

На правах рукописи

ДОБРЖАНСКАЯ
Анна Валерьевна

**СОСТАВ И СВОЙСТВА ТОНКИХ НИТЕЙ ЗАПИРАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ
МИДИИ *CRENOMYTILUS GRAYANUS***

03.03.04 — клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Владивосток — 2013

Работа выполнена в лаборатории биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Шелудько Николай Семёнович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Жадан Пётр Михайлович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичёва Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией.

Ламаш Нина Евгеньевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, старший научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «20» декабря 2013 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17). Факс: (423) 2310-900, электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Автореферат разослан

“19” ноября 2013 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Тонкие (актиновые) нити являются не только партнером толстых нитей в мышечных клетках, но и составляют главный компонент цитоскелета как в неммышечных, так и в мышечных клетках. В гладкомышечных клетках позвоночных выделяют сократительный и цитоскелетный домены, которые различаются наличием миозиновых нитей в сократительном домене и составом актин-связывающих белков. Например, актин-связывающий белок кальдесмон, придающий Ca^{2+} -чувствительность тонким нитям, локализован только в сократительном домене в то время, как локализация кальпонины, актин-связывающего белка с неизвестной функцией, зависит от состояния мышечной клетки: при возбуждении клетки он мигрирует в цитоскелетный домен (Parker, 1994).

Тонкие нити мышц беспозвоночных практически не исследованы даже в случае мышц двустворчатых моллюсков, гладкие мышцы которых могут находиться не в двух, а в трех состояниях: расслабленном, сокращенном и запирательном. В запирательном состоянии мышца способна поддерживать длительное время створки животных в закрытом состоянии без признаков утомления. Это явление (catch) описано более 100 лет назад, однако его механизм остается неизвестным. Общепринято, что запирательный тонус в этих мышцах обеспечивают пассивные сшивки между толстыми и тонкими нитями. На роль сшивок был предложен парамиозин (Rüegg, 1958), миозин (Lovy, Millman, 1959) и твитчин (Shelud'ko et al., 2004). Образование *in vitro* твитчиновой сшивки регулируется как со стороны твитчина, так и со стороны тонких нитей с участием тропомиозина и миозина (Shelud'ko et al., 2004; Borovikov et al., 2010). По всей вероятности, роль тонких нитей в запирательном тонусе мышц моллюсков не является пассивной.

В данной работе мы разработали метод выделения тонких нитей из гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus*, исследовали их свойства и белковый состав и идентифицировали ряд новых белковых компонентов. Среди идентифицированных белков оказался кальпониноподобный белок, который характерен для неммышечных и гладкомышечных клеток. Мы показали, что кальпонин мидии входит в состав изолированных тонких нитей, занимая в количественном отношении третье место после актина и тропомиозина. Вопреки литературным данным мы не обнаружили ни в составе тонких нитей, ни в составе мышц мидии белок кальдесмон, который, как предполагалось, определяет Ca^{2+} -чувствительность тонких нитей в мышцах двустворчатых моллюсков (Bennett, Marston, 1990). Мы также показали, что кальпонин не может быть заменой кальдесмону поскольку избирательное удаление кальпонины из тонких нитей мидии не приводит к потере их Ca^{2+} -чувствительности. Похоже, Ca^{2+} -регуляторная система в гладких мышцах двустворчатых моллюсков, отличается от таковой в гладких мышцах позвоночных.

Кальпонин мидии был выделен из тонких нитей без использования тепловой обработки. Показано его взаимодействие с актинами мидии и кролика и его способность ингибировать актин-миозиновое взаимодействие в синтетических моделях, содержащих как миозин мидии, так и миозин кролика. Свойства кальпонины мидии качественно совпадают со свойствами кальпонины гладких мышц позвоночных животных, однако его сродство к актину и степень влияния на актин-миозиновое взаимодействие зависит от происхождения актина и миозина.

Интересно, что минимальное ингибирование ($\approx 25\%$) актин-миозинового взаимодействия кальпонином мидии наблюдается в случае чисто мидийной модели, в то время как гибридные модели, содержащие миозин кролика, демонстрируют существенно большее ингибирование (более 80%).

Показана хорошо выраженная способность кальпонины мидии агрегировать нити актина. Мы полагаем, что способность кальпонины «сшивать» актиновые нити, ужесточая цитоскелет, может быть «цитоскелетным вкладом» кальпонины в запирательное сокращение.

Цели и задачи исследования

Целью работы было выяснение роли тонких нитей гладких мышц двустворчатых моллюсков в запирательном тонусе.

Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод получения изолированных тонких нитей гладких мышц двустворчатых моллюсков на примере мышц мидии *Crenomytilus grayanus*.
2. Выяснить белковый состав изолированных тонких нитей.
3. Идентифицировать белковые компоненты в составе тонких нитей.

Научная новизна

Разработан принципиально новый метод получения Ca^{2+} -регулируемых тонких нитей из гладких мышц двустворчатых моллюсков. Предлагаемый метод позволяет получать изолированные тонкие нити с хорошо воспроизводимым белковым составом и высоким выходом. Впервые показано присутствие кальпонины в тонких нитях из мышцы беспозвоночного животного. Впервые детально исследованы физико-химические свойства кальпонины беспозвоночного животного. Обнаружена сильная зависимость взаимодействия кальпонины с тонкими нитями от условий среды: температуры, ионной силы и pH. Например, понижение температуры с 22°C до 2°C приводит к полной диссоциации кальпонины при сохранении всех остальных белков в составе тонких нитей и сохранении Ca^{2+} -регуляции тонких нитей. Ca^{2+} -регуляция тонких нитей мидии не является ни кальдесмоновой, как это предполагалось ранее (Bennett, Marston, 1990), ни кальпониновой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют и конкретизируют наши представления о механизмах функционирования запирательных мышц. Они имеют фундаментальное значение для понимания роли тонких нитей гладких мышц двустворчатых моллюсков в запирательном тонусе этих мышц. Практическая значимость работы связана с разработкой принципиально нового метода выделения нативных тонких нитей из мышц моллюсков.

Апробация результатов и публикации

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международных симпозиумах «Биологическая подвижность» (Пушино, 2006, 2010, 2012), Конференции студентов, аспирантов и молодых учёных НОЦ ДВГУ (Владивосток, 2006), XII Всероссийской молодёжной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2009), Ежегодных научных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского (Владивосток, 2010, 2011, 2012), Международной конференции Азиатско-тихоокеанской белковой ассоциации (Шанхай, Китай, 2011), 40-ой Европейской мышечной конференции (Берлин,

Германия, 2011), Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных (Пушино, 2012).

По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования.

Личный вклад соискателя

Экспериментальная часть работы была выполнена соискателем самостоятельно, за исключением масс-спектрометрии, проведённой в НИИ Физико-химической медицины Росздрава, и экспериментов на теневых волокнах, выполненных в лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН. Соискатель непосредственно участвовал в анализе и интерпретации полученных результатов, в представлении результатов на конференциях и подготовке публикаций по результатам исследований.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 103 страницах, состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов», выводов и списка цитируемой литературы, включающего 211 ссылок, из них 199 на иностранных языках. Рукопись содержит 20 рисунков и 2 таблицы.

Финансовая поддержка работы

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-33076) и Конкурса проектов ДВО РАН (проекты № 10-III-B-06-040, № 11-III-B-06-107, № 12-III-B-06-095).

Благодарности

Автор выражает признательность сотрудникам лаборатории биофизики клетки Института биологии моря за постоянную помощь на всех этапах исследования. Автор благодарит д.б.н. Ю.С. Боровикова и сотрудников лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН за участие в совместной работе.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Получение белковых препаратов

Миозин, «природный» Ф-актин и тропомиозин моллюсков выделяли из заднего аддуктора мидии *Crenomytilus grayanus* ранее описанными методами (Shelud'ko et al., 2001, 2004b, 2007).

Изолированные тонкие нити получали из свежих гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus* без предварительной отмывки (Dobrzhanskaya et al., 2013). Кальпонин мидии получали из изолированных тонких нитей посредством избирательной экстракции при 2°C (Добржанская и др., 2010).

Экстракты термостабильных белков гладких мышц цыплёнка и мидии получали общепринятым методом (Bretscher, 1984).

Скелетный мышечный миозин получали из поперечно-полосатых мышц спины и задних конечностей кролика (Margossian, Lovey, 1982). Для получения актина использовали мышечный остаток после экстракции миозина (Shelud'ko et al., 2007).

