснилось, что использование гибридных моделей, состоящих из белков мидии и кролика, может искажать экспериментальные результаты, что в конечном итоге приводит к ошибочным выводам. В данной работе мы исследуем уникальное состояние гладких мышц двустворчатых моллюсков (catch), при котором нюансы биохимических свойств

белков могут быть принципиальны для выяснения их функциональной активности, поэтому замена белков и формирование гибридных сократительных моделей может существенно изменить картину белок-белкового взаимодействия.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключается в формировании 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 работе была разработана оригинальная методика получения, деполимеризации и очистки глобулярной формы актина мидии *Crenomytilus 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. Методика включала этап обработки фракции тонких нитей раствором с высокой ионной силой в присутствии АТФ и пиррофосфата натрия. В результате обработки и последующего высокоскоростного осаждения был получен препарат F-актина мидии, который сохранял способность

к деполимеризации и реполимеризации *in vitro*, подобно Штраубовскому актину скелетных мышц кролика (Straub, 1942a), но без обработки ацетоном. 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 актина из мышц мидии.

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 сильно отличающимися способами экстракции, будут далее вести себя одинаково. И действительно – было выявлено отличие в вязкости между F-формой исследуемых актинов.

Показано, что гладкомышечный тропомиозин мидии не влияет на вязкость скелетного F-актина, поэтому при реконструкции тонких и толстых нитей для изучения catch механизма, нельзя проводить замену актина, тропомиозина и миозина в гибридных моделях. Такие замены в гибридных моделях 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 в гладких мышцах моллюсков, с актинами из скелетных мышц кролика и гладких мышц мидии. При этом миород находился в нефосфорилированном и фосфорилированном состояниях. Это позволило нам *in vitro* подтвердить существование регулируемого фосфорилированием миород-опосредованного взаимодействия между тонкими и толстыми синтетическими нитями.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученный материал представляет интерес с точки зрения расширения познаний в области изучения функциональных особенностей запирательной мышцы двусторчатых моллюсков и обогащения фундаментальных знаний об уникальном феномене

catch-состояния. С практической точки зрения, в работе представлена пошаговая методика экстрагирования и очистки белков из запирающей мышцы моллюсков, которая легко воспроизводится в лабораторных условиях. Данная методика применима для экстракции сократительных белков из гладких мышц других беспозвоночных животных. Теоретические знания могут быть внедрены в соответствующие курсы по биохимии белка.

Приведённый в работе анализ и сравнение гибридных и негибридных белок-белковых моделей расставляет некоторые границы применимости *in vitro* метода молекулярного моделирования сократительных систем. 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 применялся 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, 1942a; 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 соосаждении использовали электрофорез в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970; Шелудько, 1975; Shelud'ko et al., 1999). Электронная микроскопия была выполнена Орловой А.А. (Центр медицинских наук университета Вирджинии, США). Актин очищали методом гель-фильтрации на носителе "Sephadex G-100". Кинетику полимеризации оценивали при помощи светорассеивания. 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 выполнении работ по экстрагированию, очистке, подготовке к хранению белковых препаратов из запирающих мышц мидии Грея; 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.

Положения, выносимые на защиту:

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

2. Физико-химические свойства гладкомышечного актина моллюсков схожи со свойствами скелетномышечного актина позвоночных; значительное отличие обнаружено в значениях вязкости между полимерами этих актинов, которое 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 обеспечивалась оригинальными подходами к экстракции и очистке белков из свежей запирающей мышцы мидии Грея *Crenomytilus grayanus*. Достоверность результатов определяется использованием классических биохимических и физико-химических методов исследования сократительных белковых систем, обеспечивающих выполнение 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, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019). По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 2 статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования.

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 ДВО РАН 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.

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

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Мышечная подвижность, теория "скользящих нитей" и исключения из неё

Подвижность в разных её проявлениях является характеристикой живых организмов. В процессе эволюции животного мира произошла дифференциация мышечных клеток, в которых функция белков заключается в генерации движения за счет гидролиза АТФ. Рабочей единицей в мышечных клетках являются саркомерные структуры, состоящие из тонких и толстых нитей. Основой тонкой нити является белок актин, в основе толстой нити – белок миозин. В процессе взаимодействия этих нитей в ходе сокращения движущую силу обеспечивает актин-миозиновое взаимодействие. Скольжение толстых и тонких нитей друг относительно друга совершается за счет энергии, выделяемой при гидролизе АТФ.

Mg^{2+} -АТФазная активность миозина - это способность миозина к гидролизу АТФ до АДФ и неорганического фосфата (Pi). Гидролиз сопровождается высвобождением энергии макроэргической связи, которая расходуется на конформационное изменение положения головы миозина для осуществления механического перемещения тонкой нити. Открытие Mg^{2+} -АТФазной активности миозина было сделано Энгельгардтом и Любимовой (Энгельгардт, Любимова, 1939), которые показали, что препараты миозина способны расщеплять АТФ. Ими было также показано, что добавление АТФ к белковому препарату, состоящему из нитей миозина, влияет на его механические свойства. Вскоре после этого Сент-Дьёрди установил, что в растворе актин и миозин образуют актомиозиновый комплекс (Szent-Györgyi, 1942).

Состояния сокращения и расслабления мышц объясняются теорией Хаксли о мышечном сокращении, которая называется так же моделью "скользящих нитей". Она была основана на исследованиях структуры мышечных волокон методами рентгеноструктурного анализа, оптической и электронной микроскопии (Huxley, Niedergerke, 1954; Huxley, Hanson, 1954). В модели "скользящих нитей" можно выделить следующие важные моменты: при сокращении мышцы, длина и

толстых и тонких нитей остаётся без изменений; при этом длина саркомера уменьшается за счет перекрывания толстых и тонких нитей, которые скользят друг относительно друга во время акта сокращения; развиваемая мышцей сила создается в процессе скольжения соседних нитей вдоль друг друга во встречном направлении. При этом изменение содержания ионов кальция внутри мышечной клетки является посредником между иннервацией и сокращением или расслаблением: при увеличении концентрации Ca^{2+} в саркоплазме происходит сокращение саркомера, а при уменьшении – расслабление (Szent-Gyorgyi, 1975).

Однако из модели "скользящих нитей" известно несколько исключений:

1. Catch-состояние (англ. catch, "схватывать") - запирающий тонус гладких мышц двустворчатых моллюсков, описан более 100 лет назад (Parnas, 1910; Twarog, 1967). Проявляется в виде сохранения напряжения в течение длительного времени (часы, сутки) без затраты энергии АТФ после уменьшения концентрации Ca^{2+} в саркоплазме (при состоянии расслабления).

2. Latch-состояние (англ. latch, "защёлка") - замедленное расслабление гладких тонических мышц позвоночных (Dillon et al., 1981). Проявляется как поддержание тонического напряжения после прекращения процесса активного сокращения - без затраты энергии АТФ и при уменьшении концентрации Ca^{2+} . В отличие от catch, напряжение в latch сохраняется не так длительно и сопровождается постепенным расслаблением, тогда как catch сохраняет устойчивое состояние "захлопнутого" тонуса.

Общепринятая модель "скользящих нитей" не может объяснить такие функции сократительного аппарата. Для catch и latch в условиях, при которых, согласно теории скольжения, должно было наступить расслабление (при существенном снижении концентрации ионов Ca^{2+}) довольно длительное время сохраняется высокое изометрическое напряжение - аналог сокращённого состояния. Возникает вопрос - могут ли данные особенности объясняться структурно-функциональными особенностями данных мышц?

Гладкомышечные клетки не имеют упорядоченных саркомеров, характерных для поперечнополосатых мышц, однако содержат все основные их

компоненты: актин, миозин и плотные Z-тела (образования, аналогичные Z-дискам). При этом, тонкие нити состоят из актина и тропомиозина, имеют диаметр около 7 нм и взаимодействуют с содержащими α -актинин Z-телами, которыми сократительный аппарат прикреплен к клеточной мембране (Small, Gimona, 1998; Gunst, Tang, 2000). Гладкие мышцы обладают свойствами, которые не наблюдаются в поперечнополосатой мышце. Например, они способны к созданию переменной силы на определенной длине, что означает, что регулируется количество генерирующих силу поперечных мостиков. Так же, гладкие мышцы создают переменное соотношение скорости к нагрузке, подразумевающее, что регулируется и скорость циклирования поперечных мостиков (Strauss, Murphy, 1996).

В нашей работе мы изучали catch-состояние на примере работы сократительной модели, реконструированной из белков, выделенных из мускула-замыкателя мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*, отряд *Mytilida*, класс *Bivalva*, тип *Mollusca*, подтип *Invertebrata*). Мускул-замыкатель относится к типу гладких мышц и обладает выраженной способностью к catch. Для сравнения, в ряде экспериментов были использованы белки, выделенные из скелетных мышц кролика (*Oryctolagus cuniculus*, *Vertebrata*).

1.2. Белки тонких и толстых нитей

Ранее наибольший интерес исследователей вызывали толстые нити из-за их относительно больших размеров: диаметром до 100 нм и длиной 50-100 мкм (Lowy, Hanson, 1962; Sobieszek, 1973; Chantler, 1983; Pepe et al., 1986) и уникального белкового состава. В качестве основы толстой нити выступает белок параамиозин (Winkelman, 1976), на поверхности которого, за счет различных нековалентных связей и электростатических взаимодействий, с определённой периодичностью располагаются белки: миозин (Harrison et al., 1971), твитчин (Vibert et al., 1993a; Vibert et al., 1993b) и миород (Shelud'ko et al., 1999). Однако в ходе исследований запирающей мышцы всё больший интерес стала вызывать тонкая нить, основой которой является полимерный актин (Lowy, Vibert, 1967), на

поверхности которого расположены белки тропомиозин (Woods, Pont, 1971), кальпонин (Funabara et al., 2001b) и тропониновый комплекс (Vyatchin et al., 2015).

1.2.1. Тонкие нити

Тонкие нити (актиновые филаменты) являются одной из важнейших внутриклеточных структур не только в мышечных клетках, но и в немышечных клетках, так как помимо участия в реализации двигательной функции сократительного домена они так же составляют цитоскелетный домен клеток. В гладких мышцах актиновые нити расположены неупорядоченно, и их количество намного превышает количество толстых нитей (Sobieszek, 1973), соотношение тонких нитей к толстым нитям составляет около 15:1, тогда как в поперечнополосатых мышцах 2:1 (Murphy, 1976).

Белки, входящие в состав тонких нитей запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus*, достаточно хорошо изучены и разработаны методы выделения "природного" актина (Shelud'ko et al., 2016), тропомиозина (Shelud'ko et al., 2016), тропонинового комплекса (Vyatchin et al., 2015) и кальпонины (Dobrzhanskaya et al., 2013). Ранее считалось, что в тонких нитях мышц моллюсков отсутствует тонконитевая тропониновая Ca^{2+} -зависимая регуляция (Chiba et al., 1992; Lehman, 1981). Однако белки тропонинового комплекса были идентифицированы в гладких мышцах некоторых видов двустворчатых моллюсков (Nishita et al., 1997; Odjima, Nishita 1986a; Odjima, Nishita, 1986b; Vyatchin et al., 2015). Так же в запирающей мышце двустворчатых моллюсков в составе экстрагируемых тонких нитей был обнаружен белок кальпонин; при этом отсутствует характерный для скелетных мышц позвоночных животных белок кальдесмон, который принимает участие в Ca^{2+} -зависимой регуляции (Dobrzhanskaya et al., 2013).

1.2.1.1. Актин

Актин является белком, экспрессируемым практически во всех органах и тканях животных и растений и является одним из самых консервативных белков

эукариот (Pollard, Cooper, 1986; Hooper, Thuma, 2005). Название актин получил из-за способности активировать гидролиз АТФ АТФазой миозина (Энгельгардт, Любимова, 1939). Для клетки жизненно важна структурная и динамическая роль актина, так как он является основным компонентом цитоскелета. Оба эти свойства зависят от его способности к образованию нитевидных структур.

Аминокислотная последовательность актина обладает высокой степенью консервативности (Elzinga et al., 1973; Vandekerckhove, Weber, 1978; Vandekerckhove, Weber, 1979; Vandekerckhove, Weber, 1984; Bershadsky et al., 1988; Hooper, Thuma, 2005; Perrin, Ervasti, 2010; Muller et al., 2013). Различия в аминокислотной последовательности у разных актинов, как в пределах одного вида, так и межвидовые, крайне незначительны и составляют не более 25 аминокислотных замен. Так, например, шесть известных изоформ актина млекопитающих отличаются друг от друга не более чем на 6%, а соответствующие гомологи из скелетных мышц человека и из цитоплазмы дрожжей менее чем на 10% (Herman, 1993; Khaitlina, 2001; Невзглядова и др., 2007; Vahokoski et al., 2014). Высокий уровень консервативности актина объясняется большим числом взаимодействий между актином и актин-связывающими белками – по приблизительным подсчётам актин может взаимодействовать более чем с 1000 белков разных клеточных компартментов (Guharoy et al., 2013). Наиболее вариабелен N-концевой участок, который при разных заменах аминокислот меняет общий заряд актина, вследствие чего, изоформы актина можно разделить изоэлектрическим фокусированием – существуют α , β и γ изоформы актина (Garrels, Gibson, 1976; Storti et al., 1976; Whalen et al., 1977; Rubenstein, Spudich, 1977). Помимо этого изоформы можно разделить с помощью высоковольтного двухмерного электрофореза N-концевых пептидов, полученных при обработке трипсином (Vandekerckhove, Weber, 1981)

Одна молекула актина состоит из 375 аминокислотных остатков, молекулярная масса 42.2 кДа. Первая атомная структура была получена из анализа кристаллов актина скелетных мышц кролика в комплексе с бычьей ДНКазой I (Kabsch et al., 1990). По данным этого рентгеноструктурного анализа,

молекула актина состоит из двух доменов (малый и большой) с глубокой выемкой между ними. Каждый домен, в свою очередь, состоит из двух субдоменов (рисунок 1, А). Относительная ориентация доменов фиксируется адениновым нуклеотидом (АТФ, АДФ) и связанным двухвалентным катионом (Ca^{2+} , Mg^{2+}), находящимся в стратегическом положении между малым и большим доменом. Нуклеотид и катион металла участвуют в многочисленных взаимодействиях с обоими доменами, способствуя тем самым стабильности молекулы актина.

Важным свойством мономерного актина является его способность к полимеризации: взаимодействие молекул мономерного актина (глобулярного актина, G-актина) друг с другом с образованием линейного полимера (Straub, 1942b; Korn et al., 1987; Bershadsky et al., 1988). *In vitro* G-актин может существовать в растворе с низкой ионной силой. Полимеризация индуцируется добавлением 1 мМ кальция или магния и повышением ионной силы за счет добавления KCl до 100 мМ (Pollard, Craig, 1982; Pollard, Cooper, 1982; Хайтлина, 1985).

У полимерного актина (фибрилярного актина, F-актина) левозакрученная однонитевая спираль (рисунок 1, Б), длина оборота спирали 37 нм, диаметр 6-8 нм. Полимер актина, благодаря упорядоченному распределению асимметричных глобул, является полярной структурой: имеет «+» - быстрорастущий и «-» - медленно растущий концы. Два противоположных конца актинового филамента различаются по скорости присоединения к ним новых глобул (Pollard, Craig, 1982). При избытке G-формы – одновременно происходит полимеризация «+» и «-» концов. Если G-актина недостаточно, то происходит полимеризация «+» конца и деполимеризация «-» конца. Этот процесс называется *тредмиллинг* - движение F-актина за счет одновременного наращивания «+» и диссоциации «-» конца.

Полимеризация актина и поддержание его F-структуры состоит из нескольких процессов (рисунок 1, В). *Нуклеация* - инициация полимеризации, соединение трех G-актинов в т.н. "зародыш"; *элонгация* - наращивание цепи актина путем присоединения G-актина к «+» концу F-актина; *диссоциация* -

укорачивание цепи, деполимеризация актина имеет одинаковую скорость с обоих концов; *фрагментация* (англ. severing) - в результате теплового движения F-актин может фрагментироваться; *стыковка* (англ. annealing) - отдельные фрагменты могут соединяться друг с другом конец в конец.

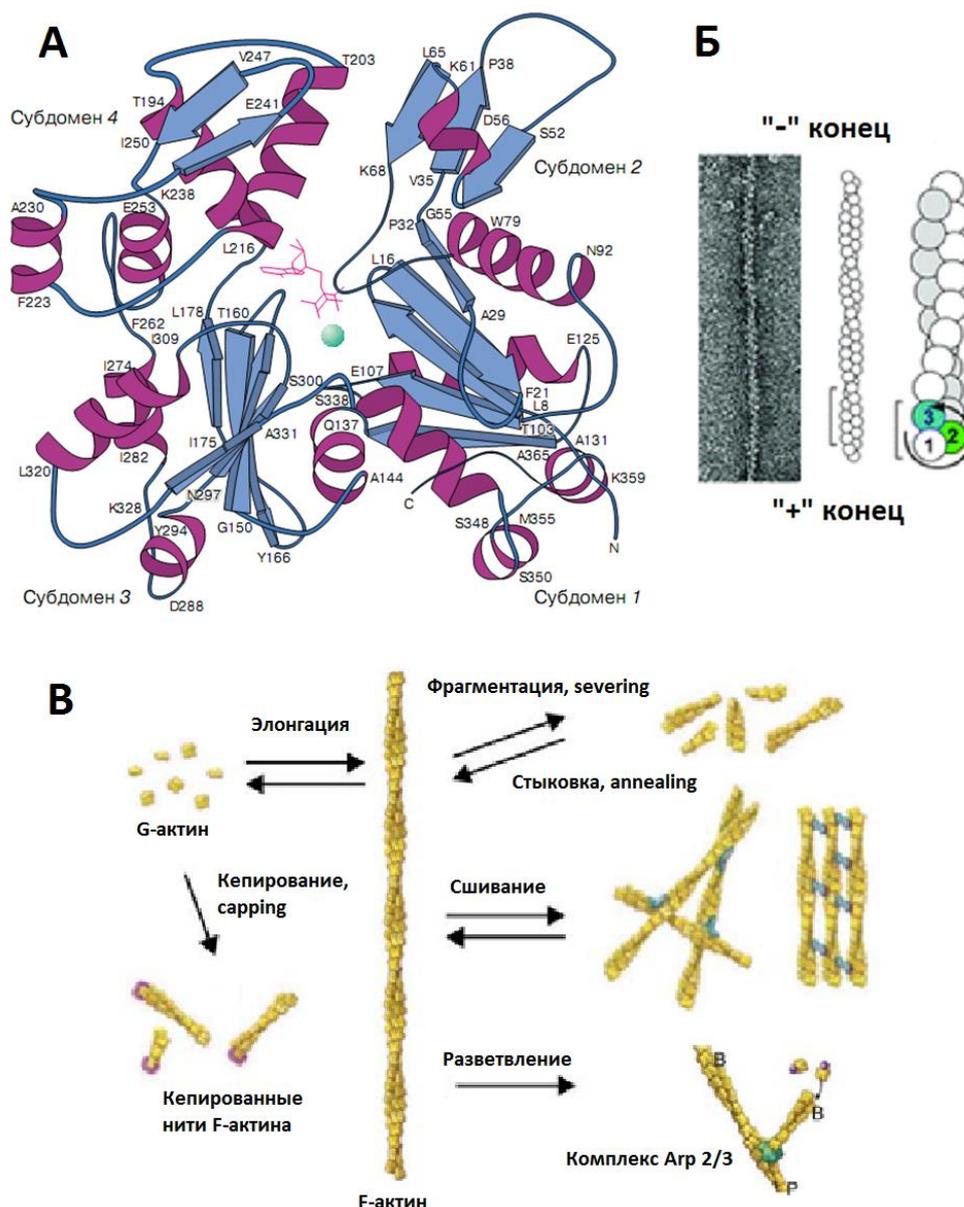


Рисунок 1 – Актин. (А) – трёхмерная структура молекулы глобулярного актина (по: Гусев, 2001); латинскими буквами и цифрами обозначены первые и последние аминокислотные остатки α -спиралей и β -складок, между доменами схематически изображены нуклеотид и ион двухвалентного металла. (Б) – электронная микроскопия одной актиновой нити и схема расположения мономеров внутри F-актина и их спиральной организации (по: Kühn, Mannherz, 2016); цифрами показано отношение мономеров на «+» конце нити. (В) – места взаимодействия актин-связывающих белков на актине (по: Pollard, 2016).

Самопроизвольное формирование филаментов в растворах с физиологическими концентрациями одно- и двухвалентных катионов металлов, проходит в две стадии: *нуклеация* и *элонгация* (Хайтлина, 1985; Bershadsky et al., 1988). Спонтанная полимеризация начинается с *лаг*-фазы, продолжительность которой сильно зависит от концентрации актиновых мономеров. Эта медленная фаза связана с формированием небольших олигомеров (димеров и тримеров), которые служат в качестве затравки для последующего удлинения (Pollard, 2016). Методом компьютерного моделирования было показано, что стадия *нуклеации* состоит из двух этапов: образования димеров, а затем тримеров (Barden et al., 1982; Sept, McCammon, 2001). Полученные димеры и тримеры являются крайне неустойчивыми и легко диссоциируют. Образующийся при добавлении еще одной субъединицы олигомер является более стабильным, по сравнению с димерами и тримерами. Это, по всей видимости, обусловлено тем, что в таком состоянии мономеры актина имеют полный набор межмолекулярных контактов (Pollard, 2016).

Второй стадией полимеризации актина является стадия *элонгации*, во время которой актиновые мономеры преимущественно ассоциируют с любым из концов филамента, а не диссоциируют из них. В результате филамент удлиняется с обоих концов, но с разной скоростью. На быстрорастущем конце скорость процессов ассоциации и диссоциации мономеров гораздо выше, чем на медленно растущем. Через некоторое время между процессами ассоциации и диссоциации мономеров устанавливается динамическое равновесие. Несмотря на непрерывающийся процесс ассоциации и диссоциации мономеров с обоих концов нити, эта фаза, характеризующаяся постоянной длиной актинового филамента, называется *стационарной*. Концентрация свободных актиновых мономеров находящихся в растворе в таком равновесии называется *критической концентрацией* и характеризует соотношение скоростей процессов ассоциации и диссоциации мономеров на филаментах (Hild et al., 2010; Pollard, 2016).

В отличие от ситуации *in vitro*, в клетке регулируются не только скорость и степень полимеризации актина, но и переход от одной стадии полимеризации к

другой. Эта регуляция осуществляется с помощью ряда актинсвязывающих белков, способных взаимодействовать как с мономерным, так и с полимерным актином, которые иницируют или терминируют нарастание актинового полимера, фрагментируют нити, прикрепляют актин к мембранам и т.д. (Pantaloni et al., 2001; Dos Remedios et al., 2003; Pollard, Borisy, 2003; Winder, Ayscough, 2005).

Сформированные нити актина обслуживают белки концевых факторов или *кепирующие белки* (англ. capping proteins). Их условно можно разделить на 4 типа: 1- связываются с «+» концом; 2- связываются с «-» концом; 3- связываются с G-актином; 4- связывают F-актин (рисунок 1, В). Некоторые из них способны к нескольким типам взаимодействия. Они могут быть чувствительны или нечувствительны к кальцию и регулироваться протеинкиназами. В совокупности эти белки содержат большой пул актиновых мономеров, доступных для полимеризации, способствуют сборке "зародышей" новых нитей, их удлинению и прекращению элонгации актиновой нити, препятствуют аннелингу. Суммарный эффект состоит в появлении укороченных филаментов, что обусловлено как увеличением количества затравок, конкурирующих за свободные мономеры, так и отсутствием стыковки.

В качестве примера можно привести кепирующий белок из скелетных мышц позвоночных β -актинин. Он представляет собой гетеродимер структурно сходных α - и β -субъединиц, который связывается с «+» концом актиновой нити. Он взаимодействует с профилином для поддержания пула актиновых мономеров, ограничивает число «+» концов, доступных для роста в ходе основанного на актиновом скелете выступания переднего края клетки, и стабилизирует «+» концы тонких нитей на Z-диске поперечнополосатых мышц (Edwards et al., 2014).

1.2.1.2. Тропомиозин

Тропомиозин – белок, характерный для всех типов мышц (Bailey, 1946; Bailey, 1948; Ноорер, Thuma, 2005). Он является главным поверхностным белком тонкой нити и участвует в Ca^{2+} -зависимой регуляции актин-миозинового

взаимодействия – блокирует места связывания миозина на актине. Тропомиозин является асимметричным фибриллярным белком, который представляет собой вытянутую α -спираль, состоящую из двух субъединиц, около 41 нм в длину и 2 нм в диаметре (Tobacman, 1996). Соединяясь N- и C-концами, молекулы тропомиозина формируют двуспиральный (англ. coiled-coil) полимер (Flicker et al., 1981; Gordon et al., 2000).

Тропомиозин растворим в высокой ионной силе, полимеризуется он при понижении ионной силы менее 0.1 М (Tsao et al., 1951; Sousa, Farah, 2002). При этом происходит сильное повышение вязкости раствора. Способность ТМ полимеризоваться в низкой ионной силе обусловлена его C-концевой последовательностью (Mak, Smillie, 1981; Cho et al., 1990). Тропомиозин гладкой мышцы моллюсков по множеству физико-химических свойств похож на тропомиозин позвоночных. Термостабильность ТМ из мышц некоторых моллюсков близка к таковой ТМ позвоночных (Woods, 1976).

Содержание этого белка для всех тонких нитей сократительного аппарата мышечной клетки одинаково: одна молекула тропомиозина приходится на 7 мономеров актина (Potter, 1974; O'Brien et al., 1975; Stewart, McLachlan, 1975; Lehman et al., 1980). Благодаря изучению аминокислотной последовательности скелетномышечного ТМ было показано, что на молекуле имеется 14 квазиэквивалентных участков (McLachlan, Stewart, 1976), отвечающих за связывание молекулы с семью мономерами актина в двух разных положениях (Huxley, 1973; Lehman et al., 2009). Тропомиозин содержит кислотные остатки, размещенные на поверхности каждого из его повторяющихся актин-связывающих модулей. Они электростатически взаимодействуют с положительно заряженными остатками на комплементарной плоской поверхности субъединиц актина (Lorenz et al., 1995; Brown et al., 2005).

Связывание тропомиозина с актином происходит следующим образом (модель *геитальт*-связывания) (Holmes, Lehmann, 2008; Tobacman, 2008; Невзоров, Левицкий, 2011). Сначала одиночные молекулы ТМ случайным образом связываются с актином с очень низкой константой ассоциации (рисунок

2). После достижения критической концентрации отдельные молекулы ТМ начинают встречаться на поверхности актинового филамента, контактировать и слабо связываться друг с другом через N-конец одной с C-концом другой молекулы, что существенно увеличивает их шансы остаться на поверхности актиновой нити. Этот процесс продолжается до полного насыщения актинового филамента тропомиозиновым полимером и имеет *кооперативный характер* (Тобастан, 2008; Невзоров, Левицкий, 2011). Таким образом, связывание тропомиозинового тяжа с актиновым филаментом является достаточно прочным, хотя на локальном уровне такое взаимодействие имеет слабый и неспецифический характер. При этом ТМ делает нить актина менее гибкой, это достигается путём тропомиозин-индуцированного ограничения подвижности глобул актиновых мономеров, что более выгодно для связывания актинового полимера с остальными молекулами тропомиозина (Тобастан, 2008).

Известно, что тропомиозин и миозин имеют более высокое сродство к комплексам F-актин-миозин и F-актин-тропомиозин, соответственно, чем к отдельному F-актину. Это представлено в исследованиях, где показано, что субфрагмент 1 (S1) моторного домена миозина связывается с комплексом F-актин-тропомиозин с 7-кратно превышающей аффинностью, чем с чистым F-актином (Geeves, Halsall, 1986), и в экспериментах, где миозин увеличивает сродство актина к тропомиозину (Eaton, 1976). Так же недавно, при помощи высокоскоростной атомно-силовой микроскопии (HS-AFM), было визуализировано динамическое состояние нативных тонких нитей сердечной мышцы (Matusovsky et al., 2019). Авторы изучали механизм регуляции тонких нитей посредством движения ТМ в отсутствие и в присутствии Ca^{2+} и в присутствии сильно и слабо связанного миозина. Несомненным преимуществом HS-AFM является возможность наблюдать белки и их взаимодействие в физиологических растворах без предварительной обработки образцов в трёх измерениях при пространственном разрешении от 1 до 5 нм в горизонтальном направлении и 0.15 нм в вертикальном направлении изучаемой плоскости (Matusovsky et al., 2019).

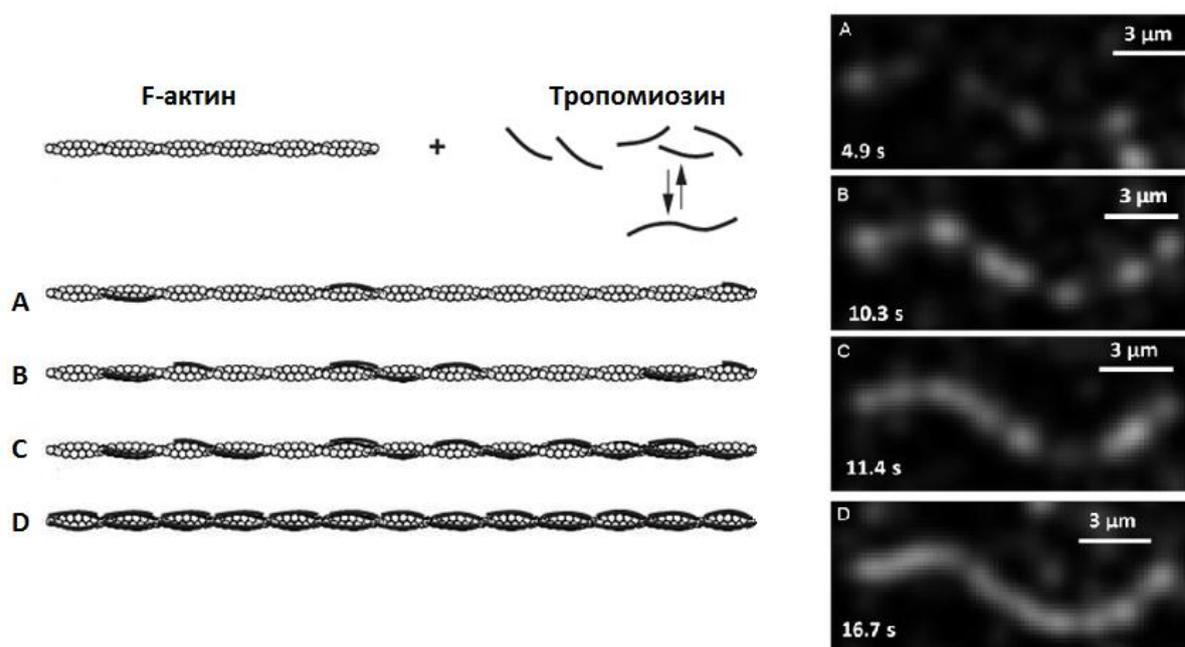


Рисунок 2 – Механизм *геитальт*-связывания тропомиозина с актином. Схема (по: Невзоров, Левицкий, 2011) и электронные микрофотографии (по: Schmidt et al., 2015) иллюстрируют связывание скелетного тропомиозина с F-актином (при 75 мМ KCl). (A) – тропомиозин связывается с низким сродством в случайных местах на F-актине. (B–C) – соседние молекулы ТМ связываются друг с другом и тем самым повышается сродство ТМ к F-актину, цепь быстро удлиняется. (D) – удлинение цепи продолжается до тех пор, пока актин не будет насыщен тропомиозином.

В клетках существуют различные изоформы тропомиозина, специфичных каждая для своей изоформы актина (Gunning et al., 2005; Janco et al., 2013; Gunning et al., 2015). Различные изоформы ТМ способны определять функцию актиновых филаментов, регулируя их взаимодействие с миозином и другими актин-связывающими белками. Наиболее обширные данные касаются взаимодействия с миозинами. Было показано, что активность миозина II зависит от типа присутствующего тропомиозина (Fanning et al., 1994). Например, ТМ1.6 был способен учитывать внутриклеточное расположение миозина 1b и исключать его взаимодействие с актиновыми филаментами, которые содержат ТМ1.6 (Tang, Ostap, 2001). Так же исследователи наблюдали способность тропомиозинов предотвращать взаимодействие актиновых филаментов с миозином 1c, как в клетках, так и в системах *in vitro* (Kee et al., 2015; McIntosh et al., 2015). На

культурах дрожжей учёными было показано, что тип тропомиозина, связанный с актиновыми филаментами, определял привлечение разных типов моторных белков к этим филаментам (Stark et al., 2010; Clayton et al., 2010; Coulton et al., 2010; Hodges et al., 2012).

Более чем 40 вариантов тропомиозина кодируются четырьмя генами и они разделяются на две большие группы – с высокой и низкой молекулярной массой. Высокомолекулярные тропомиозины представлены последовательностью из около 284 аминокислотных остатков с молекулярной массой, наблюдаемой на электрофореграмме в районе 33–40 кДа, а низкомолекулярные изоформы состоят примерно из 247 аминокислотных остатков с молекулярной массой 28–34 кДа (Woods, Pont, 1971; Weber, Murray, 1973; Phillips et al., 1979). Для тонких нитей гладких мышц моллюсков было идентифицировано две изоформы тропомиозина – 50 кДа и 33 кДа (Woods, Pont, 1971; Woods, 1976).

1.2.2. Толстые нити

Толстые нити являются уникальной структурой, характерной для сократительных систем. Именно толстые нити реализуют главную функцию сократительного аппарата - генерируют моторную силу и создают напряжение за счёт моторного белка миозина. В отличие от скелетных мышц позвоночных, толстые нити запирающих мышц моллюсков имеют необычно большие размеры за счёт белка парамиозина. Для мышц беспозвоночных характерно наличие парамиозиновой основы большого диаметра (Levine et al., 1976; Bennett, Elliott, 1981; Elliott, Bennett, 1982). На поверхности парамиозина монослоем располагаются белки миозин (Szent-Gyorgyi et al., 1971), миород (Shelud'ko et al., 1999) и твитчин (Vibert, 1988; Shelud'ko et al., 2004; Funabara et al., 2007). Высокое содержание парамиозина часто связывают с функциональными особенностями запирающих мышц (Ruegg, 1961; Ruegg, 1964; Lowy et al., 1964). Сила, продуцируемая интактным мускулом-замыкателем составляет около 10-14 кгс/см², в противоположность скелетным мышцам позвоночных, где сила около 3.5 кгс/см² - т.е. максимальная сила на площадь поперечного сечения в три-четыре

раза выше в catch мышцах, чем в любых других мышцах животного царства (Twarog, 1967).

Парамиозин не является специфическим для запирательных мышц двустворчатых моллюсков (Castellani-Ceresa, Lanzavecchia, 1982). Он был выделен из мышц, по меньшей мере, семи типов беспозвоночных животных, включая моллюсков и членистоногих (Winkelman, 1976; Elfvin et al., 1976). Благодаря устойчивости его можно получить обработкой мышечного экстракта этанолом (Szent-Györgyi, Kendrick-Jonas, 1973). Молекулярный вес парамиозина варьирует, в зависимости от источника его получения, в пределах 200-226 кДа (Winkelman, 1976). Палочковидная молекула парамиозина (130 нм в длину и 2 нм в диаметре) состоит из двух идентичных параллельных полипептидных цепей, закрученных в суперспираль (Kendrick-Jones et al., 1969; Weisel, Szent-Gyorgyi, 1975).

Согласно теории "скользящих нитей" усилие, передаваемое на одну тонкую нить пропорционально количеству соединенных с ней головок миозина, а следовательно и длине толстой нити (Huxley, Niedergerke, 1954). Соответственно, увеличение длины и диаметра толстой нити за счёт парамиозиновой основы обусловлено необходимостью развивать значительное напряжение (Szent-Gyorgyi et al., 1971).

1.2.2.1. Миозин

В гладких мышцах моллюсков миозин не является основным компонентом толстой нити, её основу, как говорилось выше, составляет белок парамиозин, и таким образом миозин становится не столько структурной, сколько функциональной единицей толстой нити.

Все известные миозины обладают молекулярным весом около 450-500 кДа и сходны по строению. Типичный миозин (рисунок 3) представляет собой молекулу, состоящую из двух тяжелых (200 кДа каждая) и двух легких цепей (15-30 кДа каждая). Тяжелые цепи миозина составляют хвост длиной 140 нм и две головки по 12–20 нм. Хвост образован двумя α -спиральными участками тяжелых цепей сплетенными в coiled-coil (двуспиральную) структуру и отвечает за

связывание с толстой нитью (Harrison et al., 1971). Головки миозина соединены с хвостом двойным шарниром. Каждая из головок миозина несет на себе актин-связывающий сайт и сайт способный расщеплять АТФ (Lowey et al., 1969). Тяжелые цепи миозина и, в частности, миозиновые головы catch-мышц не имеют очевидных особенностей (Flicker et al., 1981; Flicker et al., 1983). Различия между изоформами тяжелой цепи миозина запираательных мышц моллюсков и миозина скелетных мышц позвоночных не больше, чем между изоформами миозина быстрых и медленных скелетных мышц млекопитающих (Weiss et al., 1999).

Между хвостом и головкой миозина расположен небольшой (8.5 нм) гибкий α -спиральный шейный участок, он отвечает за конформационные изменения и несет на себе участки связывания с легкими цепями миозина (Houdusse, Cohen, 1996; Weeds, Lowey, 1971). Легкие цепи миозина подразделяются на существенные и регуляторные. В молекуле миозина с каждой из головок тяжелых цепей связано по две легких цепи: по одной регуляторной и существенной цепи на головку. Существенные цепи (17 кДа) участвуют в поддержании стабильности молекулы миозина (Aguilar et al., 2010). Регуляторные цепи (20 кДа) вовлечены в регуляцию Mg^{2+} -АТФазной активности миозина. Эти цепи участвуют в формировании Ca^{2+} -связывающего домена, благодаря которому, миозин из мышц моллюсков способен осуществлять саморегуляцию (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1980). В формировании этого уникального для моллюсковых миозинов домена одновременно с регуляторными цепями участвуют и тяжелые цепи миозина (Jakes et al., 1976; Chantler, Szent-Gyorgyi, 1978; Bagshaw, Kendrick-Jones, 1979; Asakawa et al., 1981).

Работа актин-активированной миозиновой Mg^{2+} -АТФазы уникальна и одновременно универсальна для мышечных сократительных систем и неммышечных форм миозина. В связи с чем, на основе расщепления молекулы АТФ миозиновой АТФазой давно отработан метод регистрации активности сократительных систем (Fiske, Subbarow, 1925). На рисунке 3 представлена схема перемещения головки миозина по актину в результате процесса гидролиза АТФ (Гусев, 2000). В исходном положении (1) головка миозина прочно

взаимодействует с актином и не насыщена АТФ. При этом α -спиральный участок ориентирован под углом $\sim 40^\circ$ относительно нити актина. Когда АТФ связывается с миозиновой головкой (2) ослабевает связь миозина с актином и они диссоциируют. При гидролизе АТФ в активном центре свободной головки миозина происходит изменение её конформации и переориентация α -спирального шейного участка. После расщепления АТФ на АДФ и неорганический фосфат (Pi), α -спиральный шейный участок оказывается повернут на $35-40^\circ$ и становится в положение, перпендикулярное оси F-актина (3). Головка миозина снова может взаимодействовать с актином.

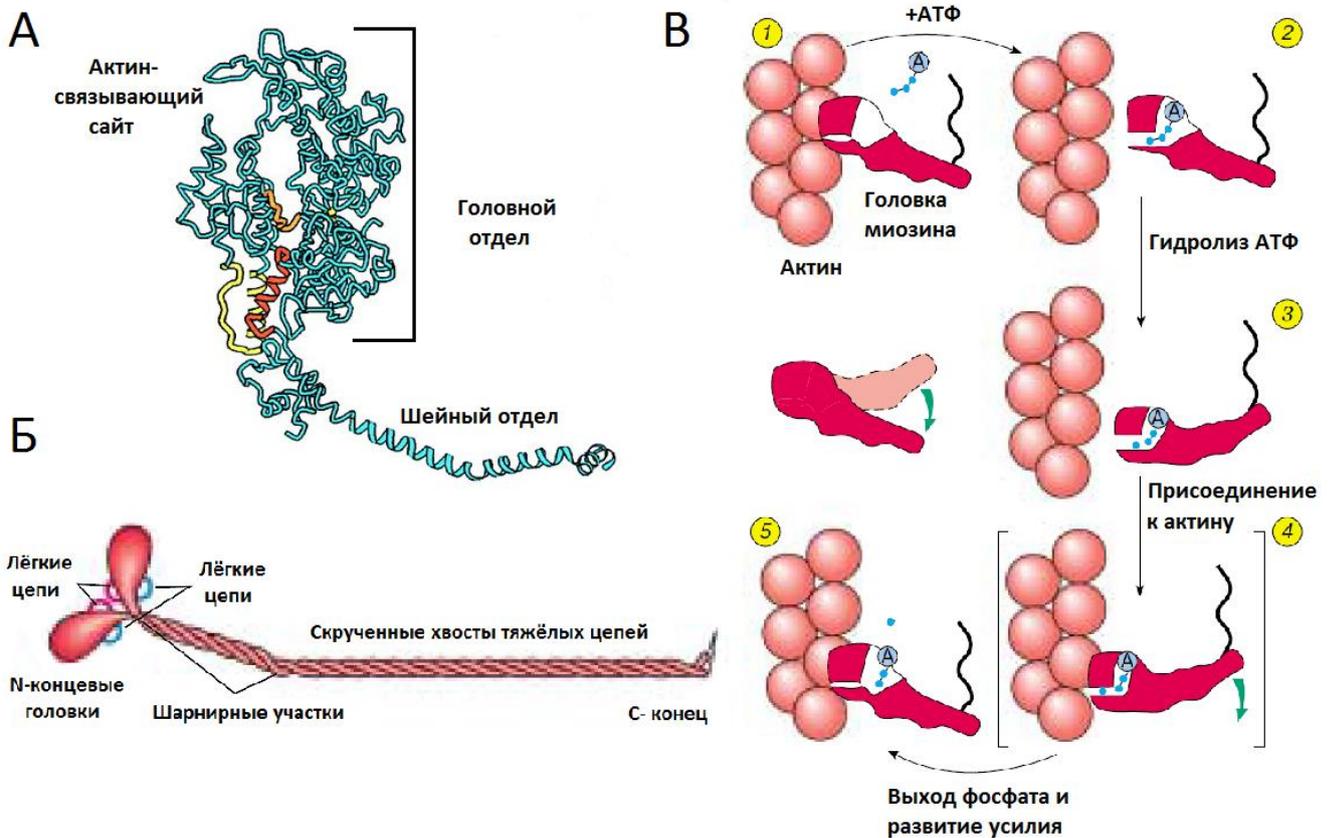


Рисунок 3 – Миозин. (А) – структура головки миозина (по: Houdusse et al., 1999). (Б) – строение целой молекулы миозина скелетных мышц (по: Гусев, 2000). (В) – схема одиночного шага головки миозина по нити актина (по: Гусев, 2000); фрагмент нити актина изображен в виде шариков, аденозин обозначен как А в круге, фосфатные группы – маленькие кружки. Между состояниями 5 и 1 приведена схема переориентации шейки миозина, происходящая при генерации тянущего усилия.

При этом, в отличие от состояния 1, где головка миозина ассоциировалась со второй сверху глобулой актина, то в состоянии 4 после поворота α -спирального шейного участка она связывается уже с третьей сверху глобулой актина (4). Структурные изменения головки миозина после связывания с актином позволяют освободить P_i из активного центра. В этот же момент происходит переориентация α -спирального участка: он занимает положение под углом $\sim 40^\circ$ к оси F-актина и в ходе переориентации генерируется тянущее усилие (5). Миозин, таким образом, продвигает актиновую нить вперед вдоль её оси. Из активного центра миозиновой головки освобождается АДФ, головка переходит в исходное состояние (1). Одна миозиновая головка создаёт тянущее усилие в несколько пиконьютонов. Но при суммировании множества миозиновых усилий мышца развивает достаточно большое напряжение. Таким образом – чем большая поверхность тонких и толстых нитей будет перекрываться, т.е. чем больше головок миозина будет связываться с актином, тем большее усилие мышца способна генерировать (Гусев, 2000).

1.2.2.2. Миород

Миород (англ. – myosin rod protein; так же – catchin) – белок, который является специфическим для запирающих мышц двустворчатых моллюсков (Shelud'ko et al., 1999). Экспрессия миорода наблюдается только в гладких запирающих мышцах двустворчатых моллюсков (Shelud'ko et al., 1999; Andersen et al., 2009; Matusovsky et al., 2017). Миород был обнаружен в 20 из 24 исследованных мышц семи видов двустворчатых моллюсков (Shelud'ko et al., 1998; Shelud'ko et al., 1999). Он появляется на очень ранней стадии миогенеза, когда гладкие мышцы, типичные для взрослых животных, еще не сформированы (Odintsova et al., 2006).

Миород является водонерастворимым, термостабильным фибриллярным белком, состоящим из двух полипептидов – 106 и 113 кДа для мышц мидии (Shelud'ko et al., 1999; Shelud'ko et al., 2001). Было обнаружено, что миород способен взаимодействовать с парамозином, миозином, твитчином и полимерным

актином *in vitro* (Shelud'ko et al., 1999; Shelud'ko et al., 2001; Shelud'ko et al., 2007; Matusovsky et al., 2011), однако функциональные последствия этих взаимодействий не ясны.

Впервые этот белок был выделен из мускула-замыкателя *Mytilus edulis* (Castellani et al., 1988). В ходе его дальнейшего изучения было показано, что миород является продуктом альтернативного сплайсинга гена тяжёлых цепей миозина и состоит из С-концевой "хвостовой" части миозина и уникальной N-концевой последовательности (Yamada et al., 1997; Yamada et al., 2000). Миород содержит С-концевую стержневую часть из 830 аминокислотных остатков, которая идентична С-концевой части стержня миозина, а уникальный N-концевой домен состоит из 156 аминокислот (Yamada et al., 2000). Предположительно, миород интегрирован в поверхность кора парамозина таким же образом, как и миозин: его "хвост" (С-стержень) расположен на поверхности толстых нитей, а "голова" (N-конец) выступает в межфиламентное пространство (Shelud'ko et al., 2002). Этот уникальный домен, вероятно, реализует функциональные свойства белка посредством влияния на актин-миозиновое взаимодействие или же непосредственным взаимодействием с актином.

Миород *in vitro* образует полимеры, причем его полимеры сильно отличаются от полимеров миозина, несмотря на идентичность участков, определяющих полимеризацию этих белков (Shelud'ko et al., 2001; Матусовская и др., 2004; Матусовский и др., 2005). Нативный миород обладает необычным свойством – сильно выраженной тиксотропией, которая связана с высокой структурной вязкостью (Shelud'ko et al., 2001). Вязкость миорода на порядок выше вязкости полимерного миозина. При изменении ионной силы происходит изменение пространственной структуры – при 50 мМ КСl образуются латеральные агрегаты, при 100 мМ КСl – длинные нитевидные полимеры, а при 150 мМ КСl наблюдаются короткие полимеры. По-видимому, молекулы этого белка способны взаимодействовать латерально друг с другом (Матусовский и др., 2005).

В запирающих мышцах моллюсков С-концевая стержневая часть миорода, подобно миозиновой, интегрирована в парамизиновый остов толстой нити, взаимодействуя, таким образом, не только с парамиозином, но и с миозином. N-уникальный домен миорода, по-видимому, расположен в межнитевом пространстве по аналогии с головками миозина, где возможно образование комплекса с миозином и твитчином *in vivo* (Szent-Gyorgyi et al., 1971; Vibert et al., 1993 a; Shelud'ko et al., 1999). При этом, в запирающей мышце мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*) молярное соотношение миорода к миозину составляет 1:1 (Vyatchin et al., 2019). Как сказано выше, миозин и миород имеют одинаковые С-концевые части, с одним и тем же доменом, ответственным за сборку нити. Было показано, что они могут взаимодействовать *in vitro*, образуя сополимеризованные филаменты (Sohn et al., 1997; Yamada et al., 2000; Shelud'ko et al., 2001).

Было обнаружено, что миород может быть фосфорилирован киназой лёгких цепей миозина (КЛЦМ) из гладких мышц позвоночных в положении Thr-141 (Sobieszek et al., 2006). Это указывает на сходство его N-концевого головного домена с регуляторными легкими цепями миозина. Участок фосфорилирования (Thr-141) локализован в уникальном домене миорода, что может указывать на регуляторную роль фосфорилирования в функционировании белка. Возможно, сайт Thr-141 вовлечён в актин-миородовое взаимодействие, несмотря на то, что ранее считалось, что миород не взаимодействует с актином *in vivo*, поскольку его N-уникальная часть меньше миозиновой (Yamada et al., 2000; Shelud'ko et al., 2001). Данные экспериментов по осаждению смеси актина с искусственно синтезированными пептидами уникального N-концевого сегмента миорода показали возможность такого взаимодействия. Добавление нефосфорилированных N-концевых пептидов приводило к агрегации и осаждению F-актиновых нитей при низкоскоростном центрифугировании, тогда как наличие Asp в положении Thr-141 (имитация фосфорилирования в синтетических пептидах) не оказывало подобного эффекта (Matusovsky et al., 2011). А по результатам флуоресцентной микроскопии видно, что актин при

добавлении пептидов миорода образует плотные пучки (Matusovsky et al., 2011). Это позволило предположить, что фосфорилирование является значимым для осуществления функциональной роли миорода и так же может влиять на актин-миозиновое взаимодействие. Как показано в исследованиях, представленных в работе, фосфорилирование N-концевого домена миорода усиливает актин-активируемую Mg^{2+} -АТФазную активность миозина (Matusovsky et al., 2015).

Поскольку каталитический участок КЛЦМ входит в состав мультидоменного регуляторного белка гладких запирательных мышц моллюсков, твитчина, предполагается, что функциональная роль миорода проявляется при фосфорилировании КЛЦМ-подобной киназой твитчина. Однако убедительных доказательств этого предположения нет (Matusovsky et al., 2010; Sobieszek et al., 2010). В этом контексте важно отметить, что киназа твитчина, по-видимому, стимулируется растяжением – свойство, которое невозможно симитировать в биохимических анализах (Gordon, Ridgway, 1976; Butler, Siegman, 2011).

1.2.2.3. Твитчин

Твитчин является представителем семейства гигантских кальмодулин-зависимых протеинкиназ, в которое так же входят белки прожектин и титин (Ayme-Southgate et al., 1991; Fyrberg et al., 1992). Эти белки имеют длинные, вытянутые молекулы и содержат серин-треониновый киназный домен вблизи С-конца, который гомологичен каталитическому участку киназы легких цепей миозина гладких мышц позвоночных. Отличительной особенностью белков данного семейства является их способность взаимодействовать с миозином и F-актином. Твитчин имеет молекулярную массу около 530 кДа и может включать 3-4 фосфатные группы (Funabara et al., 2001a; Funabara et al., 2003; Funabara et al., 2005). В мускуле-замыкателе *Mytilus* молярное соотношение твитчина к миозину приблизительно 1:15 (Siegman et al., 1997). Он локализован на толстых нитях в гладкой и поперечнополосатой частях аддуктора гребешка *Placopecten magellanicus* и на толстых нитях в гладких мышцах мидии *Mytilus edulis* (Vibert et al., 1993a). Иммуноферментная маркировка показала, что киназный домен

твитчина из запирающей мышцы моллюсков локализуется с определённой регулярностью на поверхности толстых нитей (Butler, Siegman, 2010).

На скинированных волокнах мидии *Mytilus edulis* было показано, что фосфорилирование твитчина посредством цАМФ-зависимой протеинкиназы А расслабляет мышцу из запирающего тонуса (Siegman et al., 1997; Siegman et al., 1998; Yamada et al., 2004; Bejar, Villamarin, 2006) и, как было показано позже, приводит к диссоциации комплексов твитчин-актин (Shelud'ko et al., 2004; Méndez-López et al., 2012). Таким образом, фосфорилирование твитчина не влияет на его взаимодействие с белками толстых нитей, но значительно ослабляет его взаимодействие с F-актином и тонкими нитями (Shelud'ko et al., 2004; Shelud'ko et al., 2007; Funabara et al., 2007; Butler, Siegman, 2010). Дефосфорилирование твитчина Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой Ser/Thr фосфатазой 2В (PP2В) восстанавливает способность мышцы поддерживать высокое напряжение (Klee et al., 1988; Castellani, Cohen, 1992; Siegman et al., 1997; Siegman et al., 1998; Yamada et al., 2004). То есть во время catch-состояния, когда мышца поддерживает высокое напряжение, твитчин находится в дефосфорилированном состоянии.

1.3. Особенности функционирования гладких запирающих (catch)

МЫШЦ МОЛЛЮСКОВ

Типичным для строения двустворчатых моллюсков является наличие двух мощных мышц-аддукторов – переднего и заднего, которые запирают створки раковины. Как уже упоминалось выше, уникальностью этих мышц является способность помимо обычных состояний сокращения и расслабления находиться в третьем – в состоянии запирающего тонуса (catch). При котором тоническая (медленная) часть аддуктора способна поддерживать высокий уровень изометрического напряжения при малом расходе энергии АТФ (Twarog, 1967).

Сигналом к сокращению мышц является повышение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} в саркоплазме. В гладких мышцах позвоночных это увеличение приводит к фосфорилированию регуляторных легких цепей миозина посредством киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), которая

активируется комплексом Ca^{2+} -кальмодулин (Pires et al., 1974; Dabrowska et al., 1977; Ikebe et al., 1983). В результате фосфорилирования регуляторных лёгких цепей изменяется их конфигурация и положение головок миозина, что приводит к активации АТФазы миозина актином и к развитию сокращения. В отличие от гладких мышц позвоночных, "миозиновая" регуляция в гладких мышцах моллюсков реализуется без посредников. Ca^{2+} действует на миозин напрямую, связываясь в области регуляторных цепей и таким образом миозин моллюсков способен к саморегуляции (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1980).

Активация холинэргического нерва моллюска приводит к увеличению внутриклеточной концентрации кальция до 10^{-5} М, что вызывает сокращение мышцы. Несмотря на последующее снижение кальция до уровня покоя - 10^{-7} М мышца продолжает поддерживать напряжение (catch) (Ishii et al., 1989). Оно напоминает ригорное состояние; однако в отличие от ригорного состояния концентрация АТФ высока. Таким образом, уровень АТФ и отношение АТФ к АДФ не отличаются в catch и в других сократительных состояниях (Ruegg, Strassner, 1963; Ruegg, 1965).

Стимуляция серотонинэргического нерва моллюска вызывает быстрое расслабление мышцы без каких-либо изменений в концентрации кальция (Ishii et al., 1989). Нейрональная активность почти отсутствует во время состояния catch (Flechter, 1937) и потребление кислорода очень невелико (Brecht et al., 1955; Baguet, Gillis, 1968). При этом усиление расхода кислорода находится в линейной зависимости от напряжения мышцы и не зависит от длительности сокращения (Baguet, Gillis, 1968). Запирательный тонус поддерживается до тех пор, пока в саркоплазме, в результате действия серотонина, не увеличивается концентрация цАМФ, активирующего цАМФ-зависимую протеинкиназу А (Cole, Twarog, 1972; Twarog, Cole, 1972; Achazi et al., 1974).

Сила, которая сгенерировалась во время активного сокращения, поддерживается во время catch состояния. Вполне вероятно предположить, что связи ("мостики"), поддерживающие catch силу, формируются уже во время активного сокращения, по крайней мере, в предварительном положении (Galler,

2008). Предположение о том, что catch-мостики уже налажены во время активного сокращения подтверждается тем, что применение ингибиторов миозина во время активного сокращения не подавляет силу к нулю (Butler et al., 2006; Andrichov et al., 2006). Оставшееся напряжение, видимо и является catch-напряжением, поскольку оно может быть прекращено catch-расслабляющими факторами (Galler, 2008).

Таким образом, можно утверждать, что catch-мостики не могут препятствовать укорочению мышечных волокон (Butler et al., 1998), если они полностью установлены уже во время активного сокращения. Первым это отметил фон Уикхулл ещё в 1912 году, он заметил, что мышцы в catch состоянии имеют высокую устойчивость к растяжению, но почти никакого сопротивления к сокращению (Von Uexkull, 1912). Другими словами, у них должны быть свойства подобные храповому механизму (англ. ratchet, трещотка).

1.4. Гипотезы реализации catch-механизма

Задача поддержания мышцы в сокращенном состоянии, подразумевает достижение неэнергозатратной фиксации расстояния между противостоящими Z-телами гладкой мышцы. Эта задача, очевидно, по-разному решена в гладких мышцах позвоночных (latch) и моллюсков (catch), поскольку строение сократительного аппарата и белковый состав этих мышц сильно отличается. Принято считать, что явление запирающего тонуса у моллюсков достигается за счет регулируемого белок-белкового взаимодействия, которое либо независимо от актин-миозиновой системы, либо дополняет эту систему, придавая ей уникальные свойства и возможность поддерживать длительное напряжение без затрат энергии АТФ. Существует несколько гипотез, в которых предполагается формирование таких взаимодействий или "сшивок" между толстыми и тонкими нитями или исключительно между толстыми нитями, либо только между тонкими нитями. (Ruegg, 1961; Lowy et al., 1964; Ma et al., 2000; Shelud'ko et al., 2004; Shelud'ko et al., 2007; Matusovsky et al., 2011). Таким образом, гипотезы базируются на общепринятом предположении о регулируемом белок-белковом взаимодействии,

но разнятся в принципе такого взаимодействия. В следующих разделах рассмотрим основные положения гипотез, объясняющих механизм запирающего тонуса в мышцах моллюсков, более подробно объясняющих механизм формирования запирающего тонуса.

1.4.1. "Мостиковая"

Ранее считалось, что catch-состояние может быть связано с медленной скоростью открепления поперечных мостиков миозина от актиновых нитей (Lowy, 1953; Lowy et al., 1964), поскольку предполагается, что прикрепленные головки миозина в отсутствие Ca^{2+} не способны быстро высвободить АДФ (Butler et al., 1998; Butler et al., 2001). Это могло бы означать, что актомиозиновые связи, являющиеся сшивками между толстыми и тонкими нитями, в зависимости от условий могут обеспечивать как сокращение, так и поддержание запирающего тонуса (Tajima et al., 1994; Tajima et al., 2008). В настоящее время, в рамках "мостиковой" гипотезы предполагается, что формирование мостика-сшивки между тонкой нитью (актин) и толстой нитью (миозин) зависит от состояния фосфорилирования твистина (Butler et al., 2001; Funabara et al., 2001a; Yamada et al., 2001; Yamada et al., 2004). Предполагается, что дефосфорилированный твистин придаёт миозиновым мостикам catch-свойства, в то время как фосфорилированный не меняет цикл работы миозиновых мостиков (Butler et al., 1998; Butler et al., 2001; Funabara et al., 2001a; Funabara et al., 2003; Siegman et al., 1997; Siegman et al., 1998; Yamada et al., 2001).

Однако, "мостиковая" гипотеза оказалась опровергнута, когда Галлером с соавторами было показано, что в состоянии запирающего тонуса миозин не взаимодействует с тонкими нитями, так как миозиновые головки были заблокированы в это время ингибиторами (Galler et al., 2010).

1.4.2. "Парамиозиновая"

В пользу "парамиозиновой" гипотезы запирающего тонуса (Ruegg, 1961), свидетельствовала корреляция между количеством парамиозина в мышце и

усилием, ей развиваемым (Levine et al., 1976). Так же catch связывали с кристаллизацией параамиозина (Johnson et al., 1959). В более поздних работах существование параамиозиновых сшивок подтверждено не было (Yamada et al., 2001). По-видимому, параамиозин играет скорее структурную роль и обеспечивает развитие высокого напряжения запираТЕЛЬными мышцами, но не лежит в основе запираТЕЛЬНОГО сокращения.

Однако параамиозиновая гипотеза привела к пониманию того, что в клетке, по-видимому, есть две независимые системы, одна из которых отвечает за сокращение, а вторая – за catch (Ruegg, 1964). Действительно, если мышцу обработать ингибиторами миозина, такими как блеббистатин, тиомочевина или ванадат, то это должно привести к ингибированию генерации силы в мышце, поскольку миозин ответственен за развитие сокращения и генерацию силы. В случае активного сокращения данное воздействие действительно приводило к полному расслаблению мышцы, тогда как в catch-состоянии расслабления не происходило (Butler et al., 2006; Andruchov et al., 2006), что явно указывает на существование независимых связей, отличных от актомиозиновых (Ruegg, 1964; Galler et al., 1999; Galler et al., 2005; Mukou et al., 2004; Shelud'ko et al., 2004; Shelud'ko et al., 2007).

1.4.3. "Твитчиновая"

На роль независимого catch-мостика предлагали белок толстой нити твитчин (Vibert et al., 1993a; Vibert et al., 1993b; Shelud'ko et al., 2004). Шелудько с соавторами выдвинули "твитчиновую" гипотезу (Shelud'ko et al., 2004; Shelud'ko et al., 2007), которая постулирует наличие актин-твитчиновой сшивки, независимой от актин-миозинового взаимодействия. Согласно "твитчиновой" гипотезе, в основе catch-состояния лежит образование твитчиновых сшивок между толстыми и тонкими нитями, которые регулируются фосфорилированием твитчина (Shelud'ko et al., 2004; Shelud'ko et al., 2007).