Чистоту и состав белковых препаратов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (Laemmli, 1970) с рядом модификаций (Шелудько, 1975; Shelud'ko et al., 1999).

Концентрацию белков определяли методом биуретовой реакции с модификациями (Пермякова, 1997).

Mg-АТФазную активность определяли измерением неорганического фосфата методом Херса, с некоторыми модификациями (Fiske, Subbarow, 1925).

Вестерн-блоттинг

Для идентификации белков с помощью специфических антител использовался метод Вестерн-блоттинга. Кальдесмон идентифицировали моноклональными антителами к кальдесмону гладких мышц позвоночных животных (C4562, Sigma или MAB1684, Chemicon). Идентификацию кальпонины проводили моноклональными антителами к h-кальпониону гладких мышц позвоночных животных (C6047, Sigma).

Матричная лазерная десорбционно-ионизационная времяпролетная тандемная масс-спектрометрия (MALDI/MS-MS)

Масс-спектрометрия была выполнена в НИИ Физико-химической медицины Росздрава. Образцы предварительно подвергались трипсинолизу, а затем смешивались с 2,5-дигидро бензойной кислотой. Поиск белков по набору масс пептидов проводили в программе Mascot v.2.1 (MatrixScience, UK, www.matrixscience.com).

Низкоскоростное и высокоскоростное центрифугирование

Низкоскоростное осаждение использовали для тестирования способности кальпонины мидии взаимодействовать с Ф-актином мидии с образованием крупных агрегатов, осаждаемых при 12 000 g. Высокоскоростное осаждение (110 000 g) использовали для тестирования взаимодействия кальпонины мидии с Ф-актином в условиях отсутствия агрегации нитей. Белки, использовавшиеся в экспериментах, подвергались предварительному осветлению при скорости осаждения.

Денситометрия

Количественные соотношения белков определяли сканированием электрофорезных гелей с последующей обработкой сканированных изображений с помощью программы RFLPscan Plus Version 3.12 (CSPI-Scanalytics, США).

Метод скелетно-мышечных теневых волокон

Эксперименты с использованием метода теневых волокон были проведены совместно с сотрудниками лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН с использованием стандартной методики (Borovikov, Gusev, 1983; Боровиков и др., 1988).

Измерение вязкости

Вязкость измеряли при низких градиентах скорости методом «падающего шарика» (Pollard, Cooper, 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Тонкие нити гладких (запирательных) мышц мидии

1.1. Выделение тонких нитей мидии

Стандартным этапом практически любого метода выделения белков является предварительная отмывка тканевого гомогената растворами с физиологическим значением ионной силы для удаления саркоплазматических белков. В случае гомогената скелетных мышц отмывка содержит саркоплазматические белки и не содержит сократительные белки. Однако при выделении «миофибрилл» из двух десятков свежих мышц семи видов двустворчатых моллюсков, включая поперечно-полосатые, косоисчерченные и гладкие мышцы, во всех отмывках были обнаружены актин и тропомиозин (Shelud'ko et al., 1999), которые осаждались ультрацентрифугированием, то есть, входили в состав тонких нитей. Также есть электронномикроскопические наблюдения присутствия тонких нитей в отмывках мышц двустворчатых моллюсков (Otani et al., 1983). Эти различия между скелетными мышцами позвоночных и гладкими мышцами моллюсков при отмывках, по-видимому, связаны с различием их Ca^{2+} -регуляторных систем (Knox et al., 1986). Наличие двойной регуляции в мышцах моллюсков может приводить к тому, что ригоризация сократительного аппарата при отмывках наступает при меньших концентрациях АТФ. Поэтому в гомогенате свежих мышц моллюсков актомиозин находится в «расслабленном» (диссоциированном) состоянии, что приводит, по нашим наблюдениям, к потере 50-80% тонких нитей. В данной же работе тонкие нити мы выделяли не из отмытого материала, а, наоборот, из отмывки. Предлагаемый метод позволяет получать изолированные тонкие нити с хорошо воспроизводимым белковым составом и высоким выходом: 17-23 мг на 1 г мышцы. Тогда как существующие на сегодняшний день методы позволяют получать 2-2.5 мг/г тонких нитей из гладких мышц позвоночных (Marston, Smith, 1984) и 0.7-2.5 мг/г в случае гладких мышц моллюсков (Bennett, Marston, 1990).

1.2. Белковый состав тонких нитей мидии

К основным компонентам получаемых нами тонких нитей относятся полипептиды актина с молекулярной массой 42 кДа, тропомиозина с молекулярной массой 33 кДа и актин-связывающего белка (actin binding protein) с молекулярной массой 40 кДа (АВР-40) (Рис.1). Остальные полипептиды (около 12-ти) являются минорными и, по данным денситометрии, их количество в сумме не превышает 10%. Эти минорные белки не являются механической примесью в тонких нитях, а входят в их состав, поскольку соосаждаются с тонкими нитями при ультрацентрифугировании (Рис. 1).

При отработке метода выделения тонких нитей из запирательной мышцы мидии мы обнаружили, что содержание компонентов АВР-40 и АВР-34 в тонких нитях непостоянно. Оказалось, что содержание этих полипептидов зависит от температуры осаждения тонких нитей при их получении (рис. 2). При осаждении тонких нитей при 22°C, белки АВР-40 и АВР-34 входят в состав тонких нитей (рис. 2, дорожка 5). При осаждении тонких нитей при 2°C, эти белки остаются в супернатанте (рис. 2, дорожка 2).

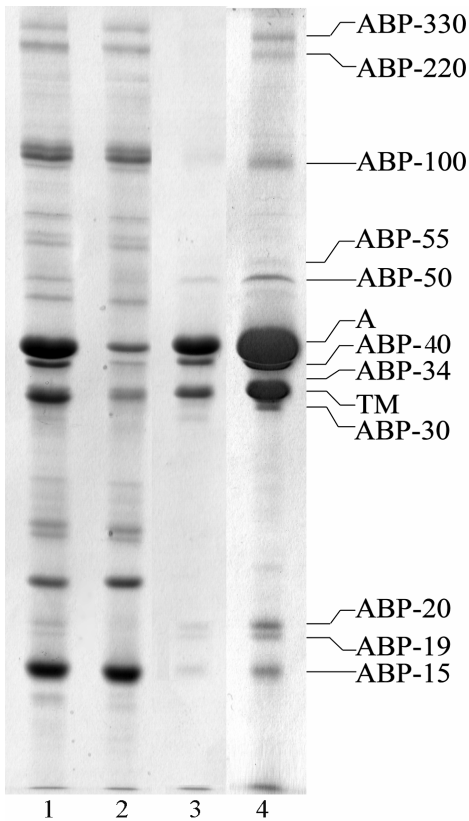


Рис. 1. Ключевые этапы выделения тонких нитей мидии и белковый состав конечного препарата.

Дорожка 1 – экстракт тонких нитей; дорожка 2 – супернатант ультрацентрифугирования экстракта; дорожки 3, 4 – осадок ультрацентрифугирования при 22°C (тонкие нити) при двух нагрузках, 10 и 20 мкл, соответственно.

А, актин, АВР, актин-связывающие белки с указанием их молекулярных масс, кДа; ТМ – тропомиозин (33 кДа).

Мы также проверили влияние состава экстрагирующего раствора, на белковый состав тонких нитей, учитывая уже выявленную температурную зависимость. В экстрагирующем растворе мы варьировали рН, ионную силу и концентрацию АТФ (рис. 3). Данные рис. 3 свидетельствуют о том, что уменьшение рН среды с 7.0 до 6.0 не сказывается на экстракции основных белков тонких нитей - актина и тропомиозина (рис. 3А, дорожки 1-3), но увеличивает содержание белков АВР-40 и АВР-34 в составе тонких нитей даже при температуре осаждения 2°C (рис. 3А, дорожки 4, 6). Уменьшение ионной силы также увеличивает содержание белков АВР-40 и АВР-34 в

составе тонких нитей при температуре осаждения 2°C (рис. 3Б, дорожки 4- 9).