Гипотеза согласуется с регуляторной ролью твитчина в мышце. На скинированных волокнах мидии *Mytilus edulis* было показано, что фосфорилирование твитчина посредством цАМФ-зависимой протеинкиназы А

расслабляет мышцу из запирающего тонуса (Siegman et al., 1997; Siegman et al., 1998; Yamada et al., 2004; Bejar, Villamarin, 2006). Дефосфорилирование твитчина Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой Ser/Thr фосфатазой 2В (PP2B) восстанавливает способность мышцы поддерживать высокое напряжение (Klee et al., 1988; Castellani, Cohen, 1992; Siegman et al., 1997; Siegman et al., 1998; Yamada et al., 2004). То есть во время catch-состояния, когда мышца поддерживает высокое напряжение, твитчин находится в дефосфорилированном состоянии.

На уровне белок-белковых взаимодействий Шелудько с соавторами обнаружили, что нефосфорилированный твитчин образует прочный комплекс с актиновыми нитями, тогда как фосфорилирование твитчина цАМФ-зависимой протеинкиназой А приводит к диссоциации твитчин-актиновых связей, но не влияет на взаимодействие с миозином (Shelud'ko et al., 2004; Shelud'ko et al., 2007). Эти результаты были независимо подтверждены несколькими лабораториями (Funabara et al., 2007; Butler, Siegman, 2010) и стали основой "твичиновой" гипотезы запирающего сокращения.

В рамках "твичиновой" гипотезы предполагается, что при образовании твичиновых сшивок происходит "отключение" активных миозиновых мостиков, как это наблюдается при расслаблении мышцы. Реализуется это, вероятнее всего, с помощью вспомогательной регуляторной системы тонких нитей, способной ингибировать актин-миозиновое взаимодействие стерически (Shelud'ko et al., 2007; Dobrzanskaya et al., 2013; Vyatchin et al., 2015). Указания на это можно найти в том, что дефосфорилированный твитчин, введенный в теневое скелетно-мышечное волокно, ингибирует переход миозинового мостика из слабосвязанной формы в сильносвязанную и при этом "замораживает" тропомиозин в блокирующей позиции на поверхности тонких нитей (Borovikov et al., 2010). Помимо того, было показано, что введение твитчина моллюсков в волокно скелетных мышц позвоночных приводило к появлению признаков catch-состояния, исчезающих при фосфорилировании твитчина, однако количественно эти признаки были выражены слабо (Avrova et al., 2009).

В настоящее время гипотеза твитчиновых сшивок является общепринятой среди мировых лабораторий, занимающихся проблематикой запирающего сокращения (Galler et al., 2005; Galler et al., 2010; Funabara et al., 2005; Funabara et al., 2009; Butler et al., 2006; Butler et al., 2010; Hooper et al., 2008; Yamada et al., 2013). Однако денситометрия толстых нитей запирающей мышцы показала, что содержание твитчина в мышце может значительно уступать содержанию других мышечных белков (Siegman et al., 1997; Butler, Siegman, 2010). Кроме того, твитчин широко распространён в различных мышцах, которые не связаны с запирающим сокращением (Andersen et al., 2009). Тогда как миород экспрессируется исключительно в catch мышцах моллюсков (Shelud'ko et al., 1999; Andersen et al., 2009), что и послужило основанием предположить его в качестве основного игрока в механизме запирающего тонуса (Shelud'ko et al., 1999; Yamada et al., 2000; Matusovsky et al., 2011).

1.4.4. "Миородовая"

"Твитчиновая" гипотеза не исключает участия в catch и других белков, в частности миорода (Shelud'ko et al., 1999; Yamada et al., 2000). Вовлечение миорода в реализацию catch-состояния подразумевает, его способность взаимодействовать с полимерным актином. Это взаимодействие было показано для отдельных N-концевых пептидов миорода (Matusovsky et al., 2011). А так же для полноразмерного миорода при измерении вязкости и соосаждения комплексов миорода с актином (Matusovsky et al., 2011; Matusovsky et al., 2015). Теоретически миород может быть дополнительной "сшивкой", поддерживающей catch-структуру в дополнение к твитчину, посредством взаимодействия с твитчином, миозином или актином. Миород является белком специфическим для catch мышц, имеет сравнимое с миозином содержание в мышце, значительно превышающее таковое твитчина (Sheludko et al., 1999; Yamada et al., 2000; Vyatchin et al., 2019).

Показано, что КЛЦМ фосфорилирует миород в уникальном N-домене *in vitro* (Sobieszek et al., 2006; Matusovsky et al., 2010). В гладкой мышце моллюсков присутствуют, по крайней мере, две киназы, способные фосфорилировать миород.

Одна из киназ экстрагируется совместно с миозином и фосфорилирует и миород и миозин в С-концевой части (Matusovsky et al., 2010; Sobieszek et al., 2010). Второй киназой может быть твитчин, который способен взаимодействовать с миородом (Shelud'ko et al., 2007), и содержит в качестве домена каталитическую часть КЛЦМ (Funabara et al., 2003). Показано, что твитчин, действительно, способен фосфорилировать миород *in vitro*, хотя и очень медленно, что возможно объясняется невозможностью активировать киназу твитчина в биохимических экспериментах (Matusovsky et al., 2010). Таким образом, не исключено, что миород может быть субстратом КЛЦМ домена твинчина *in vivo*.

В пользу "миородовой" гипотезы говорят еще несколько наблюдений. Показано, что дефосфорилированный миород может взаимодействовать с фибриллярным актином независимо от Ca^{2+} , а с регулируемые тонкими нитями только в присутствии Ca^{2+} (Matusovsky et al., 2011). Так же, миород способен влиять на Mg^{2+} -АТФазную активность миозина, но только в случае сополимеризации этих двух белков, при этом играет роль состояние фосфорилирования миорода (Matusovsky et al., 2010; Matusovsky et al., 2015).

1.4.5. "Кальпониновая"

В гипотезах, объясняющих механизм запирающего тонуса, предполагается участие в этом явлении тонких нитей. Наиболее простой способ фиксации сокращенного состояния мышцы при помощи тонких нитей – это "сшить" встречные тонкие нити. Такое объяснение феномена catch стало возможно благодаря обнаружению способности кальпонины агрегировать тонкие нити *in vitro* (Ma et al., 2000).

Повышенное содержание кальпонины в запирающих мышцах может означать, что неизвестная функция кальпонины должна быть выражена сильнее в запирающих мышцах моллюсков, чем в гладких мышцах позвоночных (Nishida et al., 1990; Marston, 1991; Dobrzhanskaya et al., 2013). Возможно, избыточное количество тонких нитей относится к цитоскелетному домену. Возможно, что для тонких нитей этого домена характерна фиксация благодаря поперечным

кальпониновым сшивкам тонких нитей. Не исключено, также, что кальпонин образует сшивки не только между тонкими нитями цитоскелетного, но и сократительного домена. Кроме того, предполагается, что именно тонкие нити суммируют и передают запирающую силу на Z-тела и далее на наружную мембрану.

В заключение этого раздела, на основе всех имеющихся на сегодняшний день данных, мы полагаем, что способность к запирающей функции может быть интегральным свойством сократительного аппарата мускула-замыкателя, которое складывается из особенностей свойств многих белков сократительного домена мышечной клетки. То есть, можно допустить отсутствие в запирающих мышцах моллюсков единой специализированной структуры, ответственной за запирающий тонус, а наличие кумулятивного эффекта, по крайней мере, от трех независимых систем: твитчин-актиновой, миород-актиновой и кальпонин-актиновой.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные методы

2.1.1. Выделение сократительных белков из запирающих мышц мидии

Мидии *Crenomytilus grayanus* (мидия Грея) были добыты водолазной службой ННЦМБ им. А.В. Жирмунского. Сбор животных производили по экспериментальной необходимости в течение всего года в заливе Восток (Японское море). Возраст животных 15–20 лет, размеры около 12x7 см, диаметр изучаемого мускула-замыкателя (задний аддуктор) составлял 1.5–3 см при высоте 1–1.5 см. Сократительные белки из аддуктора получали методом, модифицированным для одновременной очистки актина и тропомиозина (Shelud'ko et al., 2016). Все процедуры выполняли при +4 °С.

Ригоризация и отмывка мышц

100 г свежесрезанных мышц заднего аддуктора мидии Грея измельчали скальпелем и ригоризовали в течение 24 ч при постоянном перемешивании верхней мешалкой в четырёх объемах 50%-го глицеринового раствора, содержащего (мМ): 50 NaCl, 2 MgCl₂, 2 EGTA, 3 NaN₃, 0.1 мг/мл ингибитор трипсина, 0.5 PMSF, 1 DTT, 20 имидазол–HCl (pH 6.3). После окончания ригоризации мышцы измельчали в мясорубке, полученный фарш довели до одного литра отмывающим раствором, содержащим (мМ): 50 KCl, 1 MgCl₂, 0.2 EGTA, 1 NaN₃, 1.0 DTT, 2.5 мкг/мл LPN, 10 фосфатного буфера (pH 6.5). Мышцы гомогенизировали при помощи диспергатора Polytron PT 2500E (Kinematica, Швейцария) при скорости 5000 об/мин в течение 5 мин. Гомогенат разбавляли отмывающим раствором до четырёх литров и центрифугировали при 4500 об/мин в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в двух литрах отмывающего раствора и повторно центрифугировали. Далее полученные осадки снова ресуспендировали, но в одном литре отмывающего раствора и снова центрифугировали в тех же условиях.

Получение "природного" фибриллярного актина мидии (nFA)

К полученному после отмывки осадку миофибрилл добавляли экстрагирующий раствор до 450 мл, содержащий (мМ): 75 KCl, 5 MgCl₂, 5 EGTA, 15 АТФ, 5 Na₄P₂O₇ (пирофосфат натрия), 0.5 DTT, 0.1 PMSF, 2.5 мкг/мл LPN, 10 имидазол–HCl (рН 7.0) и экстрагировали в течение 30 мин при медленном перемешивании. Остаток осаждали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Экстракт осветляли при 10 000 об/мин, 30 мин. Высокоскоростное центрифугирование экстракта выполняли при 40 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) 120 минут. Осадок при помощи поршневой пипетки гомогенизировали в 70-80 мл экстрагирующего раствора. Ионную силу раствора повышали добавлением KCl до 0.6 М и, после медленного перемешивания в течение 30 мин, центрифугировали при 50 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) 120 минут.

Получение глобулярного актина мидии (nGA)

Осадки "природного" полимерного актина (nFA) после высокоскоростного центрифугирования промывали, гомогенизировали при помощи поршневой пипетки в 40–50 мл G-буфера, содержащего (мМ): 0.5 АТФ, 0.2 CaCl₂, 1.0 DTT, 3 NaN₃, 2 Трис–HCl (рН 8.0) – это модифицированный раствор Риса-Янга (Rees, Young, 1967), в котором мы использовали DTT вместо β-МЕТ, добавляли азид натрия (NaN₃) и повышали рН до 8.0 (в отличие от 7.5 для обычного раствора Риса-Янга) (Girich et al., 2017). Гомогенную суспензию белка диализовали против 10–15 объемов этого раствора в течение 24 – 48 часов с двумя-тремя сменами раствора. Свидетельством окончания диализа являлась потеря вязкости белка. Деполимеризованный G-актин осветляли при 50 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 60 мин. Выход глобулярного актина (G-актин) на этой стадии составлял около 4 мг на 1 г мышцы. Полученный глобулярный актин очищали на колонке (п. 2.2.1), либо полимеризовали путем добавления 0.11 объема полимеризующего раствора, содержащего (мМ): 500 KCl, 20 MgCl₂, 10 АТФ. После полимеризации препарат использовали для дальнейшего

тестирования биохимическими и физико-химическими методами. Полимерный актин хранился на льду до семи дней. Актин мидии для длительного хранения лиофилизировали в G-форме или в F-форме (F-форма в присутствии 10 % сахарозы). После растворения лиофильных препаратов для удаления белковых агрегатов проводили дополнительный цикл очистки деполимеризацией.

Получение тропомиозина мидии

Источником тропомиозина являлся супернатант высокоскоростного осаждения nFA, содержащий примеси актина, кальпонины и тропонинов (см. гл. 3.1., рисунок 5, дорожки 7 и 8). К нему добавляли кристаллический сульфат аммония (СА) до 50 % насыщения при 0 °С и рН 7.0 и выстаивали 30 минут при перемешивании (при 0 °С). Выпавшую в осадок фракцию осаждали 5 000 об/мин в течение 20 мин и супернатант доводили кристаллическим СА до 70 % насыщения. К этой фракции 50-70 % СА добавляли 3 М КСl до 1 М и для изофокусировки снижали рН до 4.7 (± 0.1) согласно методу Байли (Bailey, 1948). Образовавшиеся хлопья тропомиозина собирали центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 20 мин. Очищенный ТМ растворяли в 10–12 мл стандартного раствора (DS/75) содержащего (мМ): 75 КСl, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 2 NaN₃, 0.5 DTT, 20 имидазол–НСl (рН 6.5) и диализовали против 100 мл DS/75 в течение суток с одной–двумя сменами. Диализат осветляли при 40 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 30 мин. Для хранения тропомиозин лиофилизировали или замораживали (без криопротекторов). Итоговый препарат ТМ мидии (см. в гл. 3.1., рисунок 5, дорожка 9) помимо основного компонента 30 кДа, содержал второстепенный компонент 50 кДа, который является изоформой тропомиозина (по результатам масс-спектрометрического анализа, данные не опубликованы).

Получение кальпонины, миозина и миорода мидии

Кальпонин мидии получали по отработанной ранее методике (Добржанская и др., 2010; Dobrzanska et al., 2013). Миозин и миород получали из заднего аддуктора мидии Грея по описанной ранее методике (Shelud'ko et al., 2001;

Shelud'ko et al., 2004). Для миорода заключительная стадия очистки была модифицирована следующим образом (Matusovsky et al., 2015). Сульфатноаммонийную фракцию 33–43% (Shelud'ko et al., 2004) солубилизировали в растворе, содержащем (мМ): 500 KCl, 2 EDTA, 2 NaN₃, 0.5 PMSF, 0.05 LPN, 1 DTT, 50 Трис–HCl (pH 8.0) и диализовали против десятикратного объёма раствора, содержащего (мМ): 75 KCl, 2 EDTA, 2 NaN₃, 5 β-MET, 50 Трис–HCl (pH 8.0) в течение суток с двумя-тремя сменами. Диализат центрифугировали при 14 000 об/мин 30 минут. Осадок растворяли в мочевином буфере, содержащим (мМ): 6 М мочевины, 600 KCl, 1 NaN₃, 2 DTT, 0.5 EGTA, 50 Трис–HCl (pH 8.0), и осветляли при 30 000 об/мин (ротор 50.1, Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 30 мин. Мочевинный супернатант очищали при помощи гель-фильтрационной хроматографии (п. 2.2.1). Объединённые после хроматографии фракции длительно (2-3 суток) диализовали против раствора, содержащего (мМ): 30 KCl, 2 NaN₃, 2 DTT, 1 MgCl₂, 20 имидазол–HCl (pH 6.5) при +4 °С.

2.1.2. Выделение сократительных белков из скелетных мышц кролика

Миозин, актин и тропомиозин получали из скелетных мышц спины и задних конечностей кролика. Миозин был получен в соответствии с протоколом Маргоссиан и Лоуи (Margossian, Lowey, 1982) и хранился в 25 % глицерине при –40 °С.

Получение актина кролика из ацетонового порошка

Для получения ацетонового порошка мышечный остаток дважды экстрагировали в течение 20 мин в 8 объемах раствора (мМ): 600 KCl, 10 Na₄P₂O₇, 2 EGTA, 2 MgCl₂, 0.5 PMSF, 0.5 DTT, 100 фосфатный буфер (pH 6.5) (Шелудько, 1975; Шелудько, Пинаев, 1975). Экстракт центрифугировали при 5 000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант использовали в качестве источника тропомиозина скелетных мышц. Осадок после центрифугирования дважды отмывали в пяти объемах дистиллированной воды и дважды в пяти объемах 5 мМ NaHCO₃, суспендировали и осаждали при 5 000 об/мин в течение 10 мин. Далее

четыре раза обрабатывали холодным ацетоном (в 8, 4, 2 и 1 объёмах, соответственно). Ацетонизированный остаток отжимали через марлю, сушили под тягой и досушивали в вакуумной камере до исчезновения запаха ацетона. Готовый порошок хранили при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для получения актина, ацетоновый порошок дважды экстрагировали на льду при медленном перемешивании в течение 15 мин в 20-ти объёмах и 5 мин в 10-ти объёмах G-буфера (п. 2.1.1), содержащего (мМ): 0.5 АТФ, 0.2 CaCl_2 , 1.0 ДТТ, 3 NaN_3 , 2 Трис- HCl (рН 8.0). Объединенные экстракты осветляли центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 10 мин. Далее экстракт G-актина полимеризовали путем добавления 0.11 объема полимеризующего раствора (п. 2.1.1). Полимеризация проходила при комнатной температуре в течение одного-двух часов. После полимеризации к фибриллярному актину добавляли раствор 3 М KCl до 0.6 М, и через 30 мин актин осаждали при 40 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 90 мин. Осаждённый актин промывали G-буфером, суспендировали при помощи поршневой пипетки до однородного состояния и деполимеризовали двухдневным диализом против 20 объемов G-буфера с двумя-тремя сменами. Свидетельством окончания диализа была потеря вязкости раствора белка в диализном мешке.

После диализа деполимеризованный актин осветляли при 50 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 60 мин. В зависимости от поставленных задач, осветлённый G-актин либо очищали на колонке (п. 2.2.1), либо полимеризовали. Для длительного хранения актин кролика лиофилизировали в G-форме или в F-форме (F-форма в присутствии 10% сахарозы). После растворения лиофильных препаратов для удаления белковых агрегатов проводили дополнительный цикл очистки деполимеризацией.

Получение тропомиозина кролика

Очистку тропомиозина из высокоионного экстракта проводили в соответствии с протоколом Смилли (Smillie, 1982). ТМ осаждали кристаллическим СА в пределах 40–60% насыщения. Выпавшую фракцию

растворяли в минимальном объёме базового раствора DS/75 и диализовали против 10–15 объёмов этого раствора в течение суток с двумя-тремя сменами. Диализат осветляли при 14 000 об/мин в течение 30 мин. К супернатанту добавляли 3 М KCl до 0.5–1.0 М и осаждали тропомиозин согласно Байли (Bailey, 1948) по изоэлектрической точке (pH 4.6 ±0.1). Электрофореграмма очищенного ТМ кролика представлена в гл. 3.1 (рисунок 5, дорожка 10). Для хранения тропомиозин лиофилизировали или замораживали (без криопротекторов).

2.1.3. Реконструкция белок-белковых моделей

Модели для измерения Mg^{2+} -АТФазы

В состав реконструированного актомиозина в разных комбинациях входили: F-актин кролика или F-актин мидии (FA), миозин кролика или мидии (Mn), нефосфорилированный или фосфорилированный миород мидии (MR и pMR).

Для приготовления контрольного актомиозина (без миорода) миозин с актином смешивали в высокой ионной силе (0.5 М KCl) в необходимых расчётных соотношениях, весовое соотношение FA:Mn = 2:1; смесь разбавляли до экспериментальной концентрации и необходимого объёма комбинацией двух растворов – низкоионный раствор А, (в mM): 2 $MgCl_2$, 2 NaN_3 , 0.3 $CaCl_2$, 20 имидазол–HCl (pH 7.0) и раствор Б с необходимой для эксперимента ионной силой: раствор А с добавлением 30, 75 или 100 mM KCl. Раствор А позволял установить необходимую ионную силу (30, 75 или 100 mM KCl), а раствор Б – требуемую концентрацию белков.

Для реконструирования актомиозина в присутствии миорода (весовое соотношение FA:Mn:MR = 2:1:1), сначала смешивали в высокой ионной силе миозин и фосфорилированный или нефосфорилированный миород. Затем смеси разбавляли до 100 mM KCl с помощью раствора А, и инкубировали в течение 20 мин при температуре +4 °C: при данных условиях образовывались миозин-миородовые сополимеры (Shelud'ko et al., 2001). Далее добавляли к смеси актин и подводили ионную силу и концентрацию белков до экспериментальных значений при помощи растворов А и Б. Так же в экспериментах по влиянию на Mg^{2+} -

АТФазу разного количества миорода его варьировали в диапазоне 0.025–0.5 мг/мл при постоянном значении миозина 0.1 мг/мл.

Модели для вискозиметрии

Для измерения вязкости белки готовили двумя способами. В первом случае делали пробу с максимальной исследуемой концентрацией белка (актин или миород) или белкового комплекса (смесь актина с тропомиозином или с миородом), которую, после 7–10 измерений, разбавляли буферным раствором до следующей точки значения концентрации. При другом подходе для каждой точки делали отдельную пробу с белком или белковым комплексом. Белки смешивали в диапазоне концентраций, позволяющих измерения при помощи шарикового вискозиметра и в исследуемых пропорциях (FA:TM=7:1 и FA:MR= 2:1).

Модели для соосаждения

К препарату очищенного nFA добавляли кальпонин в разных молярных соотношениях (от 1:0.06 до 1:1), инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, затем смеси диализовали в течение суток против 10–12 объёмов G-буфера и центрифугировали в условиях осаждения полимерного актина (п. 2.3.2). Эквивалентные соотношения проб осадков и супернатантов анализировали при помощи ДСН-электрофореза (п. 2.2.2).

Препарат очищенного nFA и его смесь с тропомиозином в физиологическом молярном соотношении FA:TM = 7:1 (Stewart, McLachlan, 1975) диализовали против 10–12 объёмов G-буфера в течение суток. В качестве контроля такие же пробы диализовали против DS/75. После диализа препараты центрифугировали в условиях осаждения полимерного актина (п. 2.3.2). Результаты контролировали так же при помощи ДСН-электрофореза (п. 2.2.2).

2.2. Биохимические методы

2.2.1. Гель-фильтрационная хроматография

Хроматография актина

Глобулярный актин хроматографировали на полисахаридной матрице "Sephadex G-100" (Pharmacia, Швеция), объём геля составлял 243 ± 2 мл. Колонку (25*630 мм) уравнивали G-буфером (п. 2.1.1), его использовали и как элюирующий раствор. Белковый раствор G-актина (около 36 мг белка) наносили при помощи насоса; скорость элюирования – 0.4 мл/мин, объём собираемых фракций – 4 мл. Детектирование фракций проводили по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda = 280$ нм с помощью спектрофотометра UV mini-1240 (Shimadzu, Япония).

Хроматография миорода

Хроматографию миорода проводили на молекулярной матрице "Sepharose CL-6B" (Sigma-Aldrich, США). Объём геля составлял 230 мл. Колонку (25×600 мм) уравнивали мочевиным буфером (п. 2.1.1). Мочевинный супернатант миород-содержащей фракции (около 50 мг белка) наносили при помощи насоса; скорость элюирования – 0.4 мл/мин, объём собираемых фракций – 4 мл. Фракции детектировали при помощи ДСН-электрофореза.

2.2.2. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле

Разделение и идентификацию белковых зон методом ДСН-электрофореза проводили в полиакриламидном геле (14%, 13% или 7.5% акриламида) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по стандартной методике (Laemmli, 1970) с некоторыми модификациями (Шелудько, 1975; Shelud'ko et al., 1999). Электрофорезные пробы готовили путём смешивания равных объёмов белковой пробы и раствора, содержащего 8.5 М мочевины, 0.25 М Трис–НСl (рН 6.8), 4% ДСН, 50 мМ DTT, 5 мМ EDTA, 150 мкл насыщенного раствора бромфенолового синего.

Разделяющий гель: 7.13 мл 1.5 М Трис (0.48 М), 475 мкл 6.02 М HCl (0.7 М), 7.88 мл 40% акриламида (AA) для получения 14% геля (для 13% или 7.5% добавляли 7.31 или 4.22 мл, соответственно), 1.13 мл 2.5% bis-AA (0.125 %), доводили бидистиллированной водой до конечного объема 22 мл. Смесь прогревали до 35°C с постоянным тщательным перемешиванием. Полимеризацию инициировали добавлением 15 мкл TEMED (тетраметилэтилендиамин) и 200 мкл 2.5% PSA (персульфат аммония). В разделяющем геле значение pH 8.2. Полученный раствор заливали в блок между двумя стеклянными пластинами (13×18 см). После окончания полимеризации (20–30 мин), при помощи гребёнки, формирующей кармашки для нанесения проб, на разделяющий гель наносили раствор *концентрирующего геля*, содержащего: 0.5 мл 1.5 М Трис (0.19 М), 120 мкл 6.02 М HCl, 0.4 мл 40% AA (4 %), 1 мл 2.5% bis-AA (0.6%), 1.93 мл 40%-го глицерина. Полимеризацию инициировали добавлением 5 мкл TEMED и 45 мкл 2.5% PSA. В концентрирующем геле значение pH 7.0.

Блок с залитым между стёклами гелем помещали в электрофорезную камеру, которую предварительно заполняли трис-глициновым электродным буфером, содержащим 0.025 М Трис и 0.25 М глицина (значение pH 8.3). В камеру с отрицательной («-») полярностью дополнительно добавляли 5 мл 10%-го ДСН. В кармашки концентрирующего геля аккуратно при помощи 20 мкл шприца "Hamilton" наносили электрофорезные пробы (5, 10 мкл). Конечная концентрация белков в пробе составляла примерно 0.5–1.0 мг/мл.

Концентрирование проб проводили при токе 20 мА в течение 30–40 мин. Разделение белков происходило при токе 45 мА (~ четыре часа). При достижении полосы красителя конца разделяющего геля ток выключали, гель извлекали из блока и фиксировали в течение 15–20 мин в растворе, содержащем этанол, воду и уксусную кислоту в пропорции 5:4:1. Гели окрашивали 15–20 мин таким же раствором, но с добавлением 200 мг красителя Кумасси G-250. Краситель отмывали раствором 7% уксусной кислоты до полного исчезновения фоновой окраски. Все процедуры по фиксации, окраске и отмывке проводились при

постоянном покачивании. Для оцифровки гели сканировали и обрабатывали при помощи графических редакторов.

2.2.3. Фосфорилирование миорода

Миород фосфорилировали гладкомышечной киназой лёгких цепей миозина (КЛЦМ) (Sobieszek et al., 2006). К миороду в буферном растворе, содержащем (мМ): 150 KCl, 0.5 MgCl₂, 2 NaN₃, 0.5 DTT, 20 имидазол–HCl (pH 7.0) добавляли 3 мкМ КЛЦМ, 7 мкМ кальмодулина ("Sigma-Aldrich"), 0.1 мМ CaCl₂ и 1 мМ АТФ и инкубировали в течение часа при 25 °С. Фосфорилирование останавливали понижением ионной силы до 30 мМ KCl (разбавляли реакцию смесь буферным раствором без содержания KCl). Фосфорилированный миород осаждали при 5 000 об/мин в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали и промывали три раза при помощи того же буферного раствора. Те же процедуры, но без добавления КЛЦМ, проводили для получения контрольного препарата нефосфорилированного миорода.

2.2.4. Определение концентрации белков

Для определения концентрации белков применяли метод Биурета с модификациями (Itzhaki, Gill, 1964; Пермякова, 1997). Смешивали 100 мкл (50 мкл, 200 мкл) исследуемого белкового раствора с 1.9 мл (1.95 мл, 1.8 мл, соответственно) раствора 1 М NaOH и 1 мл биуретового красителя (0.2% раствор CuSO₄ в 1 М NaOH), готовили по три параллели для каждой пробы. После развития окраски (10 минут) измеряли экстинкцию окрашенного белкового раствора при длине волны 310 нм (E₃₁₀) с помощью спектрофотометра UV mini-1240 (Shimadzu, Япония). В качестве контроля брали 100 мкл (50 мкл, 200 мкл) буфера, применяемого для работы с белками (т. к. некоторые компоненты, такие как DTT или АТФ, могут так же восстанавливать краситель и давать изменение окраски).

Концентрацию белка вычисляли по формуле:

$$[C_6] = k \times E_{310} \times L \times R, \quad (1)$$

где k – тангенс угла наклона калибровочной кривой, E_{310} – среднее значение поглощения при 310 нм, L – длина оптического пути кюветы, R – разбавление белкового раствора.

2.2.5. Определение Mg^{2+} -АТФазной активности миозина

Неорганический фосфат (свободный P_i) измеряли колориметрически (Tausky, Shorr, 1953) с использованием спектрофотометра UV mini-1240 (Shimadzu, Япония) методом Херса, с некоторыми изменениями, описанными ранее (Shelud'ko et al., 2007). Формирование белковых комплексов (п. 2.1.3) проводили при +4 °С. Конечный объём белковых смесей составлял 2.7 мл. Перед запуском АТФазной реакции пробирки с белковыми комплексами инкубировали в термостате при температуре +25 °С в течение 10 мин. Реакцию инициировали добавлением Mg^{2+} -АТФ до 0.3 мМ и прекращали через 10 мин добавлением ТХУ (трихлоруксусная кислота) до 5%. Денатурированные белки удаляли центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 20 мин. К 2 мл супернатанта, содержащего неорганический фосфат, добавляли 232.6 мкл молибденового реактива: смесь равных объёмов молибденовокислого аммония – $(NH_4)_2MoO_4$ (раствор 2.5%) и серной кислоты – H_2SO_4 (раствор 5 М). Далее добавляли 93 мкл эйконогена (α -1,2,4-аминонафтолсульфоная кислота, основной раствор). С момента добавления эйконогена пробы инкубировали 20 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при длине волны 625 нм.

Количество неорганического фосфата и АТФазную активность рассчитывали по формулам:

$$[P_i] = 0.352 \times E_{625}, \quad (2)$$

где $[P_i]$ – количество неорганического фосфата, E_{625} – экстинкция при 625 нм; 0.352 – расчётный коэффициент угла наклона калибровочной кривой для данного спектрофотометра.

$$\text{АТФаза} = [P_i] / (t_{\text{реакции}} \times [Mn]) = \text{мкмоль } P_i / \text{мг Mn} / \text{мин}, \quad (3)$$

где АТФаза – Mg^{2+} -АТФазная активность, $[Mn]$ – концентрация миозина в мг/мл, $t_{реакции}$ – время проведения реакции в минутах.

2.3. Физико-химические методы

2.3.1. Измерение вязкости

Вязкость измеряли при низких градиентах скорости методом "падающего шарика" (Pollard, 1982; Pollard, Cooper, 1982) с использованием шарикового вискозиметра, изготовленного в лаборатории биофизики клетки. Измерения проводили при 22–25 °С; перед измерением вязкости пробы (п. 2.1.3) инкубировали при комнатной температуре в течение 10–15 мин и помещали в капилляр шарикового вискозиметра при помощи силиконовой трубки и шприца. Электронный секундомер включали при пересечении шариком верхней метки капилляра и выключали при пересечении нижней метки. Для получения среднего времени прохождения шарика через капилляр (t_{cp}) делали не менее 7–10 измерений для каждой точки. В начале периода измерений определяли время прохождения шарика через дистиллированную воду (t_0).

Приведённую вязкость (η прив.) рассчитывали по формуле:

$$\eta_{прив} = [(t_{cp} - t_0) / t_0] / C, \quad (4)$$

где t_{cp} – усредненное время прохождения шарика через белковый раствор, t_0 – время прохождения шарика через растворитель, C – концентрация белка в мг/мл.

Характеристическая вязкость:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{прив}, \quad (5)$$

определяется путем экстраполяции приведенной вязкости к "нулевой" концентрации, так как она является предельным значением приведённой вязкости при концентрации раствора, стремящейся к нулю. Обработку результатов проводили при помощи графической программы "GraphPad Prizm 4" (США).

Удельной вязкостью ($\eta_{\text{уд}}$) называют отношение разности времени пробегания шарика через белковый раствор (t) и времени пробегания шарика через растворитель (t_0) ко времени пробегания шарика через растворитель (t_0):

$$\eta_{\text{уд}} = (t - t_0) / t_0 \quad (6).$$

Она показывает, насколько увеличилась вязкость раствора белкового полимера по сравнению с вязкостью растворителя. И тогда приведенной вязкостью ($\eta_{\text{пр}}$) является отношение удельной вязкости раствора белкового полимера к его концентрации (C):

$$\eta_{\text{пр}} = \eta_{\text{уд}} / C \quad (7).$$

2.3.2. Высокоскоростное осаждение белковых комплексов

Смеси белков (п. 2.1.3) центрифугировали в условиях осаждения полимерного актина: 40 000 об/мин (Optima L-90K, Beckman Coulter, США) 120 минут. Полученные осадки промывали дистиллированной водой и солюбилизировали 8.5 М мочевиной с 5 мМ EDTA. Супернатанты концентрировали добавлением ТХУ до 2.5%, осаждали и промывали дистиллированной водой и так же солюбилизировали 8.5 М мочевиной с 5 мМ EDTA. Эквивалентные соотношения проб осадков и супернатантов анализировали при помощи ДСН-электрофореза (п. 2.2.2).

2.3.3. Измерение рассеяния света

Измерения рассеяния света проводили на спектрофотометре Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, ГДР). Интенсивность света рассеянного при 90° измеряли при длине волны 400 нм.

2.3.4. Полимеризация лиофилизованного G-актина мидии в F-актин

Ллиофилизированный актин мидии в глобулярной форме хранили при -40°C . Непосредственно перед использованием к 10 мг лиофилизованного актина добавляли 2 мл холодной дистиллированной воды с 1 мМ АТФ. После

растворения актина его полимеризовали добавлением KCl до 50 мМ, MgCl₂ до 2 мМ, выстаивали в течение часа при комнатной температуре и собирали центрифугированием при 55 000 об/мин (TLX, Beckman, США) 120 минут. Осадок актина суспендировали в дистиллированной воде с добавлением 1 мМ АТФ, а затем диализовали против 10 объёмов раствора, содержащего (мМ): 0.05 MgCl₂, 1 NaN₃, 1 АТФ, 5 HEPES (pH 7.5) в течение суток с двумя сменами. Глобулярный актин осветляли 85 000 об/мин (TLX, Beckman Coulter, США) 60 минут. Супернатант далее полимеризовали как описано выше (п. 2.1.1).

2.4. Электронная микроскопия

Для электронной микроскопии 5–10 μМ глобулярного актина мидии *Crenomytilus grayanus* полимеризовали в растворе, содержащем (мМ): 50 KCl, 1 MgCl₂, 0.5 АТФ, 1 DTT, 5 фосфатного буфера (pH 7.2) в течение двух часов. Для получения проб для микроскопии, 2–5 μМ F-актина наносили на сетчатые, покрытые углеродом подложки и окрашивали 2% водным уранилацетатом. Изображения были получены при ускоряющем напряжении 80 кВ и при номинальном увеличении 30 000 X на электронном микроскопе Tecnai-12 (FEI Company, США).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение глобулярной формы актина из запираательных мышц двустворчатых моллюсков

Глобулярный актин из запираательных мышц *Crenomytilus grayanus* получали по разработанной нами методике. Рисунок 4 иллюстрирует идею нашего метода деполимеризации актина; на рисунке 5 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) (рисунок 5, дорожка 1) в присутствии 15 мМ аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ, $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$) и 5 мМ пиродифосфата натрия ($Na_4P_2O_7$) (п. 2.1.1) с последующим высокоскоростным осаждением (рисунок 5, дорожки 2 и 3). ТНН содержали в своем составе актин, две изоформы кальпонины 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) (неопубликованные данные масс-спектрометрии) и компоненты тропонинового комплекса – ТnT, ТnI и ТnC (Vyatchin et al., 2015).

Полученные в результате этой процедуры ТНН переводили в высокую ионную силу (ВИС) посредством добавления к осаждённому экстракту KCl до 0.6 М (рисунок 4, "условия диссоциации") и снова центрифугировали (рисунок 5, дорожки 4 и 5). При таких условиях мы получили "природный" полимерный актин мидии (nFA), который по результатам электрофореза не содержал примесей других белков (рисунок 4, "nFA"; рисунок 5, дорожка 4).

Заключительным этапом получения глобулярной формы актина мидии являлся диализ очищенной nFA-формы против низкоионного деполимеризующего раствора (G-буфер, п. 2.1.1) в течение 24–48 часов (рисунок 4, "условия деполимеризации"). В таких условиях nFA деполимеризовался в неденатурирующих условиях. После диализа деполимеризованный актин мидии

(G-форма) осветляли высокоскоростным осаждением и таким образом в супернатанте получали G-актин.

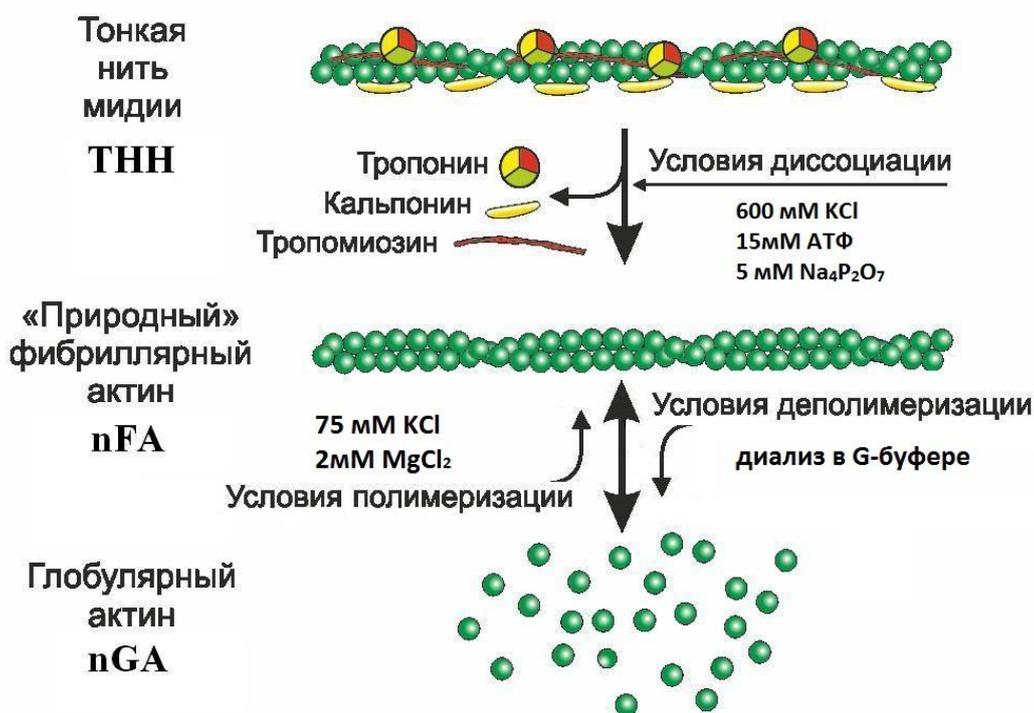


Рисунок 4 – Схема получения "природного" глобулярного актина из запирающей мышцы мидии.

Такой подход кардинально отличается от традиционного получения актина из скелетных мышц позвоночных животных при помощи высушивания мышечного остатка ацетоном (Straub, 1942a). При попытках очистки актина из ацетонового порошка запирающих мышц мидии традиционным методом, получали лишь небольшое количество инактивированного актина (не опубликованные данные). Предложенный метод получения "нативного" актина мидии в фибриллярной форме позволяет получить препаративные количества белка (выход составлял 400–420 мг белка на 100 г мышц), при этом выход G-актина составлял 3.5–4 мг на 1 г мышцы.

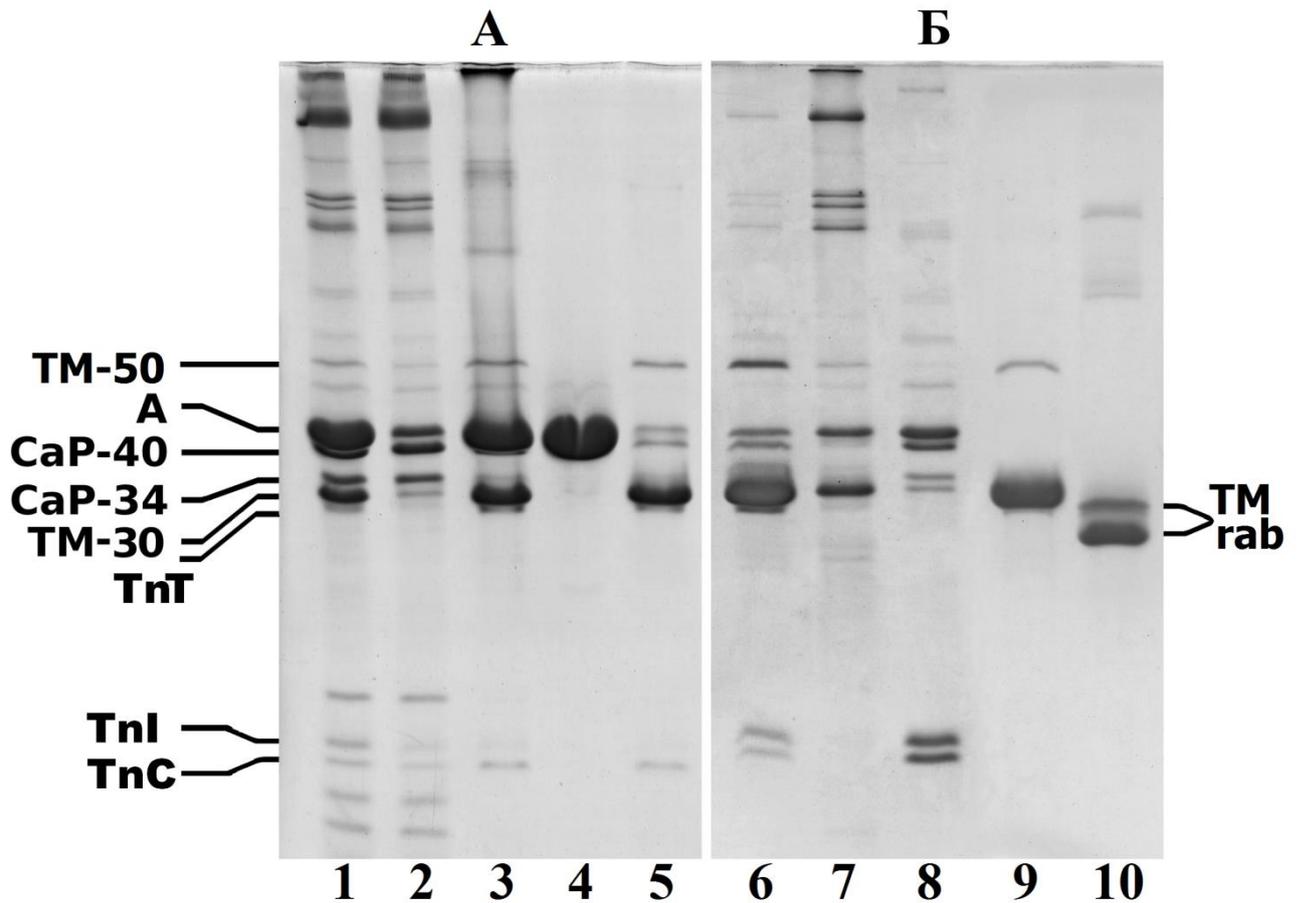


Рисунок 5 – Этапы очистки "природного" актина (А) и тропомиозина (Б) из запирающей (catch) мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* (ПААГ-14 %).

Дорожка 1, тонкие нити, состоящие из актина (А), кальпонинов с молекулярным весом 40 кДа (CaP-40) и 34 кДа (CaP-34), двух изоформ тропомиозина (TM-50 и TM-30), компонентов тропонинового комплекса (TnT, TnI и TnC).

Дорожка 2, супернатант высокоскоростного осаждения тонких нитей.

Дорожка 3, осадок высокоскоростного осаждения тонких нитей.

Дорожка 4, препарат "природного" фибриллярного актина (nFA) - осадок ультраосаждения из 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 (TM_{rab}).

3.1.1. Очистка глобулярного актина мидии при помощи гель-фильтрации

Методом гель-фильтрации мы проанализировали чистоту полученного образца G-актина. На рисунке 6 представлена хроматограмма профиля элюции актина и электрофореграмма, соответствующая некоторым фракциям пика хроматографии. Кривая элюции актина представляла собой характерную колоколообразную зависимость. На электрофореграмме рисунка 7 представлены пробы актина мидии и кролика до хроматографического разделения (дорожки 1 и 2) и на разных этапах элюирования (дорожки 3–11): начало элюирования (I), центральная часть (II) и окончание элюирования (III).

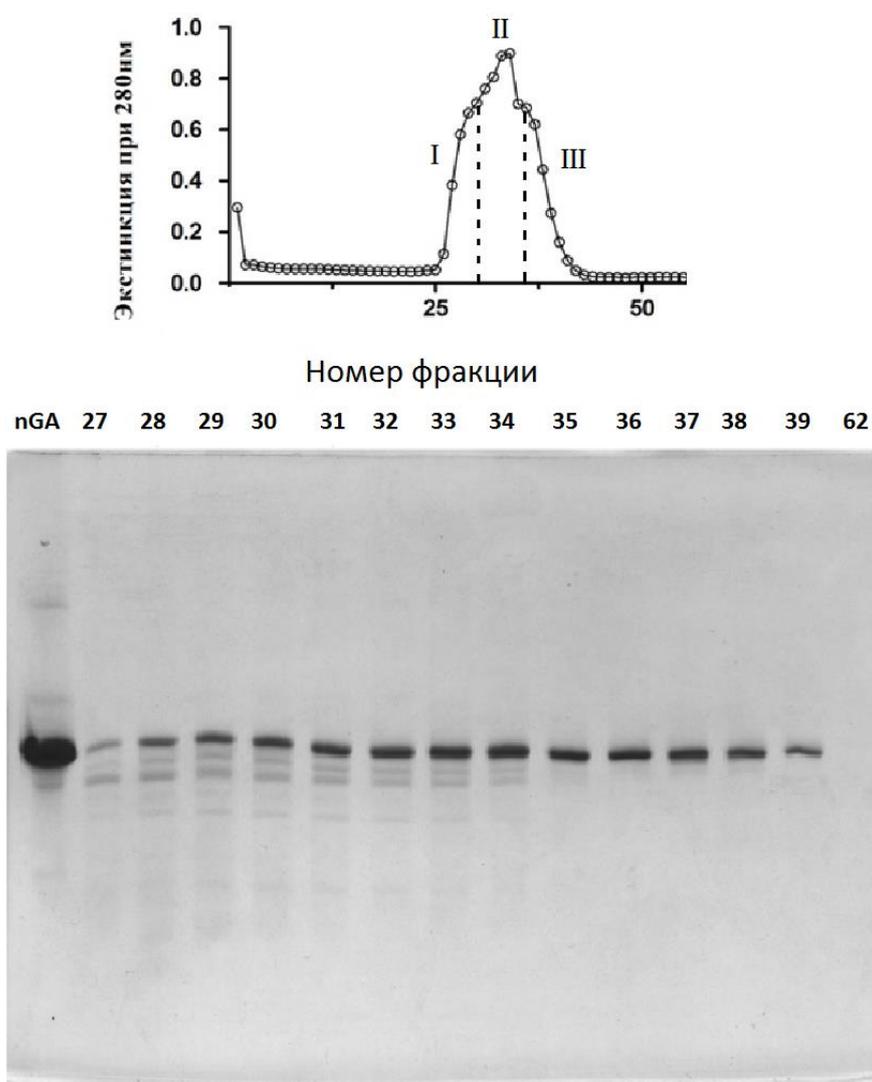


Рисунок 6 — Гель-фильтрационная хроматография глобулярного актина мидии на носителе "Сефадекс G-100" с соответствующей электрофореграммой фракций (ПААГ-13%).

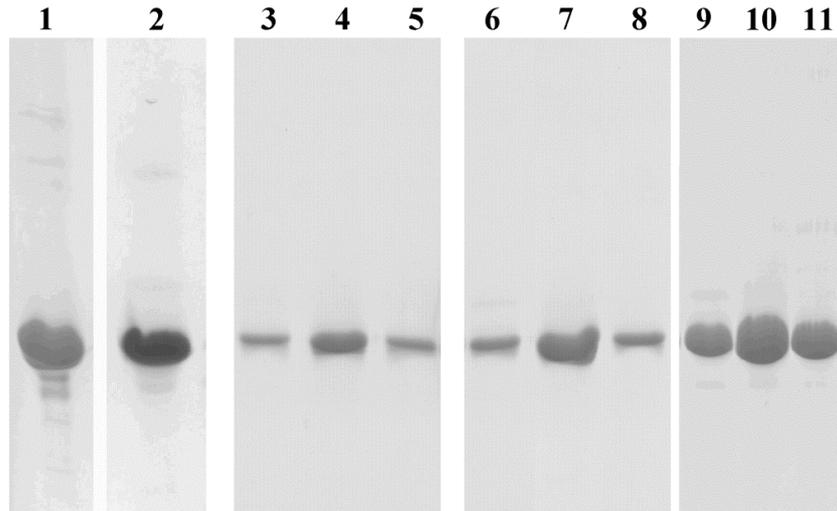


Рисунок 7 – Электрофореграммы актина мидии и актина кролика (ПААГ-14 %).

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: I (3), II (4) и III (5).

Дорожки 6, 7, 8, хроматографически очищенный актин мидии – три фракции пика хроматографии: I (6), II (7) и III (8).

Дорожки 9, 10, 11 аналогичны дорожкам 6, 7, 8, но с трехкратно увеличенной нагрузкой.

Представленная в работе методика, кроме чистого F- и G-актина мидии позволяет получить большое количество тропомиозина из супернатанта после ВИС-осветлённого актина (рисунок 5, дорожки 5 и 6) как описано в "Методах" (п. 2.1.1). Присутствие примесей ТМ может существенно влиять на характер деполимеризации актина мидии (см. далее в гл. 3.2.2 на рисунке 9), поэтому очистке препаратов актина от ТМ уделялось особое внимание.

3.1.2. Факторы, ингибирующие деполимеризацию "природного" актина мидии

Получив глобулярный актин из запирающей мышцы мидии без использования ацетона (с применением АТФ и пиррофосфата натрия), мы решили выяснить, что могло препятствовать деполимеризации nFA. Одним из факторов, влияющих на деполимеризацию актина, могла быть примесь поверхностных

белков во фракции nFA, таких как кальпонин или тропомиозин. Влияние двух указанных белков на деполимеризацию очищенного nFA, который ещё не подвергался деполимеризации, было проверено в серии экспериментов. В первом случае nFA смешивали с кальпонином в разных соотношениях, диализовали против G-буфера и центрифугировали. Мы обнаружили, что в отсутствие добавления кальпонины весь актин деполимеризовался в низкоионном G-буфере и при высокоскоростном осаждении оставался в супернатанте (рисунок 8, дорожка 0 моль/моль).

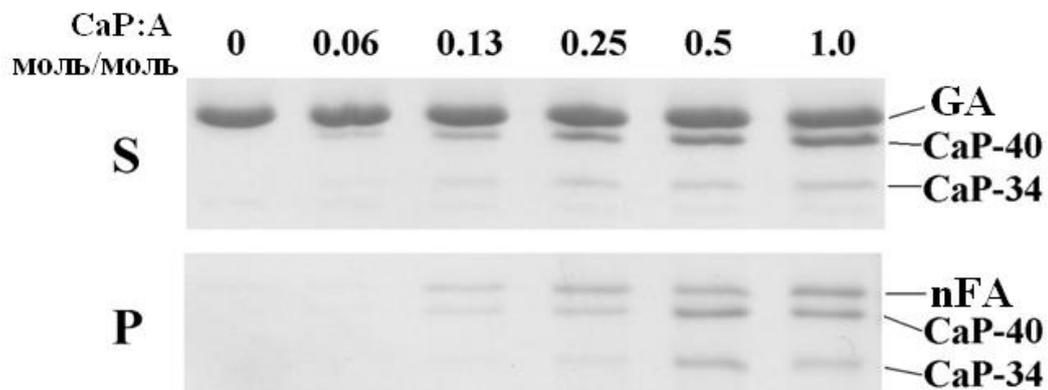


Рисунок 8 – Влияние кальпонины на деполимеризацию актина мидии Грея (ПААГ-13%). S – ультрасупернатант; P – ультраосадок; nFA – актин в фибриллярной форме; GA – актин в глобулярной форме; CaP-34 и CaP-40 – кальпонины 34 и 40 кДа соответственно.

По мере добавления кальпонины постепенно увеличивалось количество недеполимеризованного актина (рисунок 8, P-осадок, дорожки 0.06 – 1.0 моль/моль). При этом большая часть актина деполимеризовалась и оказалась в супернатанте, но с ним в растворе так же оказался и кальпонин, загрязняя препараты глобулярного актина (рисунок 8, S-супернатант, дорожки 0.06 - 1.0 моль/моль). Таким образом, было показано, что кальпонин может оказывать влияние на деполимеризацию актина, однако значительная часть актина деполимеризовалась даже в присутствии кальпонины. При этом G-актин оказался загрязнён его примесями.

В другом случае тестировали влияние тропомиозина: nFA и его смесь с тропомиозином (в физиологическом соотношении A:TM = 7:1) диализовали

против G-буфера; в качестве контроля такие же пробы диализовали против DS/75 (75 mM KCl, п. 2.1.1). Полимерный актин, который диализовали против G-буфера почти весь оказался в супернатанте после высокоскоростного центрифугирования, т.е. перешёл в G-форму (рисунок 9А). Контрольный препарат при этом полностью осаждался (рисунок 9В). В осадке так же оказался и комплекс актина с тропомиозином (nFA-TM), который диализовали против DS/75 (рисунок 9Г). Однако в случае комплекса актина с тропомиозином, который диализовали против G-буфера около половины актина деполимеризовалась – осталось в супернатанте (рисунок 9Б), а половина осадилась. Таким образом, мы обнаружили, что тропомиозин частично ингибировал деполимеризацию актина. Механизм этого ингибирования неясен, но очевидно, что наличие в препаратах актина примесей тропомиозина снижает степень деполимеризации актина мидии.

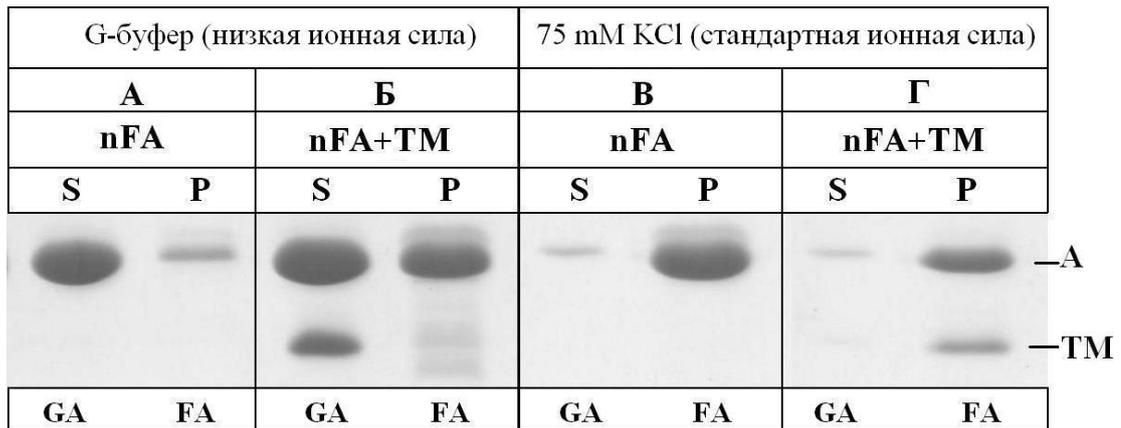


Рисунок 9 – Влияние тропомиозина мидии (TM) на деполимеризацию актина мидии (nFA, A) (ПААГ-14%). S – ультра супернатант; P – ультраосадок; GA – глобулярный актин – деполимеризованный; FA – фибриллярный актин – недеполимеризованный.

После того, как нами была получена глобулярная форма актина из запирающих мышц *Crenomytilus grayanus*, дальнейшие эксперименты были направлены на сравнение актина мидии и актина из скелетных мышц позвоночных, который традиционно применяется в биохимических сократительных моделях, в том числе и для изучения механизмов запирающего сокращения в мышцах моллюсков.

3.2. Сравнение гладкомышечного актина моллюсков со скелетномышечным актином позвоночных животных

3.2.1. Молекулярная масса и электронная микроскопия актина из мышц мидии и актина из мышц кролика

После получения чистого глобулярного актина из запирательных мышц мидии мы сравнивали его с полученным по классической методике актином скелетных мышц. В первую очередь мы обратили внимание на то, что электрофоретическая подвижность актина из запирательной мышцы мидии (рисунок 7, дорожка 2) была такая же, как и у актина из скелетной мышцы кролика (рисунок 7, дорожка 1), что свидетельствует об одинаковых значениях их молекулярных масс.

Методами электронной микроскопии были получены микрофотографии полимеров актина *Crenomytilus grayanus*, (рисунок 10А). Полимеры актина мидии и полимеры актина кролика не имеют видимых отличий (рисунок 10).

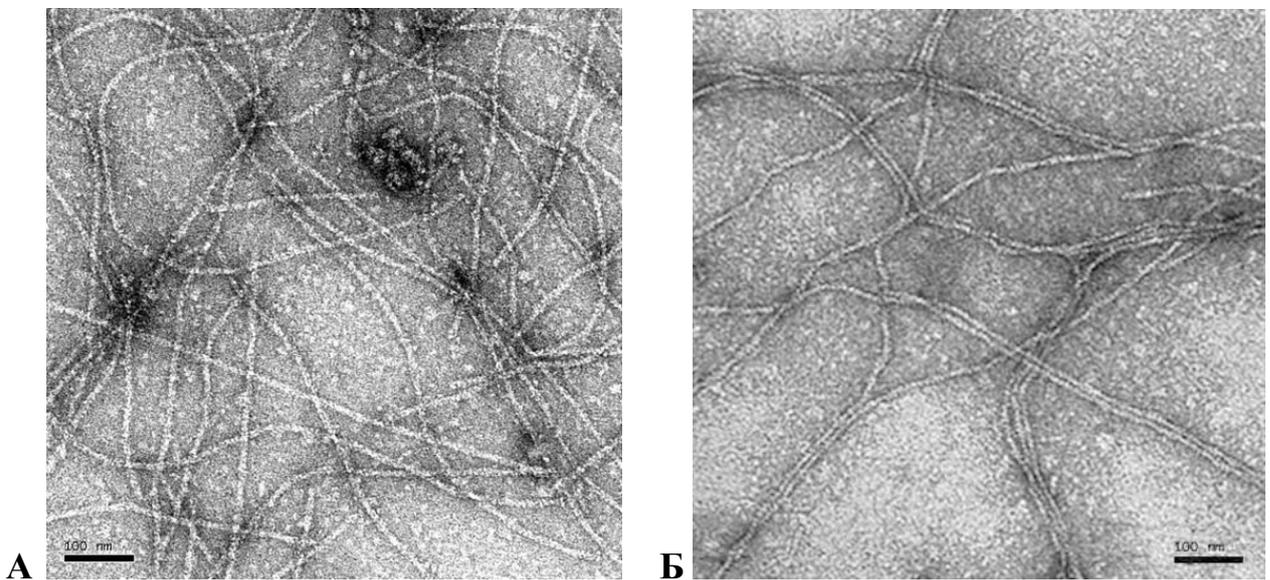


Рисунок 10 — Электронные микрофотографии полимеров "природного" актина *Crenomytilus grayanus* и полимеров актина кролика. (А) — актин мидии (5 μM) в растворе, содержащем (мМ): 50 KCl, 1 MgCl₂, 0.5 АТФ, 1 DTT, 5 Na-фосфат (pH 7.2), масштабный отрезок 100 нм. (Б) — актин кролика (7 μM) (по: Galińska-Rakoczy et al., 2009) в растворе, содержащем (мМ): 2 MgCl₂, 0.2 АТФ, 0.5 DTT, 10 HEPES (pH 7.0), масштабный отрезок 100 нм.

3.2.2. Кинетика полимеризации актина мидии и актина кролика

Мы тестировали кинетику полимеризации актинов, регистрируя изменение светорассеяния раствора, в котором происходил переход актина из G-формы в F-форму при добавлении полимеризующего раствора (рисунок 11). Было показано, что для обоих актинов при равных условиях кинетика полимеризации практически совпадает. Для кролика максимальное значение относительных единиц светорассеивания (V_{max}) = 687.8 ± 22.3 , а время полимеризации 50 % белка (K_{50}) составляет 5.901 ± 0.52 мин; для мидии V_{max} = 602.8 ± 13.96 и K_{50} = 5.018 ± 0.343 мин (посчитано в программе "Prism4" GrafPad Software Inc.).

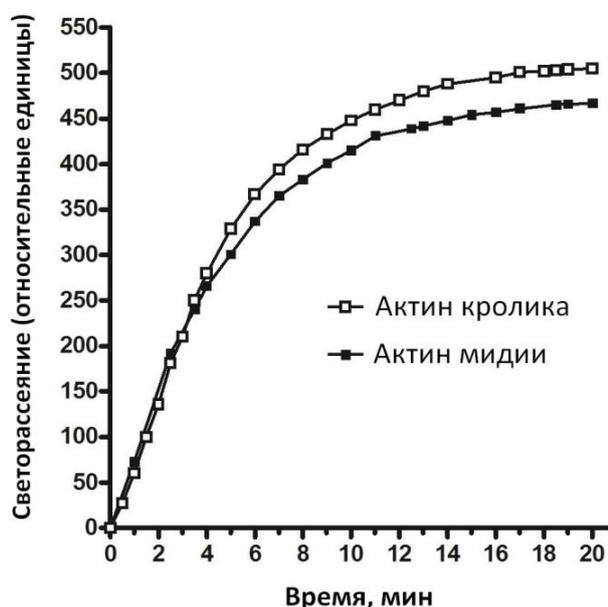


Рисунок 11 — Кинетика полимеризации актина мидии и актина кролика, регистрируемая при помощи светорассеяния. В растворе (мМ): 1.2 АТФ, 0.2 CaCl₂, 1 DTT, 3 NaN₃, 5 Трис-НСI (рН 7.5); концентрация G-актина: 0.84 мг/мл; полимеризацию запускали добавлением KCl до 25 мМ и MgCl₂ до 2 мМ при 25 °С.