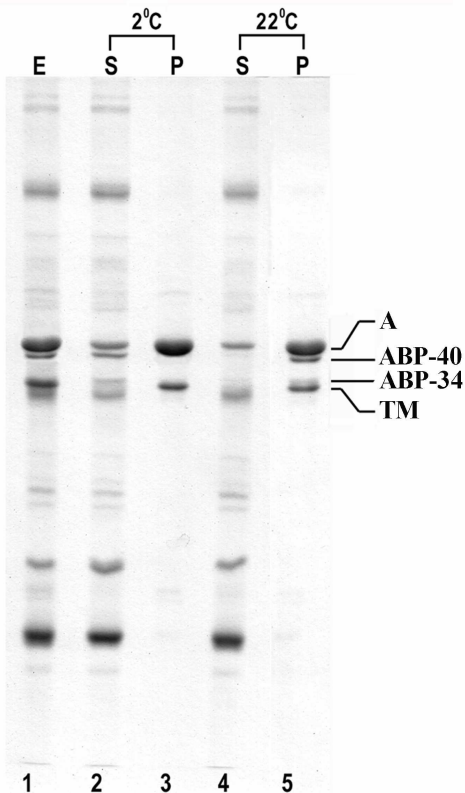


Рис. 2. Влияние температуры ультраосаждения тонких нитей на содержании в них компонентов АВР-40 и АВР-34.

Дорожка 1 – экстракт (Е) тонких нитей; дорожка 2 – супернатант (S) ультрацентрифугирования экстракта при 2°C; дорожка 3 – осадок (P) ультрацентрифугирования экстракта (тонкие нити) при 2°C; дорожка 4 – супернатант (S) ультрацентрифугирования экстракта при 22°C; дорожка 5 - осадок (P) ультрацентрифугирования экстракта (тонкие нити) при 22°C.

А, актин; АВР-34, 40, актин связывающие белки с молекулярной массой 34 и 40 кДа, соответственно; ТМ, тропомиозин.

Таким образом, содержание белков АВР-40 и АВР-34 в составе тонких нитей зависит не только от температуры, но также от рН и ионной силы. В каждом конкретном случае степень связывания этих белков с актином определяется сочетанием этих параметров.

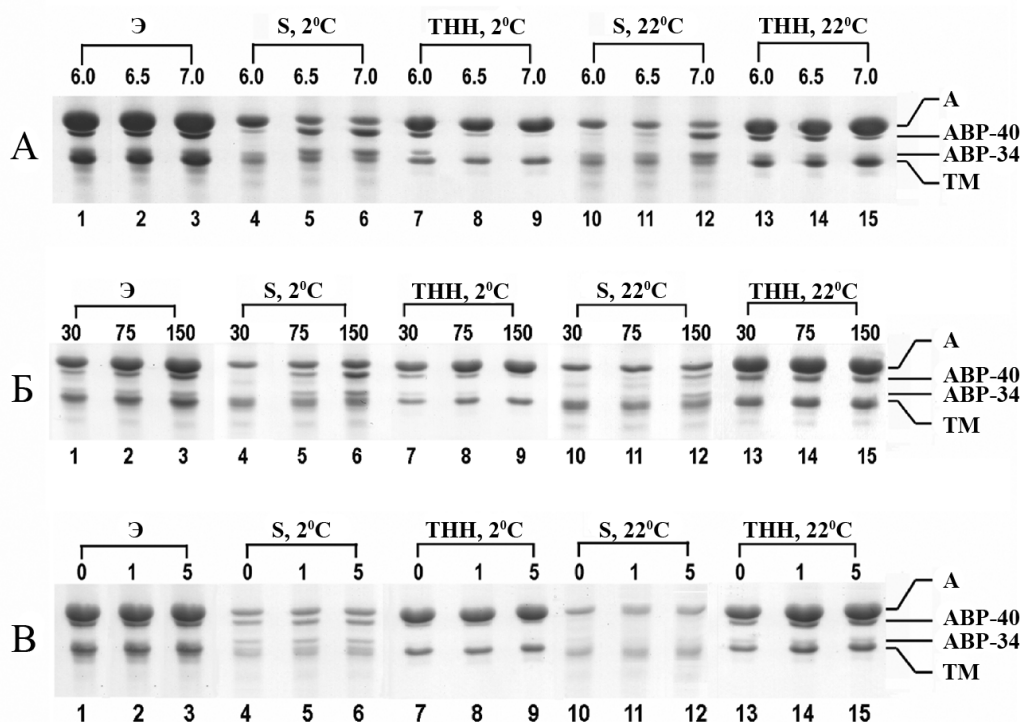


Рис. 3. Влияние состава экстрагирующего раствора – pH, ионной силы и концентрации АТФ на состав белков тонких нитей при двух температурах осаждения.

(А) pH раствора - 6.0, 6.5, 7.0; 75 мМ КСl. (Б) Ионная сила раствора - 30, 75, 150 мМ КСl; pH - 6.5. (В) Концентрация Mg-АТФ - 0, 1, 5 мМ; pH - 6.5; 75 мМ КСl.

Дорожки 1-3, экстракты тонких нитей; дорожки 4-6, супернатанты осаждения тонких нитей при температуре 2°C; дорожки 7-9, тонкие нити осаждённые при 2°C; дорожки 10-12, супернатанты осаждения тонких нитей при 22°C; дорожки 13-15, тонкие нити, осаждённые при 22°C.

А, актин; АВР-40, актин связывающий белок с молекулярной массой 40 кДа; АВР-34, актин связывающий белок с молекулярной массой 34 кДа; ТМ, тропомиозин.

Методом MALDI-TOF MS/MS белки АВР-40 и АВР-34 были идентифицированы, как кальпонин мидии и его изоформа, соответственно (рис. 6). Кроме того, в тонких нитях была идентифицирована минорная изоформа тропомиозина (АВР-50). Для минорных белков АВР-330, АВР-220 и АВР-100 не было найдено гомологичных пептидных последовательностей в существующих базах данных. Однако в составе гладких мышц мидии *Mytilus galloprovincialis* белки с близкими молекулярными весами 270 кДа, 230 кДа и 105 кДа были недавно идентифицированы посредством антител к филамину позвоночных как изоформы филамина (Mendez-Lopez et al., 2012).

1.3. Способность тонких нитей мидии активировать Mg-АТФазную активность миозина

Получаемые нами тонкие нити гладких мышц мидии активируют Mg-АТФазную активность миозина скелетных мышц кролика Ca^{2+} -зависимым образом (рис. 4). Однако степень активирования Mg-АТФазной активности миозина кролика тонкими нитями мидии

низка по сравнению с активированием Ф-актином скелетных мышц кролика и «природным» Ф-актином мидии (рис. 4). Мы предполагаем, что низкая активирующая способность может быть обусловлена наличием ингибирующего компонента в тонких нитях мидии. Однако это ингибирование исчезает после замены миозина кролика на миозин мидии (рис. 5). То есть, в случае синтетического актомиозина, реконструированного только из белков мидии, ингибирующий эффект не наблюдается.

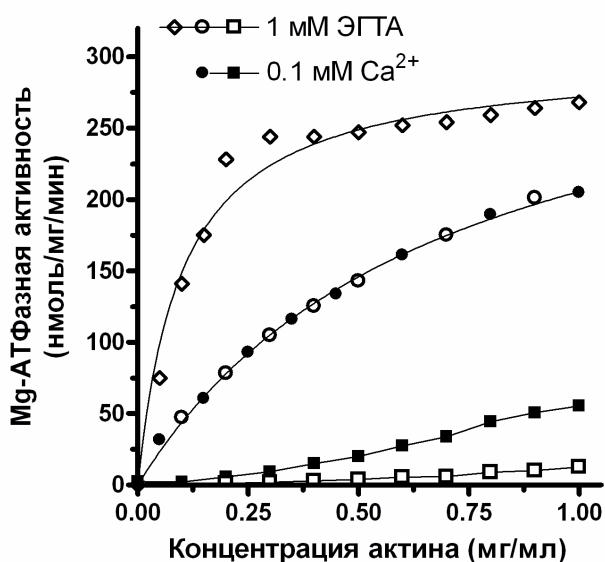


Рис. 4. Сравнение активирования Mg-АТФазной активности миозина скелетных мышц кролика посредством Ф-актина скелетных мышц кролика (◇), «природного» Ф-актина мидии (●;○), и тонких нитей мидии (■;□) в присутствии (●;■) и в отсутствие (○;□) Ca²⁺.

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 20 мМ имидазол-НСl pH 6.5, 0.1 мМ CaCl₂ или 1 мМ ЭГТА; миозин кролика, 0.1 мг/мл.