3.2.3. Активирование актином мидии и актином кролика Mg²⁺-

АТФазной активности скелетномышечного миозина

При тестировании способности актина мидии и актина кролика активировать Mg²⁺-АТФазную активность скелетномышечного миозина мы не обнаружили разницы между этими актинами (рисунок 12). Показано, что они одинаково активируют миозин в растворе, содержащем 75 мМ KCl. При этом,

актины незначительно отличаются в растворе с пониженной ионной силой (30 мМ КСl) в области низких концентраций: 170 ± 5 нмоль/мг/мин и 140 ± 5 нмоль/мг/мин для 0.05 мг/мл актина мидии и актина кролика или 180 ± 2 нмоль/мг/мин и 160 ± 2 нмоль/мг/мин для 0.1 мг/мл актина мидии и актина кролика.

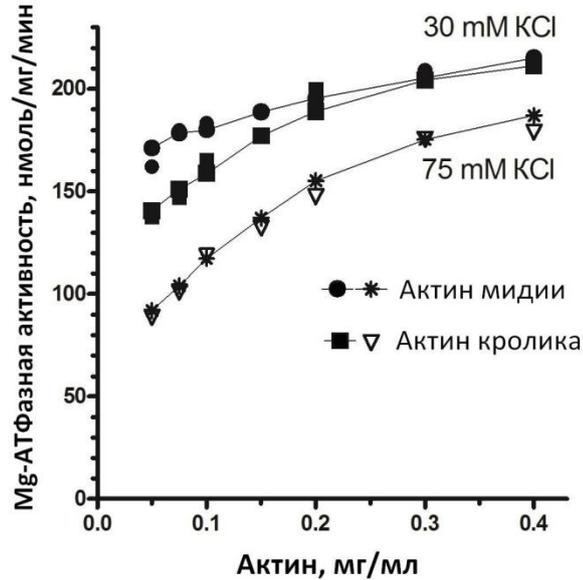


Рисунок 12 – Активация Mg^{2+} -АТФазной активности миозина кролика "природным" актином мидии и штраубовским актином кролика при разной ионной силе раствора (75 мМ или 30 мМ КСl), рН 7.0, 0.4 мМ АТФ, 25 °С.

3.2.4. Тестирование вязкости растворов актина из мышц мидии и актина из мышц кролика

При тестировании вязкости растворов полимерного актина из гладких мышц *Crenomytilus grayanus* и актина из скелетных мышц кролика, мы обнаружили значительное отличие между ними. На рисунке 13 представлены зависимости приведённой вязкости от концентрации белка и их экстраполяция к нулевой концентрации для определения характеристической вязкости (пересечение с осью Y). Характеристическая вязкость актинов отличалась в 6–8 раз. "Природный" актин мидии имел неожиданно низкую вязкость в отличие от штраубовского актина кролика. Из всех выполненных тестирований, лишь в этом было выявлено значительное отличие между актинами.

В ходе получения чистого актина мидии мы проводили процедуру переполимеризации путем диализа nFA против G-буфера, осветления и полимеризации полученного G-актина. Этот этап лишь незначительно увеличивал вязкость актина (рисунок 13, nFGFAm_{myt}) в сравнении с исходным nFA.

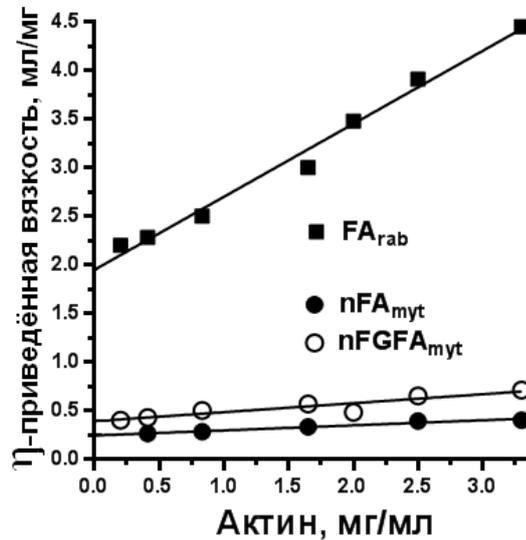


Рисунок 13 – Приведённая и характеристическая вязкость традиционного актина кролика (FA_{rab}), "природного" актина мидии (nFA_{myt}) и переполимеризованного "природного" актина мидии (nFGFA_{myt}). В растворе (мМ): 50 KCl, 2 MgCl₂, 1.2 АТФ, 0.2 CaCl₂, 1 DTT, 3 NaN₃, 5 Трис–HCl (pH 7.5); 23 °С.

Эти отличия в вязкости мы получили с использованием шарикового вискозиметра (т.е. при низких силах сдвига). Вероятнее всего такие отличия могут быть связаны с длиной полимеров актина, которые в случае актина мидии, по данным вискозиметрии, являются короче полимеров актина кролика. Мы предположили, что на длину актинового полимера могут влиять минорные примеси белков концевых факторов (англ. "capping proteins"), эффект которых значителен даже в минорном количестве или, например, если их молекулярный вес ниже 10 кДа. Вероятнее всего, из-за этих факторов (количество или молекулярный вес) мы и не можем обнаружить их на ДСН-электрофорезе. Если эти примеси присутствуют в хроматографическом препарате актина, то вероятнее всего они связаны с актином и элюируются совместно с ним при хроматографии. Поэтому далее, для обнаружения примесей, влияющих на вязкость полимерного

актина, мы разделили пик хроматографии глобулярного актина на три отдельных фракции (I, II, III) и проверили, будет ли отличаться вязкость этих фракций при последующей полимеризации.

3.3. Хроматографические фракции гладкомышечного актина моллюсков и скелетномышечного актина позвоночных могут иметь примеси белков концевго фактора

Хроматографический пик выхода G-актина мы разделили на три фракции, соответствующие началу элюирования (I), основному выходу белка (II) и окончанию элюирования (III) (рисунок 6; рисунок 7, дорожки 3–11; рисунок 14, А). На электрофореграмме на рисунке 7 мы не обнаружили видимых различий между актином мидии и актином кролика (дорожки 3, 4, 5 – I, II и III фракции актина кролика; дорожки 6, 7, 8 – I, II и III фракции актина мидии).

Тестирование вязкости F-актина, после полимеризации этих трёх хроматографических фракций выявило значительную разницу в приведённой вязкости, как для актина мидии, так и актина из скелетных мышц кролика. Мы получили зависимости приведённой вязкости от концентрации для фракций I, II и III актина мидии и кролика (рисунок 14Б, В); в качестве контроля измеряли вязкость исходного дохроматографического актина (рисунок 14Б, В - пунктирная линия). Характер распределения вязкостей фракций схож для обоих актинов (в порядке снижения): фракция III имеет самую высокую приведённую вязкость, фракция II имеет вязкость ниже, чем у фракции III, а фракция I имеет самую низкую вязкость, которая оказалась даже ниже вязкости дохроматографического актина (рисунок 14Б, В).

Однако, несмотря на схожий для актина мидии и актина кролика характер распределения приведённой вязкости фракций I, II и III относительно друг друга, между ними сохранялась значительная разница в характеристической вязкости (пересечение кривых с осью Y). Характеристическая вязкость препаратов актина кролика была в 2–5 раз выше, чем у препаратов актина мидии: для II фракции

(середина элюции) вязкость при 1 мг/мл равняется 10 мл/мг и 2 мл/мг для актина кролика и мидии, соответственно.

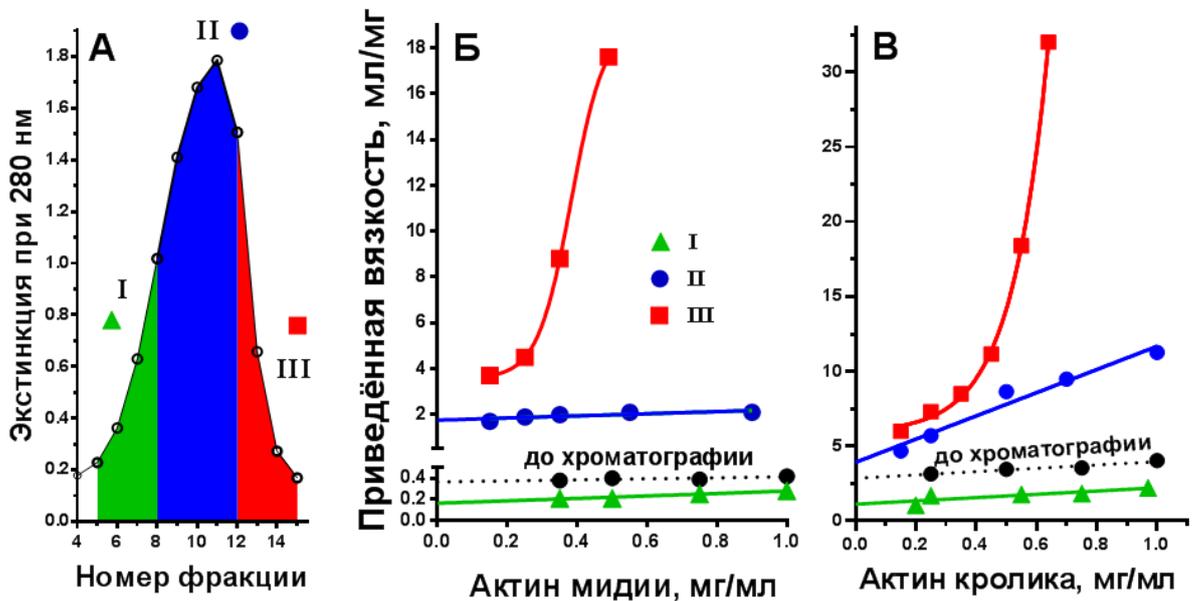


Рисунок 14 – Фракционирование актина мидии и актина кролика при помощи гель-фильтрационной хроматографии. Приведённая и характеристическая вязкость дохроматографического актина и разных фракций (I, II и III) пика хроматографии. (A) – типичная кривая профиля элюции актина; (Б) – измерение вязкости препаратов актина кролика из разных частей хроматографического пика; (В) – измерение вязкости препаратов актина мидии из разных частей хроматографического пика. В растворе (мМ): 50 KCl, 2 MgCl₂, 1.2 АТФ, 0.2 CaCl₂, 1 DTT, 3 NaN₃, 5 Трис–HCl (pH 7.5) при 23 °С.

Самая низкая вязкость была у фракций I (начало элюции). Вязкость полимера зависит от асимметрии молекулы и увеличивается при увеличении его длины, соответственно при короткой длине полимера вязкость будет низкой. Мы выдвинули предположение, что небольшая длина полимеров актина в I фракции связана с наличием минорных примесей белков концевго фактора, типа β -актинина или CapZ. Чтобы косвенно подтвердить предположение, что примеси относятся к кепирующим белкам, мы провели сравнение кинетики полимеризации для I, II и III фракций (рисунок 15).

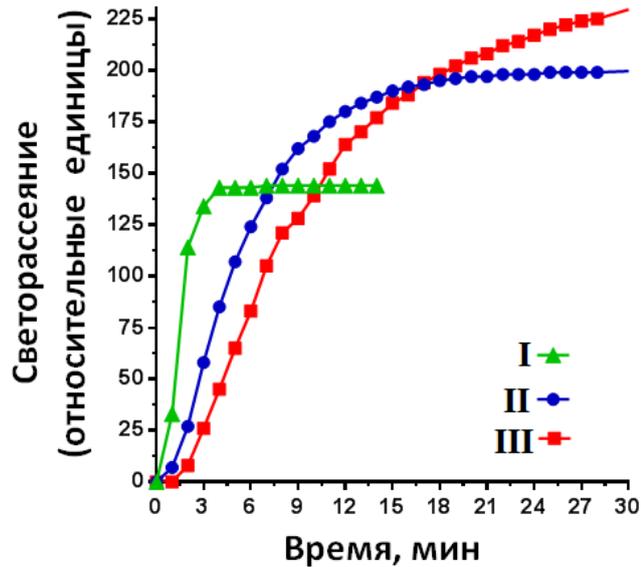


Рисунок 15 – Кинетика полимеризации актина *Crenomytilus grayanus* из разных фракций пика хроматографии (I – начало, II – середина и III – окончание). В растворе (мМ): 1.2 АТФ, 0.2 CaCl₂, 1 DTT, 3 NaN₃, 5 Трис–HCl (pH 7.5); концентрация G-актина 0.45 мг/мл. Полимеризацию запускали добавлением KCl до 25 мМ и MgCl₂ до 2 мМ при 25 °С.

Мы обнаружили, что фракции отличаются и по характеру их полимеризации: самая медленная скорость полимеризации была у III фракции, у неё же была самая высокая степень полимеризации – в рамках измерения мы не видим выхода на плато т.е. полимеризация продолжается и после окончания эксперимента. Кинетические характеристики фракций имели следующие значения: для I фракции $V_{max} = 192.3 \pm 27.5$, $K_{50} = 1.896 \pm 0.88$ мин; для II фракции $V_{max} = 294.4 \pm 17.66$ и $K_{50} = 8.712 \pm 1.28$ мин; для III фракции $V_{max} = 416.9 \pm 34.01$ и $K_{50} = 21.07 \pm 3.13$ мин (посчитано в программе "Prism 6.01" GrafPad Software Inc.).

Полимеры III фракции актина имели ярко выраженную тиксотропию (Cooper, Pollard, 1982): вязкость увеличивалась в состоянии покоя и уменьшалась при механическом воздействии. I фракция, обладающая наименьшей вязкостью, 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.

В целом, исходя из результатов, представленных в этой и предыдущей главах, гладкомышечный актин мидии и скелетномышечный актин кролика схожи по молекулярной массе и структуре нитей, кинетике полимеризации, и способности активировать Mg^{2+} -АТФазную активность скелетномышечного миозина кролика, но различны по вязкости их полимерных растворов, поскольку могут содержать примеси белков концевых факторов, от которых зависит вязкость образцов полимерной формы актина. На следующем этапе работы мы исследовали функциональные свойства этих актинов в гибридных и негибридных комплексах с тропомиозином и далее – в моделях сократительных систем.

3.4. Измерения вязкости полимерного актина мидии в присутствии тропомиозина в гибридных и негибридных комплексах

Дальнейшее тестирование свойств полученного по новой методике актина мидии проводили методом молекулярного моделирования. Мы формировали простую модель тонкой нити: "актин-тропомиозин" и измеряли её вязкость (рисунок 16). Из белков мидии и кролика было сформировано 4 комплекса: 2 гибридных (FAmyt-TMrab, FArab-TMmyt) и 2 негибридных (FAmyt-TMmyt, FArab-TMrab).

Для актина мидии (рисунок 16А) мы наблюдали значительное увеличение угла наклона прямой приведённой вязкости в присутствии обоих тропомиозинов, при этом они не оказывали значительного влияния на характеристическую вязкость актина. Влияние тропомиозина на вязкость актина в гибридном комплексе было выражено несколько больше, чем в негибридном. Однако для актина кролика вязкость в гибридном и негибридном комплексах значительно отличалась (рисунок 16Б). В негибридной модели приведённая вязкость актина увеличивалась. Но в гибридном комплексе (актин кролика - тропомиозин мидии) мы не наблюдали ожидаемого увеличения приведённой вязкости актина.

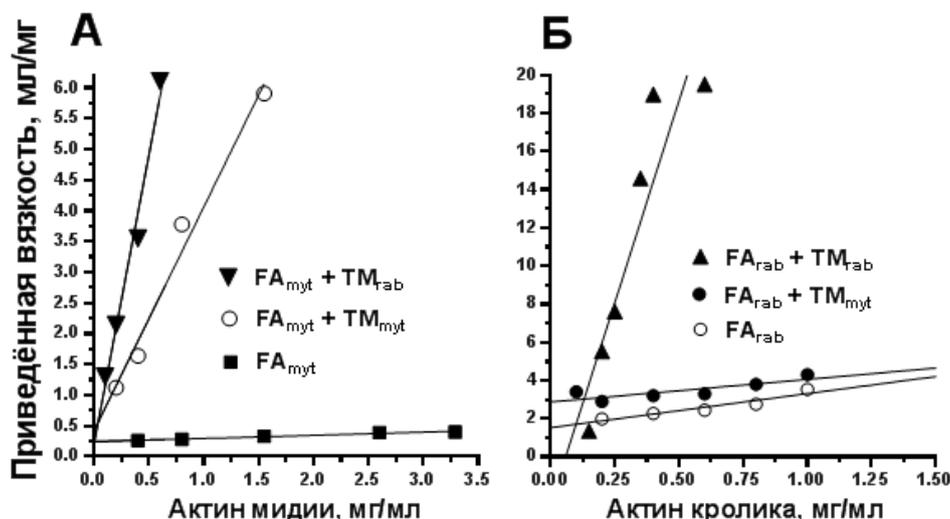


Рисунок 16 – Приведённая и характеристическая вязкость актина мидии (FA_{myt}) и актина кролика (FA_{rab}) и изменения вязкости этих актинов в присутствии тропомиозина мидии (TM_{myt}) и кролика (TM_{rab}). (А) – влияние тропомиозина кролика и мидии на вязкость актина мидии. (Б) – влияние тропомиозина кролика и мидии на вязкость актина кролика. В растворе (мМ): 50 КСl, 2 MgCl₂, 1.2 АТФ, 0.2 CaCl₂, 1 ДТТ, 3 NaN₃, 5 Трис–НСl (рН 7.5); 23 °С при измерении вязкости; соотношение А:ТМ = 4:1 мг/мг (что соответствует 7:1 моль/моль).

Мы предположили, что тропомиозин мидии не связался с актином кролика и поэтому не оказал влияния на его вязкость. Для проверки предположения мы провели высокоскоростное соосаждение гибридных и негибридных комплексов. Результаты контролировали при помощи ДСН-электрофореза (рисунок 17). В осадке вместе с F-актином наблюдались оба тропомиозина (рисунок 17, дорожки 8 и 9), что свидетельствует о взаимодействии белков, о том, что оба тропомиозина связались с актином.

Таким образом, было достоверно показано, что тропомиозины связываются с актином в гибридном и в негибридном комплексах. На данном этапе нами было показано, что получаемый по представленной методике актин из запираательных мышц моллюсков можно использовать для реконструкции тонкой нити.

Однако гибридная модель, состоящая из актина кролика и тропомиозина мидии, даёт искажённые представления о взаимодействии актина с тропомиозином. Вязкость комплекса не увеличилась, возможно, из-за

специфического или неполного взаимодействия белков в гибридном комплексе. Из этого следует, что для корректного изучения catch-состояния необходимо использовать только негибридные модели.

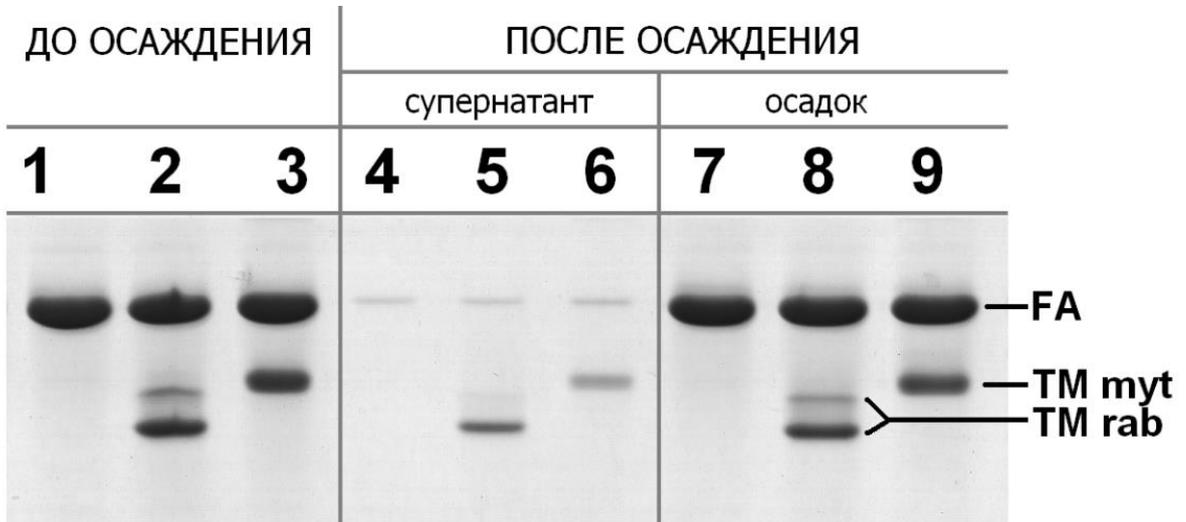


Рисунок 17 – Взаимодействие фибриллярного актина кролика (FA) и тропомиозина мидии и кролика (TMmyt и TMrab) в гибридном и в негибридном комплексах (ПААГ-14%).

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 мМ): 75 KCl, 2 MgCl₂, 0.2 EGTA, 2 NaN₃, 2 DTT, 20 Трис–HCl (pH 7.2); соотношение А:ТМ = 4:1 мг/мг (что соответствует 7:1 моль/моль).

3.5. Актин как основа тонкой нити в сократительных моделях и его взаимодействие с миородом в зависимости от фосфорилирования миорода

3.5.1. Очистка миорода гель-фильтрацией в присутствии мочевины

В данной работе мы предложили не только новый подход к получению актина, не требующий жесткой обработки этого белка, но и модифицировали метод получения и очистки другого белка запирательной мышцы – миорода (Matusovsky et al., 2015). Новый метод включал в себя высаливание экстракта поверхностных белков толстых нитей (п. 2.1.1) для получения миород-содержащей фракции (33–43 % насыщения СА), её растворение в ВИС и дальнейший диализ против DS/75. Диализат далее осаждали, полученный осадок

растворяли в мочевином буфере (6 М мочевины) и осветляли. Этот "мочевинный экстракт" содержал миород с примесями миозина и твитчина (рисунок 18Б, "сMR"), которые удаляли при помощи гель-фильтрационной хроматографии в мочевином буфере. Для дальнейшего тестирования использовали фракцию чистого миорода (рисунок 18, А, "CF3" – фракции 35–41 хроматографии), которую после хроматографии длительно диализовали против DS/75.

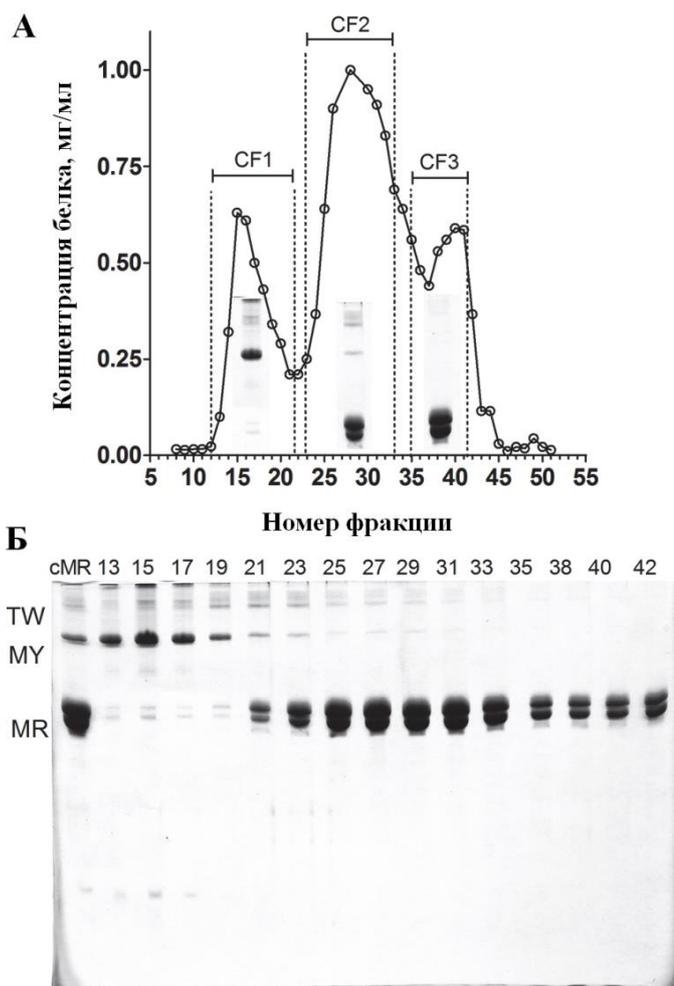


Рисунок 18 – Хроматографическая очистка миорода из запирательной мышцы *Crenomytilus grayanus*. (А) – хроматограмма гель-фильтрации миород-содержащей фракции в присутствии мочевины на носителе "Сефароза CL-6В". (Б) – электрофореграмма отдельных фракций (ПААГ-7.5%); сMR – неочищенный миород (MR), содержащий примеси твитчина (TW) и миозина (MY).

3.5.2. Влияние фосфорилирования миорода на Mg^{2+} -АТФазную активность миозина мидии в комплексе с актином кролика

Как было сказано выше (п. 1.2.2.2 и п. 1.4.4) миород является уникальным белком запирательной мышцы, вероятно вовлеченным в формирование запирательного тонуса. Попытка выяснить так ли это сопряжена с изучением влияния миорода на актомиозиновый комплекс, как на функциональную основу сократительного аппарата. При этом необходимо было учитывать, что важную роль в функционировании миорода может играть его фосфорилирование в положении Thr-141, регулирующее взаимодействие этого белка с актином (Matusovsky et al., 2011). Поэтому, изучая влияние миорода на актомиозин, мы использовали его в фосфорилированной и нефосфорилированной форме. Миород фосфорилировали (п. 2.2.3) при помощи гладкомышечной киназы лёгких цепей миозина (Sobieszek et al., 2006).

Для проверки предположения о влиянии состояния фосфорилирования миорода на актин-миозиновое взаимодействие мы воспользовались традиционным методом определения этого взаимодействия – регистрацией Mg^{2+} -АТФазной активности миозина. При реконструкции сократительного комплекса в белковых моделях применяли F-актин кролика, миозин мидии, миород мидии в нефосфорилированном (MR) и фосфорилированном (pMR) состояниях. При этом сборку миозин-миородовых сополимеров производили путём смешивания этих белков в высокой ионной силе (500 мМ KCl) с дальнейшим понижением ионной силы до физиологических значений (75–100 мМ KCl) – в таком случае сополимеры миозина с миородом получаются структурно схожими с нативными (Shelud'ko et al., 2001). В контрольные модели миород не добавляли. Было показано, что нефосфорилированный миород не изменял активность актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазы миозина, в то время как фосфорилированный миород увеличивал её в два раза: 30 и 70 нмоль/мг/мин для нефосфорилированного и фосфорилированного миорода, соответственно (рисунок 19А).

При исследовании зависимости актин-активированной Mg^{2+} -АТФазной активности от молярного соотношения миорода и миозина в сополимерах мы

обнаружили, что активность миозина в присутствии фосфорилированного миорода возрастала до соотношения миорода к миозину как 1:1 (рисунок 19Б). Дальнейшее увеличение содержания миорода приводило к снижению активности Mg^{2+} -АТФазы миозина. В контрольном эксперименте, где миозин был сополимеризован с нефосфорилированным миородом, Mg^{2+} -АТФазная активность оставалась неизменной до соотношения миорода к миозину как 2:1, а его увеличение приводило к снижению активности (рисунок 19Б).

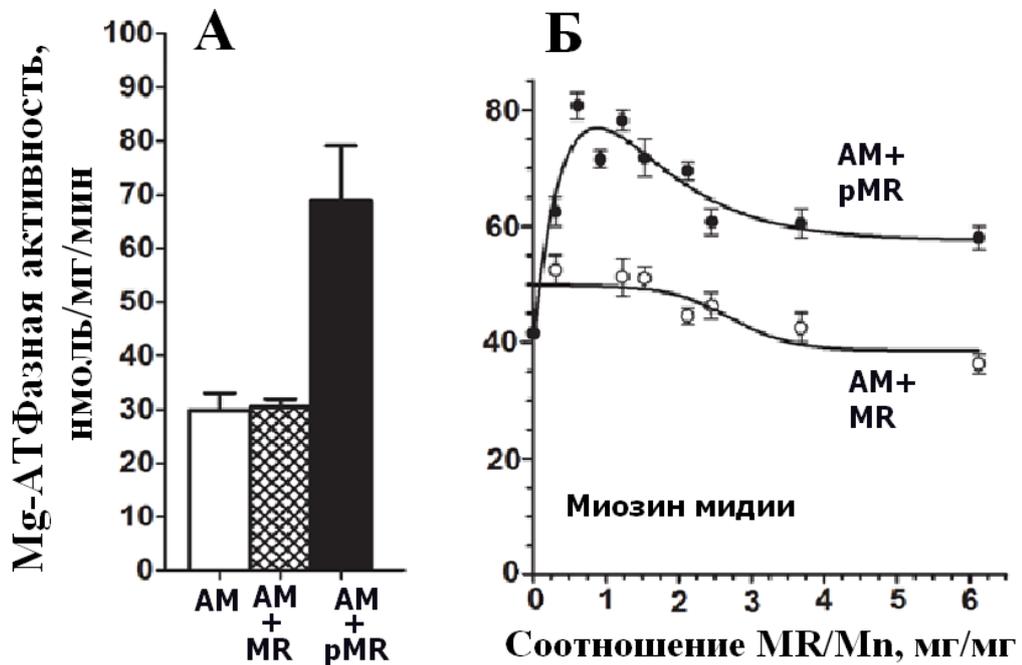


Рисунок 19 – Влияние фосфорилирования миорода на актин-активированную Mg^{2+} -АТФазную активность миозина. (А) – зависимость Mg^{2+} -АТФазной активности миозина от фосфорилирования миорода при реконструкции актомиозина из сополимеров миозина с миородом, соотношение Mn:MR:FA = 1:1:2. (Б) – изменения Mg^{2+} -АТФазной активности миозина мидии при сополимеризации его с фосфорилированным или нефосфорилированным миородом в различных молярных соотношениях. В растворе (мМ): 100 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 0.5 DTT, 0.1 $CaCl_2$, 10 имидазол-НСl (рН 7.2); миозин, 0.1 мг/мл; актин, 0.2 мг/мл; фосфорилированный и нефосфорилированный миород, 0.1 мг/мл (для А) и 0.025-0.5 мг/мл (для Б).

3.5.3. Вязкость негибридного актин-миородового комплекса

Для подтверждения гипотезы о вовлечении миорода в запирательный тонус посредством связывания толстой и тонкой нитей мы изучили возможность образования актин-миородового негибридного комплекса и влияние фосфорилирования миорода на изменение его вязкости. Для этого мы измеряли вязкости F-актина, миорода и фосфорилированного миорода (nFA , MR и pMR) по отдельности и в смеси.