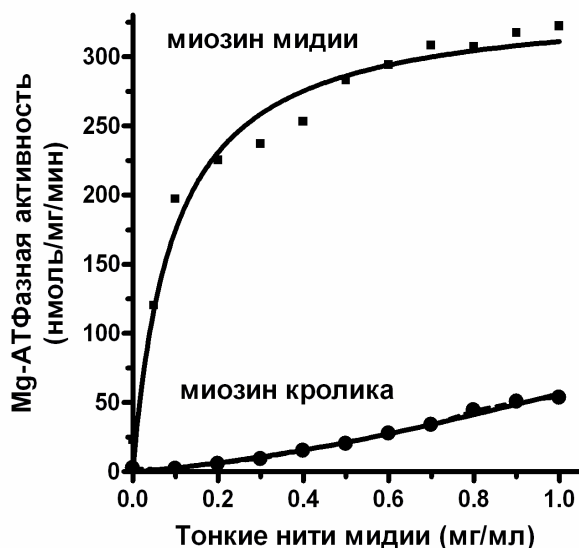


Рис. 5. Активирование тонкими нитями мидии Mg-АТФазной активности миозина скелетных мышц кролика и миозина запирательных мышц мидии.

Условия: 75 мМ КСl; 2 мМ MgCl₂; 20 мМ имидазол-НСl pH 7.2; 0.1 мМ CaCl₂; миозин кролика, 0.1 мг/мл, миозин мидии, 0.1 мг/мл.

2. Идентификация кальпониноподобного белка в тонких нитях мидии

В гладких мышцах позвоночных Ca²⁺-чувствительность тонких нитей обеспечивается кальдесмоном (120-140 кДа), который является третьим по содержанию белком тонких нитей после актина и тропомиозина. Однако, согласно электрофоретическим данным, в составе тонких нитей мидии полипептиды с молекулярной массой, соответствующей кальдесмону не обнаружены (рис. 1 и 2). Более того, неидентифицированные компоненты тонких нитей являются минорными, их количество явно недостаточно для того, чтобы располагаться

регулярным образом вдоль тонких нитей для выполнения регуляторных функций. Исключением является АВР-40, третий по содержанию белок тонких нитей мидии.

Белок АВР-40 был извлечён из 40 кДа зоны ДСН-ПААГ электрофореза изолированных тонких нитей мидии и проанализирован методом MALDI-TOF\MS\MS. Поиск в белковой базе данных Mascot (www.matrixscience.com) выявил 41% гомологию белка АВР-40 к кальпониноподобному белку из мышц мидии *Mytilus galloprovincialis* (45 кДа) (Funabara et al., 2001), который в свою очередь обладает 33% гомологией к кальпониону гладких мышц позвоночных животных (34 кДа). Таким образом, есть основания считать, что белок АВР-40 из тонких нитей запирающей мышцы мидии (*Crenomytilus grayanus*) принадлежит к семейству кальпонинов.

АВР-40 - второй кальпониноподобный белок, обнаруженный в мышцах двусторчатых моллюсков. В отличие от 45 кДа кальпониноподобного белка гладкой мышцы мидии *Mytilus galloprovincialis*, выделенного ранее из целой мышцы (Funabara et al., 2001), АВР-40 был выделен из изолированных тонких нитей и, следовательно, мы можем говорить о его локализации в тонких нитях.

При препаративном выделении белка АВР-40 из изолированных тонких нитей (Добржанская и др., 2010) или из мышечного гомогената посредством тепловой обработки (рис. 7Б, дорожка 5) в его препаратах всегда присутствует примесь белка с молекулярной массой 34 кДа (АВР-34). По результатам анализа MALDI-TOF\MS\MS оказалось, что белок АВР-34 также является кальпониноподобным белком. Гомология АВР-34 с кальпонином позвоночных животных составляет 24% , а с кальпониноподобным белком мидии *Mytilus galloprovincialis* составляет 22%.

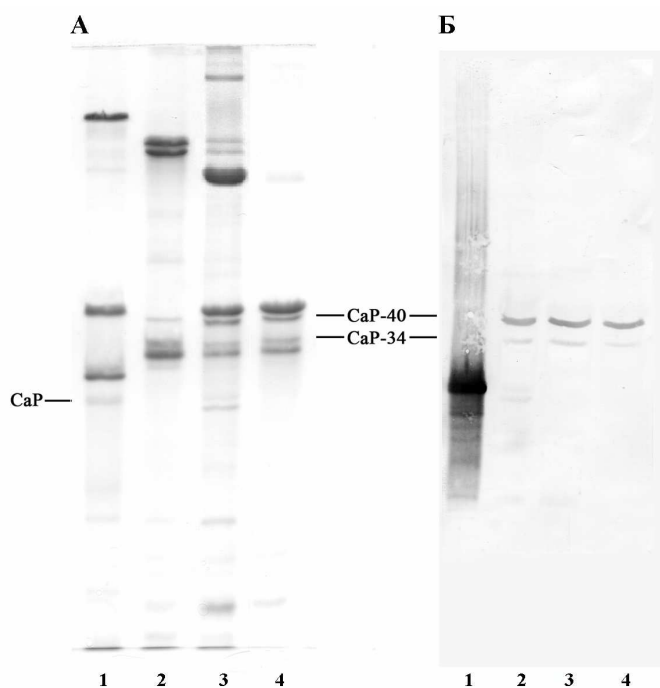


Рис. 6. Идентификация двух изоформ кальпониона в препаратах из запирающих мышц мидии.

(А) ДСН-ПААГ электрофорез. (Б) Вестерн-блоттинг. Дорожка 1, тепловой экстракт из мышц мускульного желудка цыпленка; дорожка 2, тепловой экстракт из запирающих мышц мидии; дорожка 3, гомогенат запирающей мышцы мидии; дорожка 4, тонкие нити запирающих мышц мидии.

CaP, кальпонин гладких мышц цыпленка; CaP-40, кальпонин мидии 40 кДа; CaP-34, кальпонин мидии 34 кДа.

Результаты MALDI-TOF/MS/MS были подтверждены с помощью метода белкового иммуоблота с использованием моноклональных антител к кальпонию позвоночных животных (рис. 6). Антитела к кальпонию позвоночных животных показали положительную кросс-реактивность как к кальпонию из гладких мышц мускульного желудочка цыплёнка, так и к белкам ABP-40 и ABP-34 из гладких мышц мидии (рис. 6).

Таким образом, результаты MALDI-TOF/MS/MS и вестерн-блоттинга свидетельствуют о том, что белки ABP-40 и ABP-34 из гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus* входят в семейство кальпонинов. Мы полагаем, что эти белки являются изоформами кальпонинов заpirательных мышц мидии. Это согласуется с литературными данными о наличии в гладких мышцах позвоночных животных двух изоформ кальпонинов – основной, h-кальпонин и нейтральной, n-кальпонин (Strasser et al., 1993).

3. Поиск кальдесмоноподобного белка в гладких мышцах мидии

Как говорилось выше, в составе тонких нитей мидии нами не были обнаружены полипептиды, которые могли бы претендовать на роль кальдесмоноподобного белка. Это противоречит литературными данными, поскольку во всех тестируемых гладких мышцах позвоночных были обнаружены как кальдесмон, так и кальпонин, а в гладких мышцах некоторых двустворчатых моллюсков был идентифицирован кальдесмон (Bennet, Marston, 1990). Поэтому мы провели тщательный поиск кальдесмона или кальдесмоноподобного белка как в составе Ca^{2+} -чувствительных тонких нитей, так и в составе целой гладкой мышцы мидии.

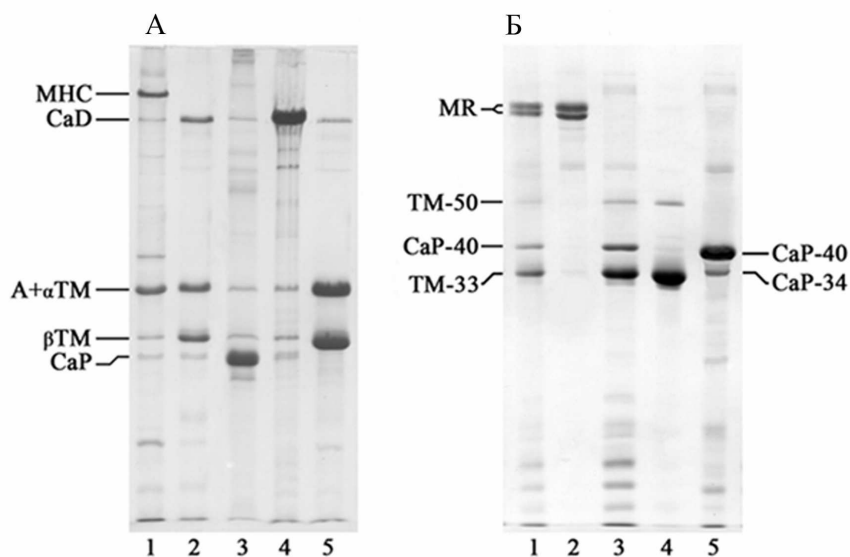


Рис. 7. ДСН-ПААГ электрофорез тепловых экстрактов и их фракций из мышц мускульного желудочка цыплёнка (А) и гладких мышц мидии (Б).

(А) Дорожка 1, гомогенат мышц мускульного желудочка цыплёнка; дорожка 2, тепловой экстракт из мышц мускульного желудочка цыплёнка; дорожки 3-5, сульфатно-аммонийные фракции теплового экстракта: 0-30%, 30-50% и 50-65%, соответственно. (Б) Дорожка 1, тепловой экстракт из гомогената заpirательных мышц мидии; дорожки 2-5, фракции теплового экстракта из гомогената заpirательных мышц мидии: миород-содержащая фракция; кальпонин- и тропомиозин-содержащая фракция, тропомиозин содержащая фракция и кальпонин-содержащая фракция, соответственно.

А, актин; α, β-ТМ, изоформы тропомиозина гладких мышц цыплёнка; ТМ-33 и ТМ-50, изоформы тропомиозина гладких мышц мидии; СаР, кальпонин гладких мышц цыплёнка; СаР-40 и СаР-34, изоформы кальпонинов гладких мышц мидии (числа соответствуют молекулярной массе полипептида); СаД, кальдесмон, МНС; тяжёлые цепи миозина; MR, миород.

Мы использовали сходство в процедурах выделения кальпонины и кальдесмона – оба белка являются термоустойчивыми (Bretscher, 1984; Abe et al., 1990). На рис. 7А показан состав белков мышцы цыплёнка, состав белков теплового экстракта из этой мышцы и фракции, содержащие кальпонин и кальдесмон. На рис. 7Б показан состав белков теплового экстракта из мышцы мидии, и составы фракций этого экстракта. При сопоставлении составов двух тепловых экстрактов видно, во-первых, что в составе экстракта из гладких мышц мидии присутствует специфический белок запирающих мышц моллюсков – миород (рис. 7Б, дорожка 1). Во-вторых, отсутствует полипептид с молекулярной массой кальдесмона. Отметим, что искомая молекулярная масса кальдесмона близка к массе полипептидов миорода – 113 и 106 кДа (Shelud'ko et al., 2002). Однако миород, в отличие от кальдесмона, белок водонерастворимый (рис. 7Б, дорожка 2). Таким образом, ни в тепловом экстракте из гладких мышц мидии, ни во фракциях этого экстракта нет полипептидных цепей, характерных для кальдесмона.

Метод белкового иммуноблотта также не выявил положительную кросс-реактивность моноклональных антител к кальдесмону гладких мышц позвоночных с белками различных препаратов из мышц мидии. В то же время, эти антитела имели положительную кросс-реактивность к кальдесмону гладких мышц цыплёнка (рис. 8).

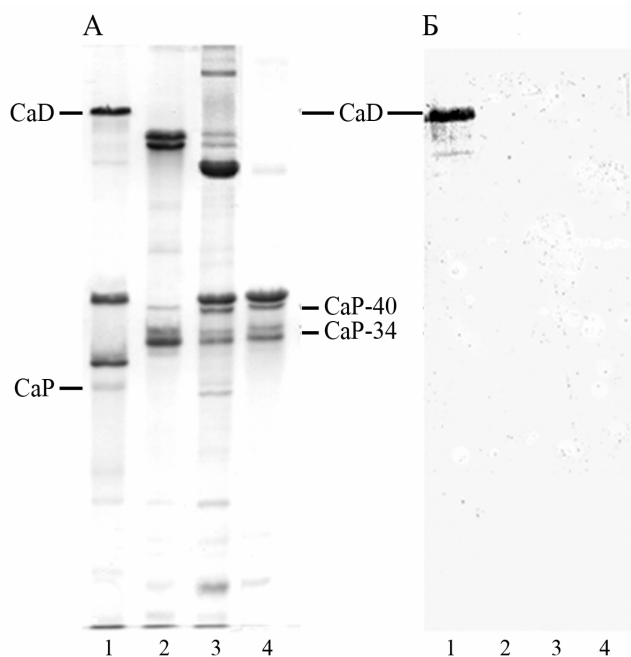


Рис. 8. Вестерн-блоттинг на выявление кальдесмона в препаратах гладких запирающих мышц мидии.

(А) ДСН-ПААГ электрофорез. (Б) Вестерн-блоттинг.

Дорожка 1, тепловой экстракт гладких мышц мускульного желудочка цыплёнка; дорожка 2, тепловой экстракт из гладких мышц мидии; дорожка 3, гомогенат гладких мышц мидии; дорожка 4, тонкие нити мидии.

4. Свойства кальпонины мидии

Белки кальпонинового семейства обладают рядом общих свойств. Они водорастворимы, основны, термостабильны, способны связываться с актином и ингибировать Mg-АТФазную активность актомиозина.

4.1. Взаимодействие кальпонины мидии с Ф-актином

Влияние белков кальпонинового семейства на актин-миозиновое взаимодействие опосредовано их взаимодействием с Ф-актином (Haerberle, 1994; El-Mezgueldi et al., 1995). Методом высокоскоростного соосаждения мы показали, что кальпонин мидии также связывается с «природным» Ф-актином мидии, как в отсутствие, так и в присутствии

тропомиозина мидии (рис. 9). Следовательно, места связывания тропомиозина и кальпонины мидии на актине различны и эти белки не конкурируют между собой за взаимодействие с актином.

Кальпонин мидии также связывается со скелетным Ф-актином кролика, однако сродство кальпонины к этому актину существенно ниже (рис. 10).

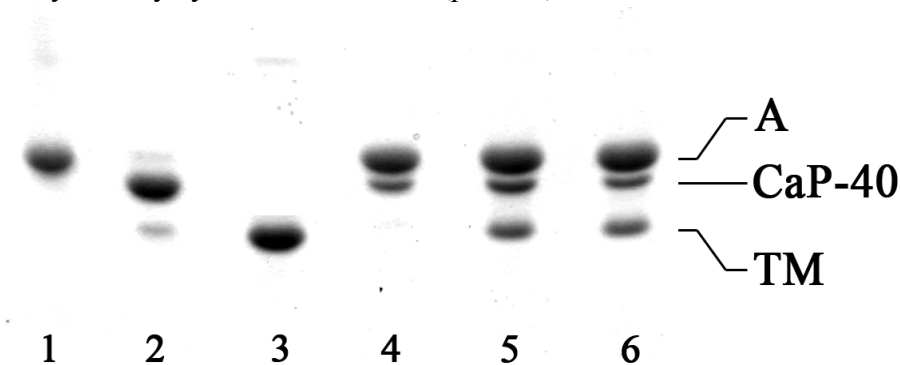


Рис. 9. Связывание кальпонины мидии с «природным» Ф-актином мидии в присутствии и в отсутствие тропомиозина мидии.

Дорожка 1, «природный» Ф-актин мидии; дорожка 2, кальпонин мидии; дорожка 3, тропомиозин мидии; дорожка 4, ультраосадок смеси Ф-актина и кальпонины мидии; дорожка 5, ультраосадок смеси комплекса Ф-актина-кальпонин с тропомиозином; дорожка 6, ультраосадок смеси комплекса Ф-актин-тропомиозин с кальпонином.

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ NaN₃, 20 мМ имидазол-НСl (рН 6.5), 1 мМ ЭГТА; «природный» Ф-актин мидии, 0.1 мг/мл; тропомиозин мидии, 0.3 мг/мл; кальпонин мидии, 0.3 мг/мл. Все препараты, кроме Ф-актина, были предварительно осветлены при 110 000 g, 1.5 часа, ультраосаждение комплексов проводили в тех же условиях, при 22°С.