Применяя метод "падающего шарика" (п. 2.3.1) мы обнаружили, что сумма вязкостей отдельно измеренных белков $\eta (nFA) + \eta (MR)$ (рисунок 20, двухсоставные столбики) намного больше, чем вязкость их смесей $\eta (nFA+MR)$ (рисунок 20, тёмные столбики), что свидетельствует об их взаимодействии. Отношение суммы вязкостей отдельных белков к вязкости смеси этих белков $\eta (nFA) + \eta (MR) / \eta (nFA+MR)$ составляло 2.5–3 раза. При этом вязкость миорода при фосфорилировании увеличивалась 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 физиологическом диапазоне ионных сил (30, 75 и 150 мМ KCl) полученные результаты были очень похожи, что говорит об устойчивом взаимодействии актина с миородом.

Из теории вискозиметрии известно, что снижение вязкости происходит при уменьшении асимметрии изучаемых полимеров, т.е. полимерная структура переходит к более шарообразной форме (симметричной) под воздействием каких-либо факторов. В случае наблюдаемого снижения вязкости после смешивания актина и миорода мы можем говорить о взаимовлиянии актина и миорода с сопутствующим снижением вязкости. Данное снижение асимметрии может объясняться латеральным слиянием полимеров актина и миорода: получающийся в итоге единый белковый полимер обладает большей толщиной при исходной длине, что делает его форму несколько более приближенной к форме шара, что, как сказано выше, снижает вязкость.

Показанное 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 наравне с миозином.

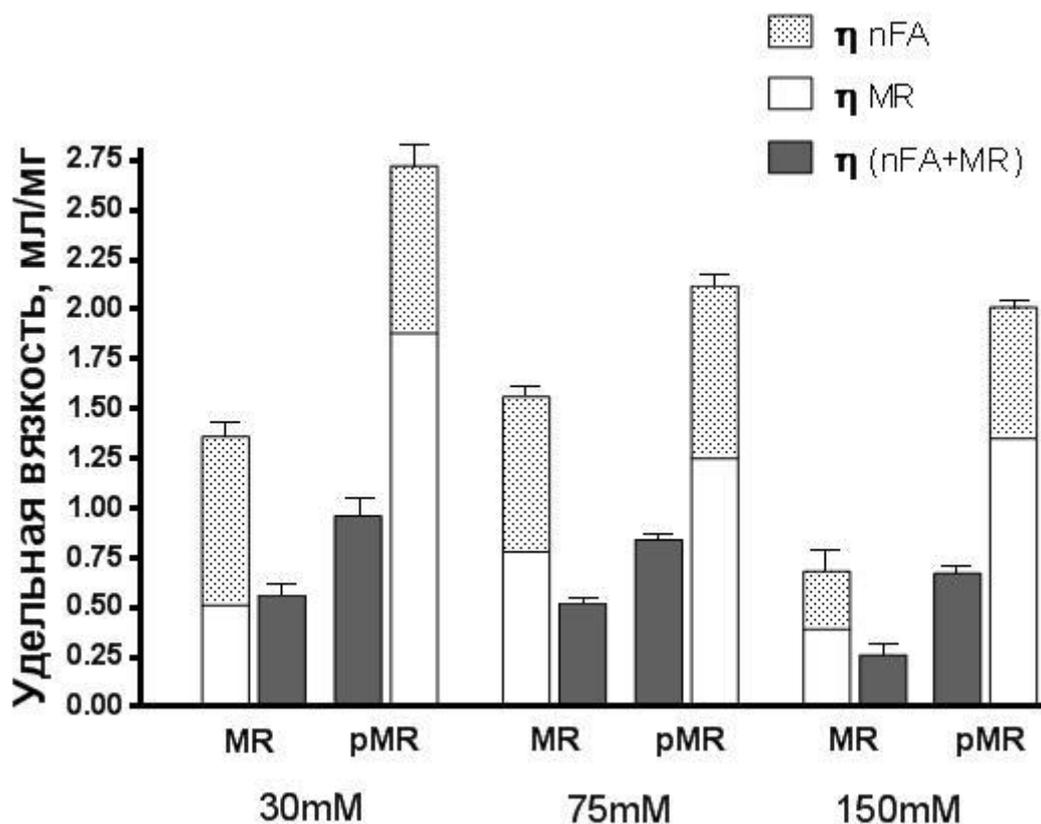


Рисунок 20 – Вязкость актина и миорода *Crenomytilus grayanus* по отдельности и в смеси. nFA – "природный" актин мидии, 0.2 мг/мл; pMR и MR – фосфорилированный и нефосфорилированный миород, 0.1 мг/мл; среда с ионной силой 30, 75 и 150 mM KCl, в присутствии 0.2 mM $CaCl_2$.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Гладкомышечный актин из запирающей мышцы моллюсков: особенности выделения, очистки и деполимеризации

Классическое получение актина из скелетных мышц начинается с экстрагирования миозина из гомогенизированной ткани раствором с высокой концентрацией соли, осаждения остаточных белков ацетоном и высушивания остатков до состояния порошка - т.н. ацетонового порошка (Straub, 1942a). Далее актиновые мономеры экстрагируются из ацетонового порошка низкоионным раствором, содержащим АТФ и полимеризуются путем добавления соли (Rees, Young, 1967). Нити осаждают ультрацентрифугированием и деполимеризуют путем диализа против слабосолевого буфера. Гель-фильтрацией удаляют актиновые олигомеры, кепирующие белки и другие минорные загрязнения, в итоге получаемых мономеров актина достаточно для количественных экспериментов по сборке актиновых полимеров (McLean-Fletcher, Pollard, 1980). Очистка от других примесей обычно требует предварительной стадии концентрирования актина с помощью ионообменной хроматографии (Gordon et al. 1977) или аффинной хроматографии с актин-связывающим белком, таким как ДНКза I (Schafer et al., 1998) или гельзолин (Ohki et al., 2009). Актин может храниться в течение нескольких дней при 4 °С в низкосолеваемом буфере с АТФ, сульфгидрильным восстановителем (DTT), 0.1 мМ CaCl₂ и азидом натрия для предотвращения роста бактерий. Замораживание не рекомендуется.

В некоторых случаях актин также может быть получен из ацетонового порошка мышц беспозвоночных, например, из поперечнополосатой мышцы гребешка *Patinopecten* (Khaitlina et al., 1999) или поперечнополосатой мышцы *Drosophila* (Razzaq et al., 1999). Для актина из гладкой мышцы двусторчатых моллюсков такой вариант получения не подходит, так как этот актин не экстрагируется из ацетонового порошка (не опубликованные данные). Подобная проблема существует и для гладкой мышцы позвоночных животных – актин плохо экстрагируется и из ацетонового порошка из этой мышцы. По-видимому, в гладкой мускулатуре существуют особенности, препятствующие экстракции

актина из ацетонового порошка. Это может быть связано с примесями белков в нативных тонких нитях (ТНН) гладких мышц, которые отсутствуют или содержатся в очень малых количествах в тонких нитях скелетных мышц.

Ранее исследователями был разработан способ получения ТНН из запирающих мышц *Crenomytilus grayanus*, изучены их состав и свойства (Shelud'ko et al., 2007; Dobrzhanskaya et al., 2010; Dobrzhanskaya et al., 2013; Vyatchin et al., 2015). Представленная в данной работе (п. 2.1.1) методика получения глобулярного актина из запирающей мышцы *Crenomytilus grayanus* в неденатурирующих условиях является оригинальной (Shelud'ko et al., 2016; Girich et al., 2017) и отличается от традиционного выделения актина из скелетных мышц позвоночных по методу Штрауба отсутствием этапа высушивания мышечного остатка ацетоном. В основе этого метода лежит экстракция ТНН из мышечного гомогената с последующей поэтапной очисткой актиновых филаментов от поверхностных белков. Но получаемый таким образом актин хоть и оставался в своей "природной" F-форме (nFA), но по неизвестным причинам не был способен к деполимеризации, и у исследователей не было возможности работать с его мономерной формой (G-актином).

В литературе уже был описан препарат актина, имеющий такое же название: "natural" F-актин (Hama et al., 1967; Hama, Maruyama, 1969). Этот актин был получен из скелетных мышц позвоночных и из приводящих мышц моллюска *Meretrix* (сем. *Veneridae*) путем обработки миофибрилл трипсином (Suzuki et al., 1971). Обработка трипсином разрушает Z-мембраны и приводит к высвобождению тонких нитей. Поскольку полимерный актин относительно устойчив к трипсину, среднее распределение длины актиновых полимеров в этих препаратах аналогично распределению тонких нитей в естественных условиях (Hama, Maruyama, 1969). В противоположность актину, получаемому из ацетонового мышечного остатка (Kawamura, Maruyama, 1972). Особенностью этого актина является очень медленная деполимеризация с невозможностью последующей полимеризации, что является существенным недостатком получаемого актина (Kasai, Hama, 1969). Таким образом, ранее описанный

"natural" F-актин отличается и от классического штраубовского актина и от полученного нами "природного" фибриллярного актина мидии (nFA).

Наш метод включает в себя несколько этапов: ригоризацию мышц с их последующей гомогенизацией и отмывкой, экстрагирование ТНН и фракционирование их на основу (nFA) и поверхностные белки, деполимеризацию nFA в растворе с нулевой ионной силой и итоговую очистку G-актина гель-фильтрационной хроматографией.

Первый этап – ригоризация – суточное выдерживание нарезанных мышц мидии в растворе с 50 %-м глицерином. Этот этап обусловлен тем, что гладкая мышца двустворчатых моллюсков, в отличие от скелетной мышцы позвоночных, нестандартно ведёт себя во время гомогенизации и отмывок. В случае скелетной мышцы, при отмывке мышечного гомогената происходит удаление из клеточных структур только фракции белков саркоплазмы с сохранением миофибрилл, тогда как отмывка гладкой мышцы двустворчатых моллюсков приводит к значительной потере тонких нитей (Otani et al., 1983; Dobrzhanskaya et al., 2013). Вероятнее всего эти различия связаны со структурными особенностями запирающей мышцы как гладкомышечной ткани.

Как известно, в гладких мышцах тонкие нити крепятся не к структурно упорядоченным, проходящим сквозь весь миосимпласт и фиксированным на мембране Z-полоскам, а к располагающимся в цитоплазме плотным телам (Z-телам). Значительная часть Z-тел не фиксированы на мембране, а находятся в цитоплазме, удерживаемые сетью тонких нитей. При разрушении мышечных клеток в ходе гомогенизации разрушается и структура целостности сети тонких нитей между Z-телами. Вследствие этого, единственной точкой фиксации тонких нитей оказываются толстые нити, к которым они крепятся благодаря актин-миозиновому взаимодействию. Это взаимодействие в присутствии АТФ и низкой концентрации Ca^{2+} должно было быть угнетено Ca^{2+} -чувствительными системами тонких и толстых нитей. Однако, при гомогенизации оно было активировано выходом Ca^{2+} из разрушенного саркоплазматического ретикула.

Тем не менее, толстые нити не смогут долго удерживать тонкие – это связано с тем, что выброс Ca^{2+} в среду содержащую избыток АТФ приводит к синхронному отделению миозиновых головок от поверхности актина. Не связанные, таким образом, ни с мембраной (посредством Z-тел), ни с толстыми нитями (посредством миозина), тонкие нити оказывались взвешены в растворе. Так как при низкоскоростном центрифугировании тонкие нити не осаждаются, то при отмывках они оставались в супернатанте вместе с саркоплазматическими белками, а не переходили в осадок вместе с толстыми нитями.

Основная цель ригоризации - разрушение глицерином клеточных мембран и, как следствие, выход в цитоплазму клеточных запасов Ca^{2+} . В результате активированного кальцием миозинового рециклирования со временем происходит истощение клеточных запасов АТФ и головки миозина жестко фиксируются на актине, в т.н. ригорном состоянии. Благодаря этому тонкие нити остаются "привязаны" к толстым нитям, что позволяет избежать значительных потерь ТНН при отмывках гомогената.

Для вывода тонких нитей из отмытого от саркоплазматических белков, но ригоризованного сократительного аппарата мы экстрагировали ТНН раствором с физиологической ионной силой (75 мМ КСl) в присутствии 15 мМ АТФ и 5 мМ пирогосфата натрия. Экстракт (рисунок 5, дорожка 1) содержал основные белки тонкой нити: nFA, тропомиозин (ТМ), тропониновый комплекс, кальпонины 40 и 34 кДа и небольшие количества примесных белков. Высокоскоростное центрифугирование экстракта приводило к осаждению комплекса nFA-ТМ (рисунок 5, дорожка 3). Дальнейшую диссоциацию комплекса nFA-ТМ и их разделение проводили в среде с высокой ионной силой раствора (600 мМ КСl) в присутствии тех же добавок. После повторного высокоскоростного центрифугирования nFA полностью осаждался (рисунок 5, дорожка 4), а ТМ оставался в надосадочной жидкости (рисунок 5, дорожка 5 или 6). Таким образом, мы получали электрофоретически чистый nFA.

Полученный таким образом nFA впервые за время работы с "природным" F-актином из запираательных мышц *Crenomytilus grayanus* оказался способен к

деполимеризации при переводе его в раствор с нулевой ионной силой и стандартным pH (G-буфер, п. 2.1.1) (Girich et al., 2017). Ранее nFA не могли деполмеризовать до мономерной формы в препаративных количествах (не опубликованные данные). Мы связываем это с примесями поверхностных белков или неизвестных белковых факторов, препятствующих деполмеризации. Как показано в работе (рисунки 8 и 9), в первую очередь это наличие даже незначительных количеств поверхностных белков, таких как тропомиозин. Возможно, во фракции тропомиозина присутствует примесь с незначительным содержанием или малым молекулярным весом, которая мешает деполмеризации.

Способность поверхностных белков тонкой нити препятствовать деполмеризации актина, вероятно, связана с тем, что тропомиозин, кальпонин и другие поверхностные белки взаимодействуют с актином на большей площади его поверхности. В результате актиновая нить, со всех сторон "зажатая" множеством белков, стабильно сохраняется в своём фибриллярном состоянии (Hill et al., 1992). Кроме того, актин- или тропомиозин-связывающие белки, такие как тропонин-Т или кальдесмон, могут связывать тропомиозин с актином, тем самым стабилизируя собранные тонкие нити (Hill et al., 1992; Pittenger et al., 1995). При этом снижение ионной силы раствора может усиливать связывание поверхностных белков с актиновой нитью – они не диссоциируют и актин не способен к деполмеризации. Таким образом, наша модификация экстрагирующего раствора (15 mM АТФ, 5 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 600 mM KCl), вероятно всего способствовала возрастанию степени диссоциации поверхностных белков и каких-либо неизвестных факторов с поверхности полимерного актина. В таком растворе они уже были не способны удерживаться на поверхности актина и после высокоскоростного центрифугирования оставались в супернатанте.

Важно, что после всех этапов экстрагирования и очистки деполмеризованный G-актин *Crenomytilus grayanus*, подобно штраубовскому актину кролика сохранял способность к полимеризации. Что мы связываем с одной стороны с мягким, в отличие от обработки ацетоном, способом получения nFA, который при деполмеризации не инактивируется. Однако в то же время

состав экстрагирующего раствора отличается от того, что применяли в работах раньше и степень чистоты фракции актина может быть связана с ним.

После удаления из фракции актина примесей поверхностных белков и его деполимеризации в G-буфере, полученный мономерный актин далее очищали при помощи гель-фильтрационной хроматографии (Shelud'ko, et al., 2016). Хроматографию так же применяют и для штраубовского актина из скелетной мышцы кролика (Pardee, Spudich, 1982a; Pardee, Spudich, 1982b) - при такой итоговой очистке на носителе "Сефадекс G-150" получают электрофоретически чистый актин, содержащий менее 10 % примесей. В нашей работе мы впервые проводили хроматографию "природного" актина из запирающей гладкой мышцы мидии, так как впервые была получена его глобулярная форма. Очистку актина мы проводили на носителе "Сефадекс G-100". Профиль элюции совпадал для обоих актинов (и мидии и кролика) и по форме был неравнобокий (рисунки 6 и 14А). Примеры таких кривых элюции для актина известны и уже были описаны в литературе ранее (Rees, Young, 1967; Strzelecka-Gołaszewska et al., 1980).

4.2. О свойствах гладкомышечного актина моллюсков и скелетномышечного актина позвоночных, их вязкости и примесях

Актин по его первичной структуре является очень консервативным белком (Elzinga et al., 1973; Vandekerkhove, Weber, 1978; Vandekerkhove, Weber, 1979; Hooper, Thuma, 2005; Perrin, Ervasti, 2010; Muller et al., 2013). Исходя из этого, предполагается, что свойства чистого актина будут оставаться неизменными независимо от источника и метода получения. Однако, несмотря на то, что мы получили актин из мидии *Crenomytilus grayanus* в глобулярной форме, у нас оставались сомнения в том, что он будет похож на штраубовский актин из скелетных мышц кролика.

Оказалось, что по основным тестируемым параметрам эти актины проявляли значительное сходство. Например, гладкомышечный актин *Crenomytilus grayanus*, полученный в условиях сохраняющих нативную полимерную форму, подобно скелетномышечному актину позвоночных,

полученному в G-форме из ацетонового порошка, был способен к полимеризации и деполимеризации в одинаковых условиях. Полимеризация является важным свойством не инактивированного актина т.к. связана с его функционированием в моделях *in vitro* и в живой клетке. Кинетика полимеризации – скорость формирования полимеров из мономеров – является одним из основных тестов для оценки качества очищенного актина. Мы показали, что оба тестируемых актина при одинаковых условиях полимеризуются с одинаковой скоростью и в одинаковой степени (рисунок 11). Пик хроматографического выхода и электрофоретическая подвижность были совершенно идентичны для обоих актинов и иллюстрировали высокую степень очистки белков (рисунок 3 и 4). По результатам электронной микроскопии отличий между полимерной формой сравниваемых белков так же не было выявлено (рисунок 10). Способность активировать миозиновую Mg^{2+} -АТФазу в синтетическом актомиозине является ключевой способностью актина в *in vitro* исследованиях сократительных систем; и в этом свойстве мы так же не обнаружили значимых отличий между изучаемыми актинами (рисунок 12).

Однако, несмотря на выявленные сходства между актином кролика и актином мидии, мы обнаружили, что они существенно отличаются по вязкости (рисунки 13 и 14Б, В). Вязкостью (внутренним трением) называют свойство текучих тел оказывать сопротивление действию внешних сил, вызывающих перемещение одной их части относительно другой. Вязкость зависит от симметрии молекул – отношение длины к диаметру: чем молекула асимметричнее (большая длина при меньшем диаметре), тем вязкость раствора больше. При взаимодействии белковых молекул изменяется степень симметричности, что вызывает изменение вязкости раствора (Шатенштейн и др., 1964; Тагер, 1978). В данной работе вязкость измеряли методом "падающего шарика" (Pollard, Cooper, 1982). При таком подходе измеряют время пробегания маленького стального шарика внутри капилляра, заполненного исследуемым белковым раствором. Шариковые вискозиметры позволяют проводить измерения вязкости при малых силах сдвига, что существенно для изучения биополимеров.

При бесконечном разбавлении раствора полимера его удельная вязкость фактически является характеристической вязкостью. Таким образом, увеличение приведённой вязкости ($\eta_{уд}/C$) с одновременным увеличением концентрации F-актина можно считать за результат взаимодействия нитей актина. Во всех случаях, когда вязкость препаратов является относительно низкой, это взаимодействие возрастает линейно. Однако линейная зависимость может нарушаться, поскольку повышение степени очистки актиновых препаратов сопровождается повышением вязкости и появлением признаков тиксотропии: удельная вязкость увеличивается быстрее, чем увеличивается концентрация актина (рисунок 14Б, В - фракция Ш).

Тиксотропия белковых полимеров (типа F-актина) обусловлена взаимным притяжением нитей полимера и проявляется следующим образом: если оставить стоять раствор F-актина в небольшой концентрации, то в течение некоторого времени (от 10 минут) он застуденеет. При этом образовавшийся гель легко разбивается осторожным встряхиванием, и раствор снова становится жидким. Значит, силы взаимного притяжения, которыми обусловлена тиксотропия, незначительны и связи легко рвутся. Тиксотропия сильно затрудняет измерение вязкости актина.

При получении скелетномышечный актин кролика очищают методом обратимой полимеризации: экстракция из ацетонового порошка G-актина \rightarrow его полимеризация \rightarrow осаждение F-актина \rightarrow его деполимеризация \rightarrow осветление G-актина и его итоговая полимеризация. Характеристическая вязкость полученного таким образом актина была в 6-8 раз выше вязкости "природного" актина мидии (η_{FA}) (рисунок 13). Это соотношение практически не изменилось после того, как η_{FA} был переполимеризован (рисунок 13, η_{FGFA}). Это может означать, что низкая вязкость актина мидии, по сравнению с актином кролика, не связана с особенностями полимеризации η_{FA} *in vivo* при жизни моллюска. При равной концентрации значение вязкости у актина мидии было минимум в два раза ниже, чем у аналогичного препарата актина кролика. Есть два возможных объяснения: либо эти актины различаются по вязкости сами по себе *per se*, либо они могут

отличаться в результате взаимодействия актина с неидентифицированным на данный момент кепирующим белком.

Одним из факторов, определяющих длину полимера, может являться концевой белок, взаимодействующий с «+» или «-» концом актиновой нити. При этом, чем больше этого белкового фактора содержится в препарате актина, тем короче будут полимеры. Вероятнее всего, низкая вязкость образцов полученного и очищенного нами мидийного актина является результатом присутствия разного количества неидентифицированного в рамках данной работы актин-кепирующего белка. Как мы полагаем это могут быть аналоги концевого фактора типа β -актинина, CapZ, тропомодулина или других кепирующих белков (Kasai, Nama, 1969).

В ходе данной работы на этапе хроматографической очистки мы разделили пик хроматографии актина на три части (I, II и III – начало, середина и окончание хроматографии). Это было сделано для проверки предположения о наличии белков концевого фактора во фракциях актина, а так же с целью отобрать актин из центральной части для получения препарата с наибольшей концентрацией целевого белка (рисунки 6 и 14 – II фракция). После полимеризации всех фракций хроматографически очищенного актина мы неожиданно обнаружили, что вязкость сильно отличается в I, II и III фракциях. Помимо измерения вязкости полимеризованных фракций мы так же протестировали кинетику их полимеризации и обнаружили, что и она значительно отличается (рисунок 15). Высокая скорость полимеризации фракции I (начало выхода хроматографического актина), относительно фракций II и III (середины и окончания хроматографии) может косвенно подтверждать то, что примесью является именно белок с кепирующей активностью.

Как известно, для того чтобы мог сформироваться новый актиновый филамент, необходимо, чтобы несколько мономеров актина образовали нуклеус ("зародыш"), состоящий не менее чем из трех-четырех связанных между собой мономеров актина. Проблема в том, что в коротких олигомерах актина вероятность присоединения и диссоциации мономеров актина сопоставимы и

вследствие этого, не успев сформироваться, "зародыш" диссоциирует до составляющих его мономеров. Один из путей стабилизации нуклеуса состоит в том, чтобы препятствовать диссоциации мономеров с острого ("—") конца полимера. С чем успешно справляются концевые белки. Если они содержатся в растворе мономерного актина, то образуется множество нуклеусов полимеризации, а сформированные нити имеют длину меньше, чем у актина очищенного от этих концевых белков.

Ранее актин-кепирующая активность уже наблюдалась в остатке ацетонового порошка после экстракции актина. Например, Маруяма с соавторами при помощи хроматографии на носителе "DEAE-sephadex" очищали β -актинин – минорный регуляторный белок из скелетных мышц кролика и курицы (Maruyama et al., 1977). β -актинин состоял из двух субъединиц (37 кДа и 34 кДа), чьи аминокислотные составы похожи, но не идентичны. Он ускорял полимеризацию G-актина, замедлял деполимеризацию F-актина и ингибировал рост и реассоциацию F-актина. Флуоресцентно-меченый анти- β -актинин был обнаружен на "—" конце F-актина. Таким образом этот β -актинин проявлял концевую кепирующую активность.

Изенберг с соавторами очищали из *Acanthamoeba* белковую фракцию, которая состояла из двух полипептидов (28 кДа и 31 кДа) с минорными примесями димера (60 кДа) (Isenberg et al., 1980). Этот белок называли "capping protein" в связи с его способностью ингибировать полимеризацию F-актина. Так же он ингибировал взаимодействие полимерного актина, способствовал образованию "зародышей" полимеризации из нескольких мономеров актина и препятствовал восстановлению длинных нитей F-актина после их обработки ультразвуком.

Падре и Спадич (Pardee, Spudich, 1982a) в своих исследованиях так же говорили о том, что после полимеризации очищенного на колонке актина его вязкость при малых силах сдвига значительно превышала вязкость F-актина не очищенного на колонке. Более того, они отмечали, что некоторые фракции

хроматографического актина значительно снижали вязкость F-актина при их добавлении к G-актину перед полимеризацией.

В исследованиях Купера и Септ (Cooper, Sept, 2008) результаты хроматографии так же показывали наличие в хроматографических пиках следовых количеств активного фактора, молекулярный вес которого выше, чем вес актина (60 кДа) и представшего собой гетеродимер. Он ингибировал добавление и диссоциацию G-актина к сформированным актиновым полимерам. Авторы идентифицировали его как β -актинин, который ранее уже был описан Маруямой (Maruyama, Obinata, 1965; Maruyama, 1966; Maruyama, 2002).

"Capping protein", который Каселла с соавторами очистили из скелетных мышц цыплёнка, был назван "CapZ" из-за его присутствия на Z-диске саркомера (Casella et al., 1987). Быстрорастущие ("+") концы тонких нитей расположены на Z-диске, и одна молекула CapZ, по-видимому, кепирует каждый колючий конец (Schafer et al., 1993). Такое кепирование "+" конца может заключаться в том, чтобы закреплять тонкую нить на Z-диске или предотвращать рост тонкой нити в соседний саркомер. Соответственно CapZ и его актин-связывающая активность важны для сборки саркомера.

По результатам полученных в работе данных, мы предполагаем, что неидентифицированный нами "capping protein" имеет молекулярный вес несколько больше, чем у актина (40–60 кДа) и соответственно из колонки выходит в начале хроматографии. Возможно, что происходит перекрытие пиков выхода этого белка и актина и мы смогли получить фракцию (в начале выхода G-актина), обогащённую этим белком. Пример такой примеси можно видеть на рисунке 6 (nGA) в препарате глобулярного актина мидии до хроматографии. Схожий эффект по влиянию неидентифицированного фактора на вязкость актина кролика и мидии в изученных фракциях может означать, что оба препарата актинов содержат схожий по своим функциональным свойствам концевой фактор. Вполне вероятно, что содержание этого предполагаемого "capping protein" в мышцах или во фракциях актина мидии может быть выше и разница может сохраняться даже после очистки.

В итоге, исходя из полученных результатов, можно предположить, что оба актина – гладкомышечный nFA мидии и скелетномышечный актин кролика очень похожи по физико-химическим свойствам и актин мидии в большинстве экспериментов может быть заменён на актин кролика. Однако стоит учитывать, что наличие минорного неидентифицированного компонента значительно влияет на вязкость полимерного актина мидии. И при недостаточной очистке эти примеси могут снижать сократительную активность актомиозиновых моделей за счёт укорочения актиновых нитей и соответствующего уменьшения количества контактов миозина с актином. Далее мы тестировали актин мидии и актин кролика, сравнивая их вязкости в комплексах в гибридных и негибридных комплексах с тропомиозином.

4.3. Тропомиозин мидии проявляет необычные свойства в гибридных комплексах с актином кролика

Тропомиозин количественно является вторым белком в составе тонкой нити, а его взаимодействие с актином лежит в основе кальциевой регуляции тонких нитей. В ходе работы мы располагали двумя тропомиозинами и двумя актинами, что позволило нам реконструировать четыре комплекса. Два *негибридных*: актин кролика + тропомиозин кролика и актин мидии + тропомиозин мидии; и два *гибридных*: актин мидии + тропомиозин кролика и актин кролика + тропомиозин мидии. На рисунке 16 представлены вязкости этих комплексов и контрольные вязкости чистых актинов. В трех случаях образование комплекса FA+TM приводило к резкому увеличению приведённой вязкости с сохранением значения характеристической вязкости. Исключением являлся лишь гибридный комплекс FA кролика + TM мидии, при образовании которого не происходило увеличения вязкости.

Как известно, тропомиозин делает нить актина менее гибкой, создавая своеобразный "стержень", который "выпрямляет" актиновую нить, в сравнении с состоянием скрученного "клубка", в котором находятся полимеры чистого актина. Это влияние тропомиозина отражается в изменении реологических свойств

актина: жесткость нитей актина с тропомиозином и без него составляет 65,3 и 43,7 pN/nm, соответственно (Kojima et al., 1994). Это возможно благодаря тропомиозин-индуцированному ограничению подвижности глобул актиновых мономеров, которое наиболее выгодно для связывания актинового полимера с остальными молекулами ТМ (Tobacman, 2008).

Не получив увеличения вязкости при смешивании актина кролика с тропомиозином мидии, мы предположили, что тропомиозин не связался с актином и поэтому не оказал влияния на вязкость F-актина. Либо, если взаимодействие и было, то настолько слабое, что легко нарушалось при измерениях вязкости за счет воздействия шарика проходящего через раствор. Однако высокоскоростное соосаждение актина с тропомиозином показало, что тропомиозины связываются с актином, как в гибридном, так и в негибридном комплексе (рисунок 17).

Низкую вязкость гибридного комплекса с участием ТМ мидии так же можно объяснить отличием изоформ тропомиозинов мидии и кролика. Известно, что мышечные и неммышечные изоформы тропомиозина связываются с актином с большой точностью и регулярностью (Lorenz et al., 1995; Lehman et al., 2000; Skoumpla et al., 2007; Maytum et al., 2008). Их связывание друг с другом является свойством, обусловленным созависимой архитектурой полимеров тропомиозина и актина. Однако, из-за разнообразия изоформ ТМ, связанных с незначительными изменениями поверхностного заряда, общей формы или гибкости coiled-coil структуры, разные тропомиозины демонстрируют разное сродство к актину (Pittenger et al., 1995; Gunning et al., 2005; Gunning et al., 2008). Это и есть вероятная причина наблюдаемых отличий вязкости гибридного комплекса.

Можно предположить, что при взаимодействии актина с тропомиозином могут образовываться два типа связей: одни поддерживают структуру комплекса тропомиозина с тропонинами, а в определённых условиях могут образовываться связи, которые влияют на структуру полимерного актина (придавать "жесткость" комплексу). И вероятнее всего, такие "придающие жесткость" комплексы при взаимодействии актина кролика и тропомиозина мидии не образуются. И это,

вполне возможно, может быть отражением пока неизученных особенностей устройства и функционирования тропомиозина из запирающих мышц мидии.

Ранее в экспериментах нами уже было обнаружено, что гладкомышечный тропомиозин мидии в сочетании с кроличьим актином придавал аномальные свойства актомиозиновым моделям (Shelud'ko et al., 2015). При их сочетании с миозином скелетных мышц кролика происходило резкое ингибирование Mg^{2+} -АТФазной активности – до 90%, а в случае тропомиозина кролика такого ингибирующего действия не наблюдалось (рисунок 21). Миозин кролика в комплексе с тропомиозином мидии приводили к ингибированию Mg^{2+} -АТФазы не зависимо от источника актина (рисунок 21Б).