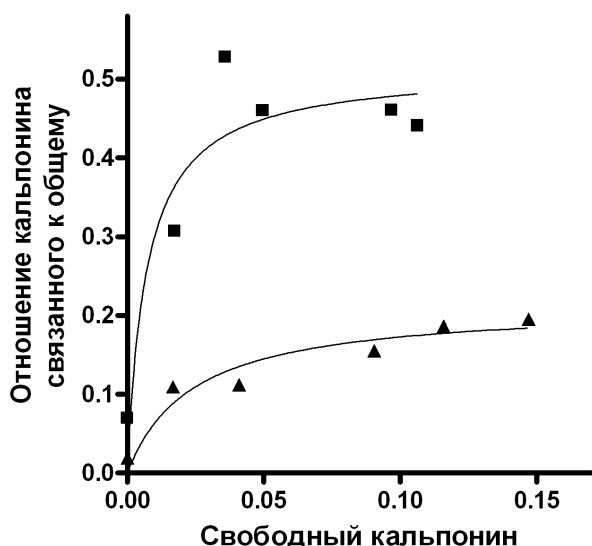


Рис. 10. Связывание кальпонины мидии с Ф-актином кролика (▲) и «природным» Ф-актином мидии (■).

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ NaN₃, 1 мМ ЭГТА, 20 мМ имидазол-НСl (рН 6.5). Ф-актин кролика, 0.1 мг/мл; «природный» Ф-актин мидии, 0.1 мг/мл; кальпонин мидии, 0-0.15 мг/мл.

4.2. Влияние кальпониона мидии на актин-миозиновое взаимодействие

На рис.11 показано ингибирование кальпонином мидии АТФазной активности синтетического актомиозина, реконструированного из миозина кролика и Ф-актина мидии, в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} . Видно, что ингибирование составляет более 80% и не зависит от присутствия Ca^{2+} . Напомним, что в случае тестирования Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей необходим именно скелетно-мышечный миозин, поскольку он не Ca^{2+} -чувствителен, в отличие от миозина гладких мышц. Кроме того, актомиозин для исследования регуляторных белков из разных мышц часто реконструируют из актина и миозина скелетных мышц позвоночных, поскольку их выделение проще и их свойства хорошо изучены. Однако, как следует из данных рис. 4 и 5, свойства гибридных моделей могут зависеть от источника белков, что осложняет использование таких моделей.

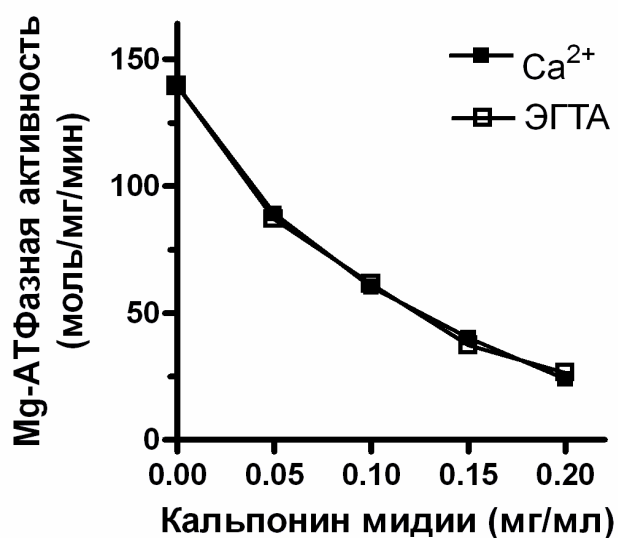


Рис. 11. Ингибирование кальпонином мидии Mg-АТФазной активности синтетического актомиозина, реконструированного из миозина кролика и Ф-актина мидии.

Условия: 30 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM NaN₃, 20 mM имидазол-HCl (pH 6.5), 1 mM ЭГТА или 0.2 mM CaCl₂; миозин кролика, 0.1 мг/мл; Ф-актин кролика, 0.1 мг/мл; 0.3 mM Mg-АТФ.

При тестировании кальпониона мы столкнулись с зависимостью его ингибирующего влияния, как от источника актина, так и источника миозина (рис. 12). Характер зависимости АТФазы миозина

кролика от концентрации кальпониона различен для комплексов, содержащих актин кролика и актин мидии: в последнем случае зависимость значительно сильнее (рис. 12А). Скорее всего, это объясняется большим сродством кальпониона мидии к актину мидии (рис. 10). Интересно, что различия между «кроличьими» и «мидийными» кривыми максимальны при небольших концентрациях кальпониона (что ближе к *in vivo* соотношению кальпонион/актин) и становятся менее выраженными с увеличением концентрации (рис. 12А). По-видимому, несмотря на меньшее сродство кальпониона мидии к актину кролика, избыток кальпониона приводит к связыванию с Ф-актином кролика такого же количества кальпониона, как и в случае Ф-актина мидии. Такая же картина, но менее выраженная, наблюдается и в случае моделей, содержащих миозин мидии (рис. 12Б). В результате замены кроличьего миозина миозином мидии, независимо от источника актина, степень ингибирования Mg-АТФазной активности моделей становится намного ниже (84% и 27%, соответственно). Это выглядит неожиданно, поскольку ингибиторное влияние кальпониона принято считать его главным функциональным свойством и, следовательно, это свойство должно быть лучше выражено в негибридной модели, однако это не так (рис. 12Б).

Зависимость ингибирования от происхождения миозина интересна и с точки зрения механизма этой зависимости. Получается так, что сродство миозина кролика и миозина мидии к

актину (неважно к какому) неодинаково уменьшается в результате посадки кальпониона на актин. Наиболее вероятная причина этого может заключаться в том, что места связывания миозина кролика и миозина мидии на актине различны.

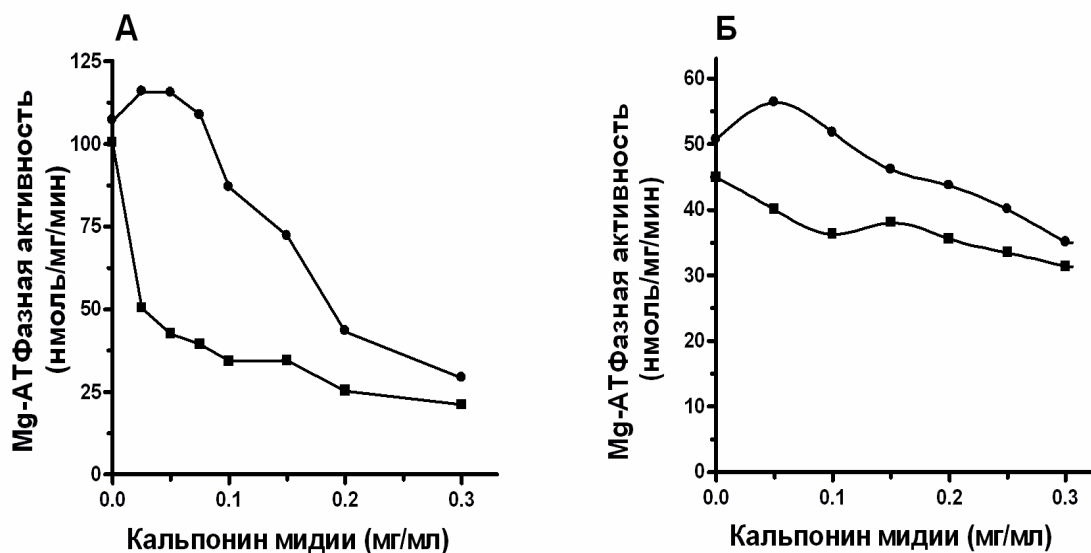


Рис. 12. Сравнение ингибирования кальпонином мидии Mg-ATФазной активности синтетического актомиозина, реконструированного с использованием миозина кролика (А) и миозина мидии (Б) в сочетании с актином кролика (●) и актином мидии (■).

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 0.1 мМ СаCl₂, 20 мМ имидазол-НСl, рН 6.5. Миозин мидии и кролика, 0.1 мг/мл; «природный» Ф-актин мидии и Ф-актин кролика, 0.1 мг/мл; кальпонин мидии, 0-0.3 мг/мл.

Влияние кальпониона мидии на актин-миозиновое взаимодействие было также исследовано с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии скелетно-мышечных теневых волокон. Использовали поляризованную флуоресценцию зондов, связанных с актином (1,5-IAEDANS и FITC-фаллоидин), S1 миозина (1,5-IAEDANS) и кальпонином мидии (акрилодан). Флуоресцентные зонды жёстко связаны с белками мышечного волокна и ориентированы в пространстве в соответствии с расположением белков. Изменение поляризованной флуоресценции при различных воздействиях на волокно свидетельствует о влиянии этих воздействий на конформацию белков, содержащих зонд.