Известно, что тропомиозин комплементарно вписывается в бороздку между актином и миозином, как например это было показано методом компьютерного моделирования Берманом с соавторами (Behrmann et al., 2012). Комплементарность формы, называемая гештальт-связыванием, была описана Холмсом и Леманом как необходимая предпосылка для специфического взаимодействия F-актин-тропомиозин (Holmes, Lehman, 2008). Помимо этого, комплекс стабилизируется электростатическими взаимодействиями между миозином и тропомиозином (Vibert et al., 1997; Behrmann et al., 2012). Взаимодействие актина, миозина и тропомиозина во многом определяется еще Ca^{2+} -регуляторной функцией мышечного тропомиозина. В зависимости от концентрации кальция, ТМ способен перемещаться по поверхности актина, открывая и закрывая расположенные на нем сайты связывания миозина. Сбой в функционировании этой системы из-за немного отличающегося местоположения сайтов связывания разных миозинов на актине, как мы считаем, и мог привести к ситуации, когда в гибридном комплексе тропомиозин блокирует места связывания миозина. Тогда можно предположить, что в наших гибридных моделях тропомиозин мидии блокировал сайты связывания миозина кролика на актине.

В случае тропомиозина кролика в комплексе с тем же миозином кролика ингибирования Mg^{2+} -АТФазы не наблюдалось (рисунок 21А). Создаётся

впечатление, что причина такого поведения, действительно в отличающихся сайтах связывания миозина мидии и миозина кролика на актине.

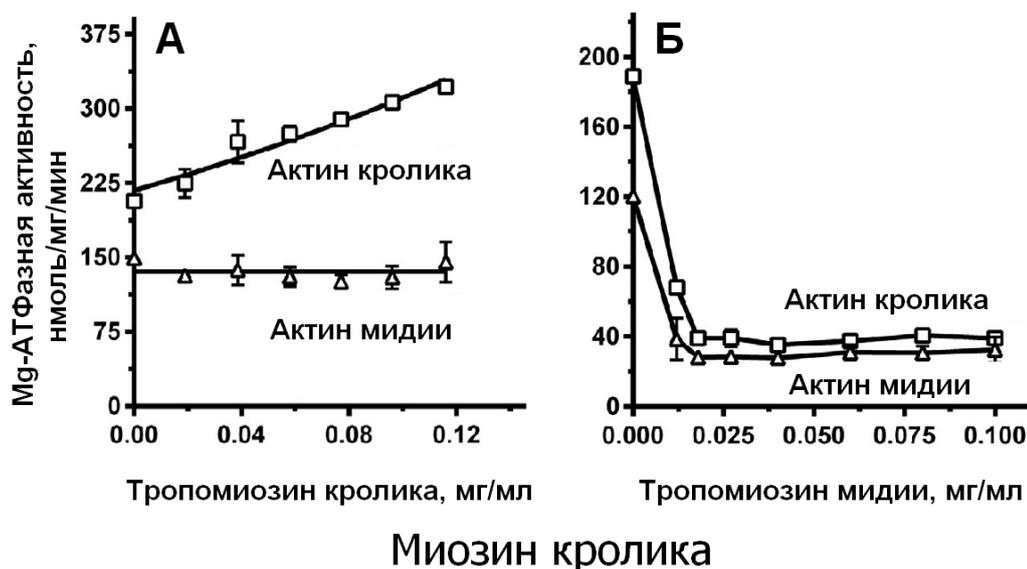


Рисунок 21 – Mg^{2+} -АТФазная активность актомиозина, реконструированного из актина, миозина и тропомиозина мидии и кролика в разных комбинациях (по: Sheludko et al., 2015). В растворе (мМ): 75 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 NaN_3 , 20 имидазол–HCl (pH 7.0), 0.1 $CaCl_2$; актин, 0.1 мг/мл; миозин, 0.1 мг/мл; тропомиозин, 0 – 0.12 мг/мл.

При понижении ионной силы тропомиозин мидии переставал ингибировать Mg^{2+} -АТФазу скелетномышечного актомиозина (Shelud'ko et al., 2015), что вероятнее всего связано со смещением тропомиозина по поверхности актина, при котором "открывается" сайт связывания миозина с актином. Однако остаётся неясным, являются ли такие свойства тропомиозина в гибридном комплексе функциональными, так же как и в негибридном комплексе, или просто ТМ располагается на нити актина таким образом, что препятствует нормальному функционированию сократительной системы.

При этом, наиболее полно исследованный ТМ поперечнополосатых мышц позвоночных не обладает выраженным ингибирующим эффектом. Он может оказывать небольшое (как активирующее, так и ингибирующее) влияние на Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина (Sobieszek, Small, 1981; Heeley et al., 1989). Аналогично и ТМ гладких мышц позвоночных оказывает как активирующий, так

и ингибирующий эффект (Sobieszek, Small, 1981; Heeley et al., 1989). Было показано, что для белков позвоночных животных при добавлении гладкомышечного тропомиозина к скелетному актомиозину Mg^{2+} -АТФаза увеличивается, в то время как в комплексе, где все белки скелетномышечные, изменения активности Mg^{2+} -АТФазы не наблюдалось независимо от наличия тропомиозина (Sobieszek, Small, 1981).

На примере гибридного комплекса F-актин + ТМ в этой работе и на ранее полученных актомиозиновых гибридных моделях в присутствии ТМ мы убедились, что для исследования catch-механизма необходимо использовать негибридные комплексы, а гибридные комплексы могут давать сильные искажения в результатах некоторых типов экспериментов.

4.4. Взаимодействие F-актина и миорода в *in vitro* моделях

Получив нативный актин из запирающей мышцы мидии и протестировав его свойства, мы пришли к тому, что он не отличается от актина позвоночных. Однако мы получили интересные результаты, касающиеся его вязкости как чистого белка, так и в комплексе с тропомиозином - белком тонкой нити. Так же нам было важно протестировать вязкость негибридного комплекса актина с миородом - белком толстой нити. Такой интерес объясняется тем, что миород и его взаимодействие с F-актином может быть ключевым моментом в объяснении catch-состояния. Известно, что миород может быть фосфорилирован киназой лёгких цепей миозина на N-конце в положении Thr-141 (Sobieszek et al., 2006) и в меньшей степени твитчином (Matusovsky et al., 2010), который содержит КЛЦМ-домен (Funabara et al., 2003). В нашей работе фосфорилирование миорода осуществляли киназой лёгких цепей миозина (п. 2.5).

В рамках данной работы мы тестировали взаимодействие полноразмерного миорода с "природным" F-актином из мышц *Crenomytilus grayanus*, измеряя вязкость при малых силах сдвига, методом "падающего шарика" – он оказался наиболее подходящим для регистрации взаимодействия полимерных форм этих белков. При измерении вязкости чистых белков и их смеси мы суммировали

вязкости чистых белков и сравнивали сумму вязкостей $\eta(A)+\eta(MR)$ с вязкостью смеси $\eta(A+MR)$. На рисунке 20 попарно приведены результаты измерения вязкости полимеров актина и миорода по отдельности и в смеси. Измерения проводили при разной ионной силе раствора (30, 75 и 150 мМ КСl) и во всех трёх случаях значение $\eta(A+MR)$ было меньше $\eta(A)+\eta(MR)$ примерно в 2.5–3 раза. При этом наблюдалось заметное увеличение вязкости чистого полноразмерного миорода после его фосфорилирования (рисунок 20, белые столбики). Увеличение вязкости может говорить о конформационных изменениях в N-концевом домене фосфорилированного белка с возможными изменениями его свойств. Такие изменения могут приводить к изменению степени его взаимодействия с F-актином и поэтому мы наблюдаем, что $\eta(A+MR)$ меньше $\eta(A)+\eta(MR)$. Как говорилось выше (п. 3.5.3), наблюдаемое при смешивании полимерных белков снижение вязкости является следствием их взаимодействия – белковый комплекс двух полимеров имеет вязкость меньше, чем вязкость измеренных по отдельности чистых белков.

Ранее взаимодействие актина кролика с мидийным миородом уже было показано методом соосаждения при низкоскоростном центрифугировании, в условиях, когда F-актин сам по себе не осаждаётся. В присутствии миорода в молярном соотношении к актину = 1:1 половина актина из смеси осаждалась, другая часть актина оставалась в надосадочной жидкости (Matusovsky et al., 2011). Кроме того была обнаружена зависимость от фосфорилирования способность N-концевого пептида миорода связывать актиновые нити: фосфорилирование приводило к снижению их взаимодействия – при низкоскоростном центрифугировании F-актин не осаждался (Matusovsky et al., 2011). В нашей работе были получены подобные результаты: нефосфорилированный миород взаимодействовал с актином лучше, чем фосфорилированный.

Так же влияние фосфорилирования миорода мы тестировали на сократительных моделях, в которых синтетические толстые нити получали путём сополимеризации миорода с миозином. В таких моделях чистый нефосфорилированный миород не оказывал влияния на актин-активированную

Mg^{2+} -АТФазу миозина, в то время как фосфорилированный миород увеличивал её почти в два раза (рисунок 19А). Фосфорилированный миород увеличивал активность актин-активированной Mg^{2+} -АТФазы как миозина мидии, так и миозина кролика. Ранее уже было показано, что чистый нефосфорилированный миород не активирует Mg^{2+} -АТФазу миозина (Shelud'ko et al., 2001). Свойства миозин-миородовых сополимеров определяются не только идентичными С-концевыми доменами миозина и миорода, но и N-концевым доменом миорода и, более того, состоянием его фосфорилирования. Так, мы уже сообщали ранее, что фосфорилирование предположительно именно уникального N-концевого домена миорода увеличивает актин-активированную Mg^{2+} -АТФазную активность миозина в природном комплексе толстых нитей белков моллюсков, состоящего из твитчина, миозина и миорода (Matusovsky et al., 2010). Можно предположить, что увеличение активности миозина требует дополнительного взаимодействия фосфорилированного N-концевого домена миорода с головками или S2 фрагментами миозина. Что вполне согласуется с более высоким сродством к миозину синтетического фосфорилированного N-концевого пептида миорода по сравнению с нефосфорилированным пептидом (Matusovsky et al., 2011).

В данной работе Mg^{2+} -АТФазная активность миозина при увеличении концентрации фосфорилированного миорода быстро повышалась и достигала максимума при их молярном соотношении 1:1 (рисунок 19Б). Мы предполагаем, что максимальная активность определяется максимальным количеством дополнительных контактов между миородом и миозином, который устанавливается при их эквимольном соотношении. Иначе это может быть связано с увеличением контактов миорода с актином, однако не совсем ясно, почему такие контакты влияют на Mg^{2+} -АТФазу миозина. Дальнейшее ингибирование актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазы миозина (рисунок 19Б) при увеличении содержания миорода (2:1 и выше) возможно происходило из-за того, что соседние молекулы миозина более упорядочены при высоком содержании миорода в сополимерах. В этом случае, связывание и циклирование одной головы миозина по актину может оказывать действие на соседние миозин-актиновые

поперечные мостики, препятствуя их Mg^{2+} -АТФазной активности. Подобный ингибирующий эффект при увеличении содержания миозинового стержня в сополимерах уже ранее наблюдали (Stepkowski et al., 1994). Если же ингибирование Mg^{2+} -АТФазы связано с образованием контактов ("мостиков") между миородом и актином, то это можно объяснить тем, что при увеличении количества миорода циклирование миозиновых головок снижается за счёт фиксации толстых и тонких нитей друг относительно друга.

Функция миорода вряд ли объяснима исключительно на основе свойств миород-миозинового комплекса. В работе было показано взаимодействие F-актина с миородом в зависимости от фосфорилирования миорода. Это может свидетельствовать о его вовлечённости во взаимодействие между тонкими и толстыми нитями параллельно с миозином, которое регулируется фосфорилированием N-концевого домена миорода. Как отмечено выше, отвечать за это фосфорилирование может киназный домен белка твитчина. Твитчин, по видимому, является киназой чувствительной к силе, которая, как полагают, активируется растяжением, что приводит к его автофосфорилированию (Butler, Siegman, 2011). Растяжение мышц (Gordon, Ridgway, 1976) может вызвать цепь событий, ответственных за фосфорилирование N-конца миорода и усилить Mg^{2+} -АТФазную активность миозина во время сокращения. Таким образом, миород является не просто структурным компонентом толстых нитей. Он может быть активным игроком при реализации запирающего тонуса и быть искомым "мостиком", сшивающим толстые и тонкие нити во время развития catch состояния, наряду с твитчином и миозином.

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 концевых факторов.
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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев Н.Б. Молекулярные механизмы мышечного сокращения // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6, № 8. С. 24 – 32.
2. Гусев Н.Б. Движение немышечных клеток и реорганизация актиновых микрофиламентов // Соросовский образовательный журнал. 2001. №7. С. 9 – 16.
3. Добржанская А.В., Матусовская Г.Г., Матусовский О.С., Шелудько Н.С. Тонкие нити запирающих мышц двустворчатых моллюсков могут содержать кальпонин-подобный белок // Биофизика. 2010. Т. 55, № 5. С. 785 – 789.
4. Матусовская Г.Г., Пермякова Т.В., Матусовский О.С., Шелудько Н.С. N-этилмалеимид ингибирует полимеризацию миорода – сократительного белка толстых нитей гладких мышц моллюсков // Биофизика. 2004. Т. 49, № 6. С. 1003 – 1007.
5. Матусовский О.С., Пермякова Т.В., Матусовская Г.Г., Дроздов А.Л., Шелудько Н.С.. Полимеризация миорода – поверхностного белка толстых нитей гладких мышц моллюсков // Биофизика. 2005. Т. 50, № 1. С. 69 – 74.
6. Невзглядова О., Артемов А., Зенин В., Верхуша В., Шавловский М., Поварова О., Степаненко О. В., Кузнецова И., Туроверов К. Экспрессия рекомбинантного актина 5с из дрозофилы в метилотрофных дрожжах *Pichia Pastoris* // Цитология. 2007. Т. 49, № 4. С. 300 – 310.
7. Невзоров И.А., Левицкий Д.И. Тропомиозин: двойная спираль из мира белков // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. С. 283 – 334.
8. Пермякова Т.В. Зависимость свойств синтетического актомиозина от условий его реконструкции // Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток, 1997.
9. Тагер А.А. Физико-химия полимеров // М.: "Химия". 1978.
10. Хайтлина С.Ю. Полимеризация актина и молекулярные механизмы ее регуляции. В кн. "Механизмы контроля мышечной деятельности" под ред. Пинаева Г.П. и Ушакова В.Б. // Л.: "Наука". 1985. С. 171 – 190.

11. Шатенштейн А.И., Вырский Ю.П., Правикова Н.А., Жданова К.И., Алиханов П.П., Изюмников А.Л. Практическое руководство по определению молекулярного веса и молекулярно-весового распределения полимеров // М.: "Химия", 1964.
12. Шелудько Н.С. Белковый состав миофибрилл кролика, определённый методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия // Цитология. 1975. Т. 10. С. 1148 – 1152.
13. Шелудько Н.С., Пинаев Г.П. Активный компонент препаратов β -актина // ДАН СССР. 1975. Т. 224, № 3. С. 725 – 727.
14. Энгельгардт В.А., Любимова М.Н. Аденозинтрифосфатаза и миозин мышцы // Биохимия. 1939. Т. 4, № 6. С. 716 – 736
15. Achazi R.K., Dölling B., Naakshorst R. 5-Ht-induced relaxation and cyclic AMP in a molluscan smooth muscle // Pflugers. Arch., German. 1974. V. 349, № 1. P. 19 – 27.
16. Aguilar H.N., Zielnik B., Tracey C.N., Mitchell B.F. Quantification of rapid myosin regulatory light chain phosphorylation using high-throughput in-cell western assays: comparison to western immunoblots // PLoS One. 2010. V. 5, № 4. Article No. e9965.
17. Andersen Q., Torgersen J.S., Pagander H.H., Magnesen T., Johnston I.A. Gene expression analyses of essential catch factors in the smooth and striated adductor muscles of larval, juvenile and adult great scallop (*Pecten maximus*) // J. Muscle Res. Cell. Motil. 2009. V. 30, № 5-6. P. 233 – 242.
18. Andruchov O., Andruchova O., Galler S. The catch state of mollusc catch muscle is established during activation: experiments on skinned fibre preparations of the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* L. using the myosin inhibitors orthovanadate and blebbistatin // J. Exp. Biol. 2006. V. 209, pt. 21. P. 4319 – 4328.
19. Asakawa T., Yazawa Y., Azuma N. Light chains of abalone myosin. UV absorption difference spectrum and resensitization of desensitized scallop myosin // J. Biochem. 1981. V. 89, № 6. P. 1805 – 1814.

20. Avrova S.V., Shelud'ko N.S., Borovikov Y.S., Galler S. Twitchin of mollusc smooth muscles can induce “catch”-like properties in human skeletal muscle: Support for the assumption that the “catch” state involves twitchin linkages between myofilaments // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2009. V. 179, № 1. P. 945 – 950.
21. Ayme-Southgate A., Vigoreaux J., Benian G., Pardue M.L. *Drosophila* has a twitchin/titin-related gene that appears to encode projectin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88, № 18. P. 7973 – 7977.
22. Bagshaw C.R., Kendrick-Jones J. Characterization of homologous divalent metal ion binding sites of vertebrate and molluscan myosins using electron paramagnetic resonance spectroscopy // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 130, № 3. P. 317 – 336.
23. Baguet F., Gillis J.M. Energy cost of tonic contraction in a lamellibranch catch muscle // *J. Physiol.* 1968. V. 198, № 1. P. 127 – 143.
24. Bailey K. Tropomyosin: A new asymmetric protein component of muscle // *Nature.* 1946. V. 157. P. 368 – 369.
25. Bailey K. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril // *Biochem. J.* 1948. V. 43. P. 271 – 279.
26. Barden J.A., Curmi P.M., dos Remedios C.G. Crystalline actin tubes. V. The effect of Th^{4+} on actin and the role of ionic charge in tube formation // *J. Biochem.* 1982. V. 92, № 4. P. 1319 – 1323.
27. Behrmann E., Müller M., Penczek P.A., Mannherz H.G., Manstein D.J., Raunser S. Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex // *Cell.* 2012. V. 150, № 2. P. 327 – 338.
28. Béjar P., Villamarín J.A. Catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from a catch muscle of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: purification, characterization, and phosphorylation of muscle proteins // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. V. 450, № 2. P. 133 – 140.
29. Bennett P.M., Elliott A. The structure of the paramyosin core in molluscan thick filaments // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 1981. V. 2, № 1. P. 65 – 81.

30. Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. Cytoskeleton // Plenum. Press., NY and London. 1988.
31. Borovikov Y.S., Shelud'ko N.S., Avrova S.V. Molluscan twitchin can control actin-myosin interaction during ATPase cycle // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 495, № 2. P. 122 – 128.
32. Brecht K., Utz G., Lutz E. Respiration of striated and smooth muscles of cold-blooded animals during resting, stretching, contraction and contracture // Pflugers. Arch. Gesamte. Physiol. Menschen. Tiere. 1955. V. 260, № 6. P. 524 – 537.
33. Brown J.H., Zhou Z., Reshetnikova L., Robinson H, Yammani R.D., Tobacman L.S., Cohen C. Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 18878 – 18883.
34. Butler T.M., Mooers S.U., Li C.Q., Narayan S., Siegman M.J. Regulation of catch muscle by twitchin phosphorylation: Effects on force, ATPase, and shortening // Biophys. J. 1998. V. 75, № 4. P. 1904 – 1914.
35. Butler T.M., Mooers S.U., Siegman M.J. Catch force links and the low to high force transition of myosin // Biophys. J. 2006. V. 90, № 9. P. 3193 – 3202.
36. Butler T.M., Narayan S.R., Mooers S.U., Hartshorne D.J., Siegman M.J. The myosin cross-bridge cycle and its control by twitchin phosphorylation in catch muscle // Biophys. J. 2001. V. 80. P. 415 – 426.
37. Butler T., Siegman M. Mechanism of catch force: tethering of thick and thin filaments by twitchin // Biomed. Res. Int. 2010. Article No. 725207.
38. Butler T.M., Siegman M.J. A force-activated kinase in a catch smooth muscle // J. Muscle Res. Cell Motil. 2011. V. 31, № 5-6. P. 349 – 358.
39. Casella J.F., Craig S.W., Maack D.J., Brown A.E. Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle // J. Cell Biol. 1987. V. 105, № 1. P. 371 – 379.

40. Castellani-Ceresa L., Lanzavecchia G. Isolation and identification of paramyosin from amphioxus notochord // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1982. V. 3, № 1. P. 75 – 85.
41. Castellani L., Elliott B.W. Jr, Cohen C. Phosphorylatable serine residues are located in a non-helical tailpiece of a catch muscle myosin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1988. V. 9, №6. P. 533 – 540.
42. Castellani L., Cohen C. A calcineurin-like phosphatase is required for catch contraction // *FEBS Lett.* 1992. V. 309, № 3. P. 321 – 326.
43. Chantler P.D., Szent-Gyorgyi A.G. Spectroscopic studies on invertebrate myosins and light chains // *Biochem.* 1978. V. 17, № 25. P. 5440 – 5448.
44. Chantler P.D., Szent-Gyorgyi A.G. Regulatory light-chains and scallop myosin: full dissociation, reversibility and co-operative effects // *J. Mol. Biol.* 1980. V. 138. P. 473 – 492.
45. Chantler P. Biochemical and structural aspects of molluscan muscle // *Mollusca Acad. Press, London.* 1983. V. 4. P. 77 – 154.
46. Chiba S., Ojima T., Nishita K. Absence of troponin in foot muscle of surf clam *Pseudocardium sachalinensis* // *Nippon Suisan Gakkaishi.* 1992. V. 58. P. 1919 – 1923.
47. Cho Y.J., Liu J., Hitchcock-degregori S.E. The Amino Terminus of Muscle Tropomyosin Is a Major Determinant for Function // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265, № 1. P. 538 – 545.
48. Clayton J.E., Sammons M.R., Stark B.C., Hodges A.R., Lord M. Differential regulation of unconventional fission yeast myosins via the actin track // *Curr. Biol.* 2010. V. 20. P. 1423 – 1431.
49. Cole R.A., Twarog B.M. Relaxation of catch in a molluscan smooth muscle. I. Effects of drugs which act on the adenylcyclase system // *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 1972. V. 43, № 2. P. 321 – 330.
50. Cooper J.A., Pollard T.D. Methods to measure actin polymerization // *Methods Enzymol.* 1982. V. 85, pt. B. P. 182 – 210.

51. Cooper J.A., Sept D. New insights into mechanism and regulation of actin capping protein // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008. V. 267. P. 183 – 206.
52. Coulton A.T., East D.A., Galinska-Rakoczy A., Lehman W., Mulvihill D.P. The recruitment of acetylated and unacetylated tropomyosin to distinct actin polymers permits the discrete regulation of specific myosins in fission yeast // *J. Cell Sci.* 2010. V. 123. P. 3235 – 3243.
53. Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J.M., Hartshorne D.J. Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 78, № 4. P. 1263 – 1272.
54. Dillon P.F., Aksoy M.O., Driska S.P., Murphy R.A. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle // *Science.* 1981. V. 211. P. 495 – 497.
55. Dobrzhanskaya A.V., Matusovskaya G.G., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. Thin filaments of bivalve smooth muscle may contain a calponin-like protein // *Biophysics (Oxf).* 2010. V. 55, № 5. P. 703 – 706.
56. Dobrzhanskaya A.V., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. Molluscan smooth catch muscle contains calponin but not caldesmon // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2013. V. 34, № 1. P. 23 – 33.
57. Dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., Dedova I.V., Tsubakihara M., Berry D.A., Nosworthy N.J. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83, № 2. P. 433 – 473.
58. Eaton B.L. Tropomyosin binding to F-actin induced by myosin heads // *Science.* 1976. V. 192. P. 1337 – 1339.
59. Edwards M., Zwolak A., Schafer D.A., Sept D., Dominguez R., Cooper J.A. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2014. V. 15. P. 677 – 689.
60. Elfvin M., Levine R.J., Dewey M.M. Paramyosin in invertebrate muscles. I. Identification and localization // *J. Cell Biol.* 1976. V. 71 №1. P. 261 – 272.

61. Elliott A., Bennett P.M. Structure of the thick filaments in molluscan adductor muscle // In: "Basic Biology of muscle: a comparative approach", ed. by Twarog B., Levine R., Dewey M. N.-Y.: Raven Press. 1982. P.11 – 27.
62. Elzinga M., Collins J.H., Kuehl W.M., Adelstein R.S. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70, № 9. P. 2687 – 2691.
63. Fanning A.S., Wolenski J.S., Mooseker M.S., Izant, J.G. Differential regulation of skeletal muscle myosin-II and brush border myosin-I enzymology and mechanochemistry by bacterially produced tropomyosin isoforms // Cell Motil. Cytoskeleton. 1994. V. 29. P. 29 – 45.
64. Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. V. 66. P. 375 – 400.
65. Flechter C.M. The relation between the mechanical and electrical activity of a molluscan unstriated muscle // Journal of Physiology (London). 193. № 91. P. 172 – 185.
66. Flicker P., Wallimann T., Vibert P. Location of regulatory light-chains in scallop myosin // Biophys. J. 1981. V. 33. P. 279.
67. Flicker P.F., Wallimann T., Vibert P. Electron microscopy of scallop myosin. Location of regulatory light chains // J. Mol. Biol. 1983. V. 169. P. 723 – 741.
68. Funabara D., Kinoshita S., Watabe S., Siegman M.J., Butler T.M., Hartshorne D.J. Phosphorylation of molluscan twitchin by the cAMP-dependent protein kinase // Biochem. USA. 2001a. V. 40, № 7. P. 2087 – 2095.
69. Funabara D., Nakaya M., Watabe S., Article O. Isolation and characterization of a novel 45 kDa calponin-like protein from anterior byssus retractor muscle of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // Fish. Sci. 2001b. V. 67, № 3. P. 511 – 517.
70. Funabara D., Watabe S., Mooers S.U., Narayan S., Dudas C., Hartshorne D.J., Siegman M.J., Butler T.M. Twitchin from molluscan catch muscle: primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function // J. Biol. Chem. 2003. V. 278, № 31. P. 29308 – 29316.

71. Funabara D., Kanoh S., Siegman M.J., Butler T.M., Hartshorne D.J., Watabe S. Twitchin as a regulator of catch contraction in molluscan smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2005. V. 26, № 6-8. P. 455 – 460.
72. Funabara D., Hamamoto C., Yamamoto K., Inoue A., Ueda M., Osawa R., Kanoh S., Hartshorne D.J., Suzuki S., Watabe S. Unphosphorylated twitchin forms a complex with actin and myosin that may contribute to tension maintenance in catch // *J. exp. Biol.* 2007. V. 210, № 24. P. 4399 – 4410.
73. Funabara D., Osawa R., Ueda M., Kanoh S., Hartshorne D.J., Watabe S. Myosin loop 2 is involved in the formation of a trimeric complex of twitchin, actin, and myosin // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284, № 27. P. 18015 – 18020.
74. Fyrberg C.C., Labeit S., Bullard B., Leonard K., Fyrberg E. *Drosophila* projectin: relatedness to titin and twitchin and correlation with lethal(4) 102 CDa and bent-dominant mutants // *Proc. Biol. Sci.* 1992. V. 249, № 1324. P. 33 – 40.
75. Galińska-Rakoczy A., Wawro B., Strzelecka-Gołaszewska H. New aspects of the spontaneous polymerization of actin in the presence of salts // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 387, № 4. P. 869 – 882.
76. Galler S., Kogler H., Ivemeyer M., Rüegg J.C. Force responses of skinned molluscan catch muscle following photoliberation of ATP // *Pflugers Arch.* 1999. V. 438, № 4. P. 525 – 530.
77. Galler S., Höpflinger M., Andrucho O., Hopflinger M.C., Andruchova O., Grassberger H. Effects of vanadate, phosphate and 2,3-butanedione monoxime (BDM) on skinned molluscan catch muscle // *Pflugers Arch.* 2005. V. 449, № 4. P. 372 – 383.
78. Galler S. Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2008. V. 29, № 2-5. P. 73 – 99.
79. Galler S., Litzlbauer J., Kröss M., Grassberger H. The highly efficient holding function of the mollusc “catch” muscle is not based on decelerated myosin head cross-bridge cycles // *Proc. Biol. Sci.* 2010. V. 277, № 1682. P. 803 – 808.
80. Garrels J.I., Gibson W. Identification and characterization of multiple forms of actin // *Cell.* 1976. V. 9, № 4, pt. 2. P. 793 – 805.

81. Geeves M.A., Halsall D.J. The dynamics of the interaction between myosin subfragment 1 and pyrene-labelled thin filaments, from rabbit skeletal muscle // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 1986. V. 229. P. 85 – 95.
82. Girich U.V., Lazarev S.S., Vyatchin I.G., Matusovsky O.S., Sheludko N.S. Natural Actin and Tropomyosin from Molluscan Catch Muscle // Journal of Physical Chemistry and Biophysics. 2017. V. 7, № 2. Article No. A1000249.
83. Gordon A.M., Ridgway E.B. Length-dependent electromechanical coupling in single muscle fibers // J. Gen. Physiol. 1976. V. 68, № 6. P. 653 – 669.
84. Gordon D.J., Boyer J.L., Korn E.D. Comparative biochemistry of non-muscle actins // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 8300 – 8309.
85. Gordon A.M., Homsher E., Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle // Physiol. Rev. 2000. V. 80, № 2. P. 853 – 924.
86. Guharoy M., Szabo B., Martos S. C., Kosol S., Tompa P. Intrinsic structural disorder in cytoskeletal proteins // Cytoskeleton. 2013. V. 70, № 10. P. 550 – 571.
87. Gunning P.W., Schevzov G., Kee A.J., Hardeman E.C. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function // Trends in Cell Biology. 2005. V. 15, № 6. P. 333 – 341.
88. Gunning P.W., O'Neill G., Hardemann E.C. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space // Physiol. Rev. 2008. V. 88. P. 1–35.
89. Gunning P.W., Ghoshdastider U., Whitaker S., Popp D., Robinson R.C. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments // J. Cell Sci. 2015. V. 128, № 11. P. 2009 – 2019.
90. Gunst S.J., Tang D.D. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle // Eur. Respir. J. 2000. V. 15, № 3. P. 600 – 616.
91. Hama H., Maruyama K., Noda H. Natural F-actin. II. Natural F-actin and its transformation to Straub F-actin // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 133, № 2. P. 251 – 262.
92. Hama H., Maruyama K. Natural F-actin V. Interaction with α -Actinin, Tropomyosin and Native Tropomyosin // J. Biochem. 1969. V. 66, № 5. P. 693 – 698.

93. Harrison R.G., Lowey S., Cohen C. Assembly of myosin // *J. Mol. Biol.* 1971. V. 59. P. 531 – 535.
94. Heeley D.H., Smillie L.B., Lohmeier-Vogel E.M. Effects of delation of tropomyosin overlap on regulated actomyosin subfragment 1 ATPase // *Biochem. J.* 1989. V. 258, № 3. P. 831 – 836.
95. Herman I.M. Actin isoforms // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993. V 5, № 1. P. 48 – 55.
96. Hild G., Bugyi B., Nyitrai M. Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function // *Cytoskeleton.* 2010. V. 67, № 10. P. 609 – 629.
97. Hill L.E., Mehegan J.P., Butters C.A., Tobacman L.S. Analysis of troponin-tropomyosin binding to actin. Troponin does not promote interactions between tropomyosin molecules // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 16106 – 16113
98. Hodges A.R., Krementsova E.B., Bookwalter C.S., Fagnant P.M., Sladewski T.E., Trybus K.M. Tropomyosin is essential for processive movement of a class V myosin from budding yeast // *Curr. Biol.* 2012. V. 22. P. 1410 – 1416.
99. Holmes K.C., Lehmann W. Gestalt-binding of tropomyosin to actin filaments // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2008. V. 29. P.213 – 219.
100. Hooper S.L., Thuma J.B. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85, № 3. P. 1001–1060.
101. Hooper S.L., Hobbs K.H., Thuma J.B. Invertebrate muscles: Thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle // *Prog. Neurobiol.* 2008. V. 86, № 2. P. 72 – 127.
102. Houdusse A., Cohen C. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 angstrom resolution: Implications for regulation // *Structure.* 1996. V. 4, № 1. P. 21 – 32.
103. Houdusse A., Kalabokis V.N., Himmel D., Szent-Györgyi A.G., Cohen C. Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head // *Cell.* 1999. V. 97, № 4. P. 459 – 470.

104. Huxley H.E., Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation // *Nature*. 1954. V. 173, № 4412. P. 973 – 976.
105. Huxley A.F., Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres // *Nature*. 1954. V. 173, № 4412. P. 971 – 973.
106. Huxley H.E. Structural Changes in the Actin- and Myosin-containing Filaments during Contraction // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1973. V. 37. P. 361 – 376.
107. Ikebe M., Hinkins S., Hartshorne D.J. Correlation of enzymatic properties and conformation of smooth muscle myosin // *Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 4580 – 4587.
108. Isenberg G., Aebi U., Pollard T.D. An actin-binding protein from *Acanthamoeba* regulates actin filament polymerization and interactions // *Nature*. 1980. V. 288, № 5790. P. 455 – 459.
109. Ishii N., Mitsumori F., Takahashi K., Simpson A.W., Ashley C.C. Intracellular metabolite and free calcium concentrations during the "catch" contraction and relaxation in a molluscan smooth muscle // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989. V. 315. P. 463 – 464.
110. Itzhaki R.F., Gill D.M. A micro-biuret method for estimating proteins // *Anal. Biochem.* 1964, № 9. P. 401 – 10.
111. Jakes R., Northrop F., Kendrick J. Calcium binding regions of myosin "regulatory" light chains // *FEBS Lett.* 1976. V. 70, № 1. P. 229 – 234.
112. Janco M., Suphamungmee W., Li X., Lehman W., Lehrer S.S., Geeves M.A. Polymorphism in tropomyosin structure and function // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. V. 34, № 3-4. P. 177 – 187.
113. Johnson W.H., Kahn J.S., Szent-Gyorgyi A.G. Paramyosin and contraction of catch muscles // *Science*. 1959. V. 130, № 3368. P. 160 – 161.
114. Kabsch W., Mannherz H.G., Suck D., Pai E.F., Holmes K.C. Atomic structure of the actin : DNase I complex // *Nature*. 1990. V. 347, № 6288. P. 37 – 44.

115. Kasai M., Hama H. Natural F-actin. 3. Natural F-actin as inactive polymer // *Biochim. Biophys. Acta.* 1969. V. 180, № 3. P. 550 – 61.
116. Kawamura M., Maruyama K. Length distribution of F-actin transformed from Mg-polymer // *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. V. 267, № 2. P. 422 – 434.
117. Kendrick-Jones J., Cohen C., Szent-Györgyi A.G., Longley W. Paramyosin: molecular length and assembly // *Science.* 1969. V. 163, № 872. P. 1196 – 1198.
118. Kee A.J., Yang L., Lucas C.A., Greenberg M.J., Martel N., Leong G.M., Hughes W.E., Cooney G.J., James D.E., Ostap E.M., Han W., Gunning P.W., Hardeman E.C. An actin filament population defined by the tropomyosin Tpm3.1 regulates glucose uptake // *Traffic.* 2015. V. 16, №7. P. 691 – 711.
119. Khaitlina S., Antropova O., Kuznetsova I., Turoverov K., Collins J.H. Correlation between polymerizability and conformation in scallop β -like actin and rabbit skeletal muscle α -actin // *Arch. Biochem. Biophys.* 1999. V. 368. P. 105 – 111.
120. Khaitlina S.Y. Functional specificity of actin isoforms // *Int. Rev. Cytol.* 2001. V. 202. P. 35 – 98.
121. Klee C.B., Draetta G.F., Hubbard M.J. Calcineurin // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1988. V. 61. P. 149 – 200.
122. Kojima H., Ishijima A., Yanagida T. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91, № 26. P. 12962 – 6.
123. Korn E.D., Carlier M.F., Pantaloni D. Actin polymerization and ATP hydrolysis // *Science.* 1987. V. 238 (№ 4827). P. 638 – 644.
124. Kühn S., Mannherz H.G. Actin: Structure, Function, Dynamics, and Interactions with Bacterial Toxins // *The Actin Cytoskeleton and Bacterial Infection by* ed. Mannherz H.G. (Microbiology). 2016. V 399. P. 1 – 34.
125. Laemmli V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227, № 5259. P. 680 – 685.
126. Lehman W., Head J.F., Grant P.W. The stoichiometry and location of troponin I- and troponin C-like proteins in the myofibril of the bay scallop, *Aequipecten irradians* // *Biochem. J.* 1980. V. 187, № 2. P. 447 – 456.

127. Lehman W. Thin-filament-linked regulation in molluscan muscles // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 668, № 3. P. 349 – 356.
128. Lehman W., Hatch V., Korman V., Rosol M., Thomas L., Maytum R., Geeves M.A., Van Eyk J.E., Tobacman L.S., Craig R. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 302. P. 593 – 606.
129. Lehman W., Galinska-Rakoczy A., Hatch V., Tobacman L.S., Craig R. Structural basis for the activation of muscle contraction by troponin and tropomyosin // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 388, № 4. P. 673 – 681.
130. Levine R.J., Elfvin M., Dewey M.M., Walcott B. Paramyosin in invertebrate muscles. II. Content in relation to structure and function // *J. Cell Biol.* 1976. V. 71, № 1. P. 273 – 279.
131. Lorenz M., Poole K.J.V., Popp D., Rosenbaum G., Holmes K.C. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin–tropomyosin gels // *J. Mol. Biol.* 1995. vol. 246, № 1. P. 108 – 119.
132. Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G., Baker H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation // *J. Mol. Biol.* 1969. V. 42, № 1. P. 1 – 29.
133. Lowy J. Contraction and relaxation in the adductor muscles of *Mytilus edulis* // *J. Physiol.* 1953. V. 120, № 1-2. P. 129 – 140.
134. Lowy J., Hanson J. Ultrastructure of invertebrate smooth muscle // *Physiol. Rev.* 1962. V. 42, № 5. P. 34 – 47.
135. Lowy J., Millman B.M., Hanson J. Structure and function in smooth tonic muscles of lamellibranch muscle molluscs // *Proc. Roy. Soc. Ser. B*. 1964. V. 160. P. 525 – 536.
136. Lowy J., Vibert P.J. Structure and organization of actin in a molluscan smooth muscle // *Nature*. 1967. V. 215, № 5107. P. 1254 – 1255.
137. Ma Y., Bogatcheva N.V., Gusev N.B. Heat shock protein (hsp90) interacts with smooth muscle calponin and affects calponin-binding to actin // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1476, № 2. P. 300 – 310.

138. MacLean-Fletcher S., Pollard T.D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin // *Cell*. 1980. V. 20. P. 329 – 341.
139. Mak A.S., Smillie L.B. Non-polymerizable tropomyosin: preparation, some properties and F-actin binding // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. V. 101, № 1. P. 208 – 214.
140. Margossian S.S., Lowey S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle // *Meth. Enzymol.* 1982. V. 85, pt. B. P. 55 – 71.
141. Marston S.B. Properties of calponin isolated from sheep aorta thin filaments // *FEBS Lett.* 1991. V. 292, № 1-2. P. 179 – 182.
142. Maruyama K., Obinata T. Presence of beta-actinin in the soluble fraction of the muscle cells of the chick embryo // *J. Biochem.* 1965, № 57. P. 575 – 577.
143. Maruyama K. Effect of beta-actinin on the particle length of F-actin // *Biochim. Biophys. Acta.* 1966. V. 126, № 2. P. 389 – 398.
144. Maruyama K., Kimura S., Ishii T., Kuroda M., Ohashi K., Muramatsu S. β -Actinin, a regulatory protein of muscle: purification, characterization, and function // *The Journal of Biochemistry.* 1977. V. 81, № 1. P. 215 – 232.
145. Maruyama K. Beta-Actinin, Cap Z, connectin and titin: what's in a name? // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27, № 5. P. 264 – 266.
146. Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S., Permyakova T.V, Zukowska M., Sobieszek A. Catch muscle of bivalve molluscs contains myosin- and twitchin-associated protein kinase phosphorylating myorod // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1804, № 4. P. 884 – 890.
147. Matusovsky O.S., Matusovskaya G.G., Dyachuk V.A., Shelud'ko N.S. Molluscan catch muscle myorod and its N-terminal peptide bind to F-actin and myosin in a phosphorylation-dependent manner // *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. V. 509, № 1. P. 59 – 65.
148. 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.

149. Matusovsky O.S., Dobrzhanskaya A.V., Pankova V.V., Kiselev K.V., Girich U.V., Shelud'ko N.S. Crenomytilus grayanus 40 kDa calponin-like protein: cDNA cloning, sequence analysis, tissue expression, and post-translational modifications // Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genomics and Proteomics. 2017. V. 22. P. 98 – 108.
150. Matusovsky O.S., Mansson A., Persson M., Cheng Y.S., Rassier D.E. High-speed AFM reveals subsecond dynamics of cardiac thin filaments upon Ca²⁺ activation and heavy meromyosin binding // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V.116, № 33. P. 16384 – 16393.
151. Maytum R., Hatch V., Konrad M., Lehman W., Geeves M.A. Ultra short yeast tropomyosins show novel myosin regulation // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 1902 – 1910.
152. McIntosh B.B., Holzbaur E.L.F., Ostap E.M. Control of the initiation and termination of Kinesin-1-driven transport by Myosin-Ic and nonmuscle tropomyosin // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. 523 – 529.
153. McLachlan A.D., Stewart M. The 14-fold periodicity in alpha-tropomyosin and the interaction with actin // J. Mol. Biol. 1976. V. 103, № 2. P. 271 – 298.
154. Mendez-Lopez L., Hellman U., Ibarguren I., Villamarin J.A. Filamin isoforms in molluscan smooth muscle // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1824, № 12. P. 1334 – 1341.
155. Mukou M., Kishi H., Shirakawa I., Kobayashi T., Tominaga K., Imanishi H., Sugi H. Marked load-bearing ability of *Mytilus* smooth muscle in both active and catch states as revealed by quick increases in load // J. Exp. Biol. 2004. V. 207, № 10. P. 1675 – 1681.
156. Müller M., Diensthuber R.P., Chizhov I., Claus P., Heissler S.M., Preller M., Taft M.H., Manstein D.J. Distinct functional interactions between actin isoforms and nonsarcomeric myosins // PLoS One. 2013. V. 8, № 7. Article No. e70636.
157. Murphy R.A. Structural proteins in the myofilaments and regulation of contraction in vertebrate smooth muscle // Fed. Proc. 1976. V. 35, № 6. P. 1302 – 1306.

158. Nishita K., Ojima T., Takahashi A., Inoue A. Troponin from smooth adductor muscle of Ezo-giant scallop // J. Biochem. 1997. V. 121, № 3. P. 419 – 424.
159. Nishida W., Abe M., Takahashi K., Hiwada K. Do thin filaments of smooth muscle contain calponin? A new method for the preparation // FEBS Lett. 1990. V. 268, № 1. P. 165 – 168.
160. O'Brien E.J., Gillis J.M., Couch J. Symmetry and molecular arrangement in paracrystals of reconstituted muscle thin filaments // J. Mol. Biol. 1975. V. 99, № 3. P. 461 – 475.
161. Odintsova N., Dyachuk V., Kiselev K., Shelud'ko N. Expression of thick filament proteins during ontogenesis of the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // Comp. Biochem. B - Biochem. 2006. V. 144, № 2. P. 238 – 244.
162. Ohki T., Ohno C., Oyama K., Mikhailenko S.V., Ishiwata S. Purification of cytoplasmic actin by affinity chromatography using the C-terminal half of gelsolin // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 383, № 1. P. 146 – 150.
163. Ojima T., Nishita K. Isolation of troponins from striated and smooth adductor muscles of Akazara scallop // J. Biochem. 1986a. V. 100, № 3. P. 821 – 824.
164. Ojima T., Nishita K. Troponin from Akazara scallop striated adductor muscles // J. Biol. Chem. 1986b. V. 261, № 35. P. 16749 – 16754.
165. Otani O., Hikichi S., Nishita K., Sekii T., Arai K. A loss of actin from shell-fish myofibrils and fish myosin B during wash-treatment // Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries. 1983. V. 49, № 3. P. 415 – 424.
166. Pantaloni D., Le Clainche C., Carlier M.F. Mechanism of actin-based motility // Science. 2001. V. 292, №5521. P. 1502 – 1506.
167. Pardee J.D., Spudich J.A. Purification of muscle actin // Methods Enzymol. 1982a. V. 85, pt. B. P. 164 – 181.
168. Pardee J.D., Spudich J.A. Purification of muscle actin // Methods Cell Biol. 1982b. V. 24. P. 271 – 289.
169. Parnas J. Energetik glatter Muskeln // Pfluegers Arch. Ges. Physiol. 1910. V. 134. P. 441 – 495.

170. Pepe F.A., Drucker B., Chowrashi P.K. The myosin filament: XI. Filament assembly // *Prep. Biochem.* 1986. V. 16, № 2. P. 99 – 132.
171. Perrin B.J., Ervasti J.M. The actin gene family: Function follows isoform // *Cytoskeleton.* 2010. V. 67, № 10. P. 630 – 634.
172. Phillips G.N., Lattman E.E., Cummins P., Lee K.Y., Cohen C. Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin // *Nature.* 1979. V. 278, № 5703. P. 413 – 417.
173. Pires E., Perry S.V., Thomas M.A. Myosin light-chain kinase, a new enzyme from striated muscle // *FEBS Lett.* 1974. V. 41, № 2. P. 292 – 296.
174. Pittenger M.F., Kistler A., Helfman D.M. Alternatively spliced exons of the β -tropomyosin gene exhibit different affinities and effects with nonmuscle caldesmon // *J. Cell Sci.* 1995. V. 108. P. 3253 – 3265.
175. Pollard T.D. A falling ball apparatus to measure filament cross-linking // *Methods Cell Biol.* 1982. V. 24. P. 301 – 311.
176. Pollard T.D. Actin and actin-binding proteins // *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2016. V. 8, № 8. Article No. a018226.
177. Pollard T.D., Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // *Cell.* 2003. V. 112, № 4. P. 453 – 465.
178. Pollard T.D., Cooper J.A. Methods to characterize actin filament networks // *Methods Enzymol.* 1982. V. 85. P. 211 – 233.
179. Pollard T.D., Cooper J.A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions // *Ann. Rev. Biochem.* 1986. V. 55. P. 987 – 1035.
180. Pollard T.D., Craig S.W. Mechanism of actin polymerization // *Trends Biochem. Sci.* 1982, №7. P. 55 – 58.
181. Potter J.D. The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils // *Arch. Biochem. Biophys.* 1974. V. 162, № 3. P. 436 – 441.
182. Razzaq A., Schmitz S., Veigel C., Molloy J.E., Geeves M.A., Sparrow J.C. Actin residue E93 is identified as an amino acid affecting myosin binding // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 28321 – 28328.

183. Rees M., Young M. Studies on the Isolation and Molecular Properties of Homogeneous Globular Actin: Evidence for a A single Polypeptide Chain Structure // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 4449 – 4458.
184. Rubenstein P.A., Spudich J.A. Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74, № 1. P. 120 – 123.
185. Ruegg J.C. On the effect of inhibiting the actin-myosin interaction on the viscous tone of a lamellibranch catch muscle // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1961. V. 154, № 955. P. 224 – 249.
186. Ruegg, J. C. Tropomyosin-paromyosin system and "prolonged contraction" in a molluscan smooth muscle // Proc. Roy. Soc. (London). 1964. Pt. B, № 160. P. 536 – 542.
187. Rüegg J.C. Physiology and biochemistry of prolonged contraction. Experimental investigation with special reference to the m. retractor byssi in *Mytilus edulis* // Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, German. 1965. Suppl. № 16. P. 1 – 76.
188. Rüegg J.C., Strassner E. Sperrtonus und Nukleosidtriphosphate // Zeitschrift für Naturforschung. Teil B. 1963. V. 18. P. 133 – 138.
189. Schafer D.A., Waddle J.A., Cooper J.A. Localization of CapZ during myofibrillogenesis in cultured chicken muscle // Cell Motil., Cytoskeleton. 1993. V. 25. P. 317 – 335.
190. Schafer D.A., Jennings P.B., Cooper J.A. Rapid and efficient purification of actin from nonmuscle sources // Cell Motil, Cytoskeleton. 1998. V. 39. P. 166 – 171.
191. Schmidt W.M., Lehman W., Moore J.R. Direct Observation of Tropomyosin Binding to Actin Filaments // Cytoskeleton (Hoboken). 2015. V. 72, № 6. P. 292 – 303.
192. Sept D., McCammon J.A. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation // Biophysical journal. 2001. V. 81, № 2. P. 667 – 674.
193. Shelud'ko N.S., Tuturova K.F., Permyakova T.V., Orlova A.A. Thick filaments in smooth muscles of bivalve molluscs contain an unknown protein // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 262.

194. Shelud'ko N.S., Tuturova K.F., Permyakova T.V., Plotnikov S.V., Orlova A.A. A novel thick filament protein in smooth muscles of bivalve molluscs // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 1999. V. 122. P. 277 – 285.
195. Shelud'ko N., Permjakova T., Tuturova K., Neverkina O., Drozdov A. Myorod, a thick filament protein in molluscan smooth muscles: isolation, polymerization and interaction with myosin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2001. V. 122. P. 91 – 100.
196. Shelud'ko N., Tuturova K., Permyakova T., Tyurina O., Matusovskaya G., Matusovsky O. Proteolytic substructure of myorod, a thick filament protein of molluscan smooth muscles // *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 133. P. 69 – 75.
197. Shelud'ko N.S., Matusovskaya G.G., Permyakova T.V., Matusovsky O.S. Twitchin, a thick-filament protein from molluscan catch muscle, interacts with F-actin in a phosphorylation-dependent way // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. V. 432, № 2. P. 269 – 77.
198. Shelud'ko N.S., Matusovsky O.S., Permyakova T.V., Matusovskaya G.G. “Twitchin-actin linkage hypothesis” for the catch mechanism in molluscan muscles: evidence that twitchin interacts with myosin, myorod, and paramyosin core and affects properties of actomyosin // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. V. 466. P. 125 – 135.
199. Shelud'ko N.S., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Shevchenko U.V. Hybrid and non-hybrid actomyosins reconstituted with actin, myosin and tropomyosin from skeletal and catch muscles // *Biochemical and biophysical research communications.* 2015. V. 464, № 2. P. 611 – 615.
200. 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.
201. Siegman M.J., Mooers S.U., Li C., Narayan S., Trinkle-Mulcahy L., Watabe S., Hartshorne D.J., Butler T.M. Phosphorylation of a high molecular weight

- (approximately 600 kDa) protein regulates catch in invertebrate smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1997. V. 18, № 6. P. 655 – 670.
202. Siegman M.J., Funabara D., Kinoshita S., Watabe S., Hartshorne D.J., Butler T.M., Group M.B. Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95, № 9. P. 5383 – 5388.
203. Skoumpla K., Coulton A.T., Lehman W., Geeves M.A., Mulvihill D.P. Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *J. Cell Sci.* 2007. V. 120. P. 1635 – 1645.
204. Small J.V., Gimona M. The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell // *Acta Physiol. Scand.* 1998. V. 164, № 4. P. 341 – 348.
205. Smillie L.B. Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins // *Methods Enzymol.* 1982. V. 85, pt. B. P. 234 – 241.
206. Sobieszek A. The fine structure of the contractile apparatus of the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* // *J. Ultrastruct. Res.* 1973. V. 43, № 3. P. 313 – 343.
207. Sobieszek A., Small J.V. Effect of muscle and non-muscle tropomyosins in reconstituted skeletal muscle actomyosin // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 118, № 3. P. 533 – 539.
208. Sobieszek A., Matusovsky O.S., Permyakova T.V., Sarg B., Lindner H., Shelud'ko N.S. Phosphorylation of myorod (catchin) by kinases tightly associated to molluscan and vertebrate smooth muscle myosins // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. V. 454, № 2. P. 197 – 205.
209. Sobieszek A., Sarg B., Lindner H., Matusovsky O.S., Zukowska M. Myosin kinase of molluscan smooth muscle. Regulation by binding of calcium to the substrate and inhibition of myorod and twitchin phosphorylation by myosin // *Biochemistry.* 2010. V. 49, № 19. P. 4191 – 4199.
210. Sohn R.L., Vikstrom K.L., Strauss M., Cohen C., Szent-Gyorgyi A.G., Leinwand L.A. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 266. P. 317 – 330.

211. Sousa A.D., Farah C.S. Quantitative analysis of tropomyosin linear polymerization equilibrium as a function of ionic strength // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277, № 3. P. 2081 – 2088.
212. Stark B.C., Sladewski T.E., Pollard L.W. Lord M. Tropomyosin and myosin-II cellular levels promote actomyosin ring assembly in fission yeast // *Mol. Biol. Cell.* 2010. V.21. P. 989 – 1000.
213. Stepkowski D., Orlova A.A., Moos C. The actin-activated ATPase of co-polymer filaments of myosin and myosin-rod // *Biochem J.* 1994. V. 300, pt. I. P. 153 – 158.
214. Stewart M., McLachlan A.D. Fourteen actin-binding sites on tropomyosin? // *Nature.* 1975. V. 257. P. 331 – 333.
215. Storti R.V., Coen D.M., Rich A. Tissue specific forms of actin in developing chick // *Cell.* 1976, № 8. P. 521 – 527.
216. Straub F.B. Actin // *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged.* 1942a. V. 2. P. 3 – 16.
217. Straub F.B. G- and F-actin and the effect of ATP // *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged.* 1942b. V. 2. P. 16.
218. Strauss J.D., Murphy R.A. Regulation of cross-bridge cycling in smooth muscle // In: "Biochemistry of Smooth Muscle Contraction" by ed. Bárány M., Academic Press, New-York. 1996. P. 341 – 353.
219. Strzelecka-Gołaszewska H., Próchniewicz E., Nowak E., Zmorzyński S., Drabikowski W. Chicken-gizzard actin: polymerization and stability // *Eur. J. Biochem.* 1980. V. 104, № 1. P. 41 – 52.
220. Suzuki S., Kawamura M., Maruyama K. Particle length and stability of natural F-actin from adductor muscle of the clam, *Meretrix meretrix* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1971. V. 38, № 1. P. 147 – 155.
221. Szent-Györgyi A. G. The reversibility of the contraction of myosin threads // *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, S. Karger Basel, New-York.* 1942. V. II. P. 25 – 26.

222. Szent-Györgyi A.G., Kendrick-Jonas J. The light chains of scallop myosin as regulatory subunits // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 74, № 2. P. 179 – 203.
223. Szent-Gyorgyi A.G. Calcium regulation of muscle contraction // *Biophys. J.* 1975. V. 15. P. 707 – 723.
224. Szent-Gyorgyi A.G., Cohen G., Kendick-Jones J. Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscle. Native filaments: isolation and characterization // *J. Mol. Biol.* 1971. V. 57. P. 291 – 323.
225. Tajima Y., Makino K., Hanyuu T. X-ray evidence for the elongation of thin and thick filaments during isometric contraction of a molluscan smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1994. V. 15, № 6. P. 659 – 671.
226. Tajima Y., Takahashi W., Ito A. Small-angle X-ray diffraction studies of a molluscan smooth muscle in the catch state // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2008. V. 29, № 1. P. 57 – 68.
227. Tang N., Ostap E.M. Motor domain-dependent localization of myo1b (myr-1) // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. P. 1131 – 1135.
228. Taussky H.H., Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1953. V. 202, № 2, P. 675 – 85.
229. Tobacman L.S. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction // *Ann. Rev. Physiol.* 1996. V. 58. P. 447 – 481.
230. Tobacman L.S. Cooperative binding of tropomyosin to actin // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. V. 644. P. 85 – 94.
231. Tsao T.C., Bailey K., Adair G.S. The size, shape and aggregation of tropomyosin particles // *Biochem. J.* 1951. V. 49, №1. P. 27 – 36.
232. Twarog B.M. The regulation of catch in molluscan muscle // *J. Gen. Physiol.* 1967. V. 50, № 6. P. 157 – 169.
233. Twarog B.M., Cole R.A. Relaxation of catch in a molluscan smooth muscle. II. Effects of serotonin, dopamine and related compounds // *Comp. Biochem. Physiol., A Comp. Physiol.* 1972. V. 43, № 2. P. 331 – 335.
234. Vahokoski J., Bhargav S.P., Desfosses A., Andreadaki M., Kumpula E.P., Martinez S.M., Ignatev A., Lepper S., Frischknecht F., Sidén-Kiamos I.

- Structural differences explain diverse functions of Plasmodium actins // PLoS Pathog. 2014. V. 10, № 4. Article No. e1004091.
235. Vandekerckhove J., Weber K. Actin amino-acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin // Eur. J. Biochem. 1978. V. 90, № 3. P. 451 – 462.
236. Vandekerckhove J., Weber K. The amino acid sequence of actin from chicken skeletal muscle actin and chicken gizzard smooth muscle actin // FEBS Lett. 1979. V. 102, № 2. P. 219 – 222.
237. Vandekerckhove J., Weber K. Actin typing on total cellular extracts: a highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins // Eur. J. Biochem. 1981. V. 113, № 3. P. 595 – 603.
238. Vandekerckhove J., Weber K. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins // J. Mol. Biol. 1984. V. 179, № 3. P. 391 – 413.
239. Vibert P. Domain structure of the myosin head in correlation averaged images of shadowed molecules // J. Muscle Res. Cell Motil. 1988, № 9. P. 147 – 155.
240. Vibert P., Edelstein S.M., Castellani L., Elliott B.W., Mofilify C., Elliott W., Chemisfry B. Mini-titins in striated and smooth molluscan muscles: structure, location and immunological crossreactivity // J. Muscle. Res. Cell. Motil. 1993a. V. 14, № 6. P. 598 – 607.
241. Vibert P., Edelstein S., Castellani L., Elliott B. Location and cross-reactivity of scallop mini titin // Biophys. J. 1993b. V. 64, № 2. P. 25 – 25.
242. Vibert P., Craig R., Lehman W. Steric-model for activation of muscle thin filaments // J. Mol. Biol. 1997. V. 266, № 1. P. 8 – 14.
243. Von Uexküll J. Studien über den Tonus VI. Die Pilgermuschel // Zeitschrift für Biologie. 1912. V. 58. P. 305 – 322.
244. Vyatchin I.G., Shevchenko U.V., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S.. Troponin-like regulation in muscle thin filaments of the mussel *Crenomytilus grayanus* (*Bivalvia: Mytiloidea*) // Biochim. Biophys. Acta. 2015. V. 1854, № 10, pt. A. P. 1444 – 1450.

245. Vyatchin I.G., Shevchenko U.V., Shelud'ko N.S. Protein composition of thick filaments from molluscan catch muscle and the role of twitchin in the catch-state formation // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019. V. 520, № 3. P. 634 – 639.
246. Weber A., Murray J.M. Molecular control mechanisms in muscle contraction // *Physiol. Rev.* 1973. V. 53, № 3. P. 612 – 673.
247. Weeds A.G., Lowey S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin // *J. Mol. Biol.* 1971. V. 61, № 3. P. 701 – 725.
248. Weisel J.W., Szent-Gyorgyi A.G. The coiled-coil structure: identity of the two chains of *Mercenaria* paramyosin // *J. Mol. Biol.* 1975. V. 98, № 4. P. 665 – 673.
249. Weiss A., Schiaffino S., Leinwand L. A. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chainfamily: Implications for functional diversity // *Journal of Molecular Biology*. 1999. V. 290. P. 61 – 75.
250. Whalen R.G., Buckingham M.E., Gros F. Protein and RNA synthesis in cultured muscle cells // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1977. V. 19. P. 485 – 489.
251. Winder S.J., Ayscough K.R. Actin-binding proteins // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118, pt. 4. P. 651 – 654.
252. Winkelman L. Comparative studies of paramyosin // *Comp. Biochem. Physiol.* 1976. V. 55, pt. B. P. 391 – 397.
253. Woods E.F., Pont M.J. Characterization of some invertebrate tropomyosins // *Biochemistry*. 1971. V. 10, № 2. P. 270 – 276.
254. Woods E.F. The conformational stabilities of tropomyosins // *Aust. J. Biol. Sci.* 1976. V. 29, № 5-6. P. 405 – 418.
255. Yamada A., Yoshio M., Nakayama H. Bi-directional movement of actin filaments along long bipolar tracks of oriented rabbit skeletal muscle myosin molecules // *FEBS Lett.* 1997. V. 409, № 3. P. 380 – 384.
256. Yamada A., Yoshio M., Oiwa K., Nyitray L. Catchin, a novel protein in molluscan catch muscles, is produced by alternative splicing from the myosin heavy chain gene // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 295, № 2. P. 169 – 178.

257. Yamada A., Yoshio M., Kojima H., Oiwa K. An in vitro assay reveals essential protein components for the "catch" state of invertebrate smooth muscle // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, № 12. P. 6635 – 6640.
258. Yamada A., Yoshio M., Nakamura A., Kohama K., Oiwa K. Protein phosphatase 2B dephosphorylates twitchin, initiating the catch state of invertebrate smooth muscle // J. Biol. Chem. 2004. V. 279, № 39. P. 40762 – 40768.
259. Yamada A., Yoshio M., Oiwa K. Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state in vitro // J. Muscle Res. Cell Motil. 2013. V. 34, № 2. P. 115 – 123.