Показано, что введение кальпониона мидии в теневое мышечное волокно приводит к заметным изменениям положения миозиновых головок (S1) на различных стадиях АТФазного цикла, которые моделировались отсутствием или присутствием нуклеотидов – Mg-АДФ и Mg-АТФ. Кальпонин во всех случаях уменьшает параметр $P_{||}$, т.е. увеличивает относительное количество слабых связей головок миозина с актином. Таким образом, кальпонин мидии ингибирует формирование сильных форм связывания между субфрагментом-1 головки миозина и актином, переводя их в более слабую форму связывания. Видимо, именно этот механизм лежит в основе ингибирования кальпонином АТФазной активности актомиозина. Полученные данные согласуются с литературными данными по кальпониону из гладких мышц позвоночных животных (Borovikov et al., 1996; El-Mezgueldi, Marston, 1996).

4.3. Кальпонин и Ca^{2+} -регуляция тонких нитей мидии

Нативные тонкие нити гладких мышц мидии обладают Ca^{2+} -регуляцией, но не содержат кальдесмон, который является общепризнанным Ca^{2+} -регуляторным белком тонких нитей гладких мышц позвоночных. На начальных этапах исследования природы Ca^{2+} -регуляции тонких нитей гладких мышц позвоночных животных на роль регулятора в равной степени претендовали и кальдесмон и кальпонин, но предпочтение было отдано кальдесмону, поскольку *in vitro* этот белок оказывал более выраженное регуляторное воздействие на реконструированные тонкие нити (Winder et al., 1993; Ansari et al., 2008). Так как в регулируемых тонких нитях мидии кальдесмона нет, то имеет смысл вновь вернуться к предположению о кальпонине как о Ca^{2+} -регуляторном белке тонких нитей мидии.

Хотя мы и не обнаружили какой-либо Ca^{2+} -зависимости при взаимодействии очищенного кальпониона с синтетическим актомиозином (рис. 11), нельзя исключить того, что кальпонин является лишь одним из компонентов Ca^{2+} -регуляторной системы, другие компоненты которой теряются при очистке. Для проверки этого предположения мы воспользовались возможностью избирательного удаления кальпониона из тонких нитей при понижении температуры (рис. 2).

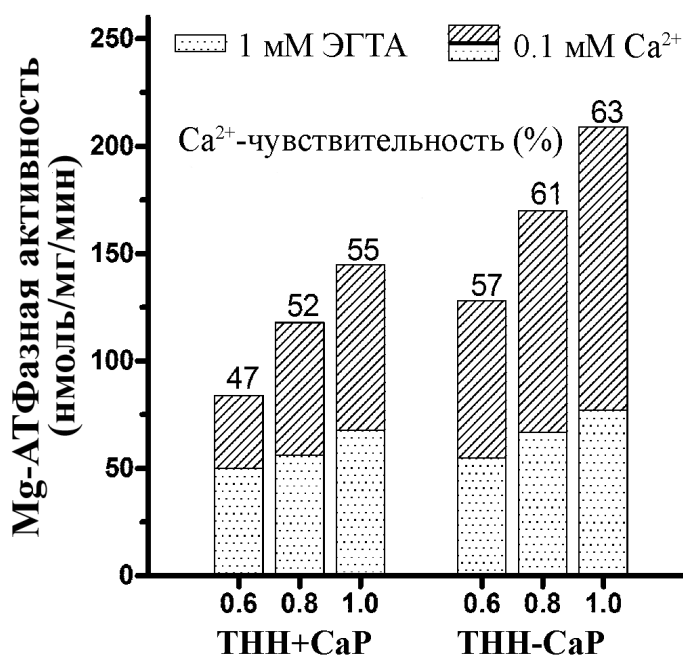


Рис. 13. АТФазная активность и степень Ca^{2+} -регуляции комплекса миозина кролика и тонких нитей мидии, содержащих и не содержащих кальпонин.

Условия: 30 мМ КСl, 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ NaN_3 , 20 мМ имидазол-НСl (рН 6.5), 1 мМ ЭГТА или 0.2 мМ CaCl_2 ; миозин кролика, 0.1 мг/мл; тонкие нити, 0.6-1.0 мг/мл.

Мы сравнили Ca^{2+} -зависимость АТФазной активности актомиозина, реконструированного с нативными тонкими нитями и с тонкими нитями, из которых кальпонин был избирательно удалён. Оказалось, что удаление кальпониона практически не сказывается на Ca^{2+} -

регуляции (рис. 13). Имеет место только различие в уровне АТФазной активности: комплексы с тонкими нитями, содержащими кальпонин, обладают более низкой АТФазной активностью по сравнению с комплексами без кальпониона. Очевидно, что это связано с ингибирующим действием кальпониона мидии на АТФазную активность, как это было показано ранее на синтетических моделях (рис. 11 и 13). Таким образом, можно утверждать, что Ca^{2+} -регуляция тонких нитей мидии не связана с кальпоном.

4.4. Влияние кальпониона мидии на взаимодействие актиновых нитей

Взаимодействие кальпониона с актиновыми нитями может приводить к их латеральной агрегации. Многие поликатионы вызывают образование пучков актиновых нитей, в основе которого лежит нейтрализация отрицательных зарядов на актиновых нитях (Tang, Janmey,

1996). Кальпонин мидии обладает сильно выраженной способностью осаждать актиновые нити (рис. 14). В экспериментах использовался «природный» Ф-актин мидии, который осаждается высокоскоростным центрифугированием, но не осаждается, как кальпонин, при низкоскоростном центрифугировании. Однако смешивание этих белков приводит к их появлению в низкоскоростном осадке и его количество увеличивается по мере увеличения содержания кальпониона.

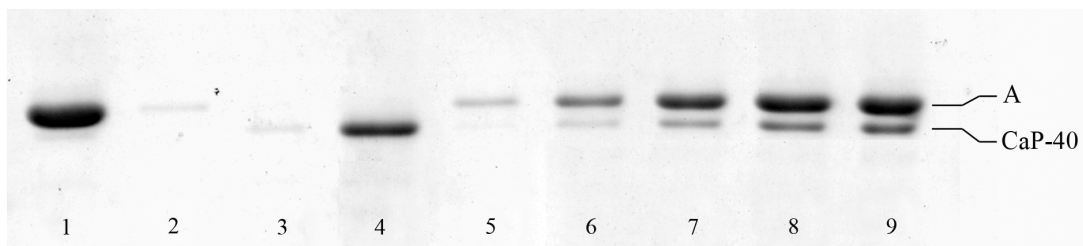


Рис. 14. Влияние кальпониона мидии на осаждение «природного» Ф-актина мидии при низкоскоростном центрифугировании.

Дорожка 1, супернатант низкоскоростного осаждения «природного» Ф-актина; дорожка 2, осадок низкоскоростного осаждения «природного» Ф-актина; дорожка 3, осадок низкоскоростного осаждения кальпониона мидии; дорожка 4, супернатант низкоскоростного осаждения кальпониона мидии; дорожки 5-9, осадки низкоскоростного осаждения смесей «природного» Ф-актина с кальпониона мидии с содержанием кальпониона 0.1 мг/мл, 0.3 мг/мл, 0.6 мг/мл, 1 мг/мл и 1.3 мг/мл, соответственно.

Условия: 75 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ NaN₃, 20 мМ имидазол-HCl (pH 6.5), 1 мМ ЭГТА; «природный» Ф-актина мидии, 1 мг/мл; кальпонин мидии 0.1-1.3 мг/мл. Белковые смеси осаждались при 40 000 g в течение 20 минут при 25°C.

Предполагается, что *in vivo* латеральная агрегации кальпонином цитоплазматического актина может приводить к увеличению жёсткости цитоскелета клетки (Jensen et al., 2012). Мы исследовали влияние основных компонентов тонких нитей мидии – тропомиозина и кальпониона - на вязкость «природного» Ф-актина мидии (Рис. 15). Оказалось, что очень низкая вязкость «природного» Ф-актина мидии возрастает при добавлении тропомиозина мидии на порядок. Последующее добавление к этому комплексу кальпониона мидии, наоборот, снижает вязкость комплекса в четыре раза. Видимо, последний эффект указывает на образование латеральных агрегатов нитей актина. Асимметрия таких агрегатов меньше, чем отдельных тонких нитей, что и определяет уменьшение вязкости при добавлении кальпониона. Следует отметить, что сильное влияние кальпониона мидии на вязкость актиновых нитей наблюдается только в присутствии тропомиозина, обязательного компонента тонких нитей. В случае его отсутствия кальпонин не оказывает влияния на вязкость Ф-актина (Рис. 15).

4.5. Возможная функция кальпониона в запирающих мышцах

Роль кальпониона в гладких мышцах и в немышечных клетках остаётся неясной. Поскольку впервые кальпонин был обнаружен в составе гладких мышц, длительное время считалось, что он принимает участие в регуляции сокращения гладких мышц (Winder, Walsh, 1996). Затем было показано, что кальпонин также принимает участие во внутриклеточной сигнализации (Leinweber, 1999) и стабилизации актинового цитоскелета в мышечных и

немышечных клетках (Rozenblum, Gimona, 2008). Предполагается, что кальпонин может участвовать в регуляции цитоскелета посредством сшивания нитей актина, тем самым, создавая жёсткую конструкцию (Jensen et al., 2012).

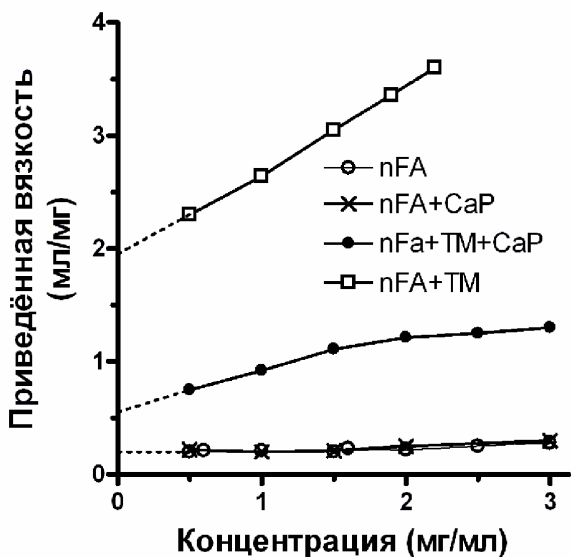


Рис. 15. Приведённая вязкость комплексов «природного» Ф-актина мидии (nFA) с кальпонином мидии (nFA+CaP), тропомиозином мидии (nFA+TM) и кальпонином с тропомиозином (nFA+TM+CaP).

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ NaN₃, 20 мМ имидазол-НСl (рН 6.5), 1 мМ ЭГТА; «природный» Ф-актин мидии, 0-3 мг/мл; весовое соотношение белков в комплексах и синтетических тонких нитях, nFA : TM : CaP 1 : 0.3 : 0.5.

Полученные нами результаты низкоскоростного центрифугирования и вискозиметрии комплексов «природного» Ф-актина и кальпонины мидии в присутствии и в отсутствие тропомиозина (Рис. 14 и 15) свидетельствуют о том, что взаимодействие кальпонины мидии с комплексом Ф-актин-тропомиозин приводит к значительным изменениям механических свойств актиновых нитей. Мы предполагаем, что такого типа изменения могут быть вовлечены в механизм запирающего тонуса мышц двустворчатых моллюсков.

ВЫВОДЫ

1. В составе изолированных тонких нитей гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus* обнаружен белок с молекулярной массой 40 кДа, который идентифицирован как кальпониноподобный белок (кальпонин мидии).
2. Присутствие кальпонины мидии в тонких нитях зависит от условий среды: понижение температуры или повышение ионной силы и рН раствора вызывает диссоциацию кальпонины при сохранении всех остальных компонентов тонких нитей и сохранении Ca²⁺-регуляции тонких нитей.
3. Свойства кальпонины мидии качественно такие же, как и кальпонины гладких мышц позвоночных. Однако степень влияния кальпонины мидии на актин-миозиновое взаимодействие зависит от происхождения актина и миозина.
4. Вопреки литературным данным, мы не обнаружили кальдесмон в гладких мышцах мидии.
5. Предполагается, что кальпонин гладких мышц двустворчатых моллюсков принимает участие в запирающем тонусе в качестве регуляторного белка актинового цитоскелета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования:

1. **Добржанская А.В.**, Матусовская Г.Г., Матусовский О.С., Шелудько Н.С. Тонкие нити запираательных мышц двустворчатых моллюсков могут содержать кальпонин-подобный белок // *Биофизика*. 2010. Т. 55, № 5. С. 785-789.
2. Сиренко В.В., Симонян А.О., **Добржанская А.В.**, Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. 40 кДа-белок тонких нитей мидии ингибирует формирование сильных форм связывания миозина с актином в цикле гидролиза АТФ // *Биохимия*. 2012. Т. 77, № 8. С. 1080-1088.
3. Сиренко В.В., Симонян А.О., **Добржанская А.В.**, Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. 40 кДа белок тонких нитей мидии изменяет конформацию Ф-актина в АТРазном цикле // *Биохимия*. 2013. Т. 78, №. 3. С. 364 – 374.
4. **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 // *Journal of Muscle Research and Cell. Motility*. 2013. Vol. 34, № 1. P. 23-33.

Публикации в материалах конференций:

1. **Добржанская А.В.**, Пермякова Т.В., Матусовская Г.Г., Реваковская А.Г., Шелудько Н.С. Запираательные мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* обладают двойной Ca^{2+} -регуляцией // Конференция студентов, аспирантов и молодых учёных НОЦ ДВГУ «Морская биота», Владивосток, Россия, 28 апреля, 2006: сборник тезисов. Владивосток: Издательство Дальневосточного университета. 2006. С. 38-39.
2. **Dobrzhanskaya A.V.**, Permyakova T.V., Matusovskaya G.G., Matusovsky O.S., Revakovskaya A.G., Shelud'ko N.S. Thin filaments from molluscan smooth muscle of the mussel *Crenomytilus grayanus* are Ca^{2+} -sensitive // International symposium "Biological motility: basic research and practice", Pushchino, Russia, May 11-15, 2006: abstracts of International symposium. Пушино: Пушинский издательский центр РАН, 2006. С. 20-22.
3. **Добржанская А.В.**, Матусовская Г.Г., Матусовский О.С., Реваковская А.Г., Шелудько Н.С. Выделение, идентификация и свойства кальпонин-подобного белка запираательной мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* // XII всероссийская молодёжная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, Россия, 7-14 сентября, 2009: сборник тезисов. Владивосток: ДВО РАН, 2009. С. 21.
4. **Dobrzhanskaya A.V.**, Matusovskaya G.G., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. The thin filaments of molluscan smooth muscles contains a calponin-like protein // International symposium "Biological motility: from fundamental achievements to nanotechnologies", Pushchino, Russia, May 11-16, 2010: abstracts of International symposium. Пушино: Пушинский издательский центр РАН, 2010. С. 75-76.
5. **Dobrzhanskaya A.V.**, Matusovskaya G.G., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. The thin filaments from molluscan smooth "catch" muscle possess an unknown calcium regulation // The 3rd Asia pacific protein association conference in conjunction with the 3rd Symposium of the Chinese protein society "Protein and Beyond", Shanghai, China, May 6-9, 2011: abstracts of conference. Shanghai: Shanghai University, 2011. P. 174.
6. Sirenko V.V., Simonyn A.A., **Dobrzhanskaya A.V.**, Shelud'ko N.S., Borovikov Y.S. Calponin-like protein inhibits the rotation of SH1 myosin and actin subdomain-1 and alters

their mobility during the ATP hydrolysis cycle // 40th European muscle conference, Berlin, Germany, September 14-18, 2011: abstracts of conference. Berlin: Springer Publishing, 2011. P. 73.

7. **Dobrzhanskaya A.V.**, Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. Smooth muscle from mussel *Crenomytilus grayanus* does not contain caldesmon // International symposium "Biological motility: fundamental and applied science", Pushchino, Russia, May 9-14, 2012: abstracts of International symposium. Пушино: Пушинский издательский центр РАН, 2012. С. 48.
8. Симонян А.О., Крутецкая З.И., **Добржанская А.В.**, Шелудько Н.С., Сиренко В.В., Боровиков Ю.С. Новый белок из тонких нитей запирательной мышцы Мидии Грея // 16 Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология наука XXI века», Пушино, Россия, 30 июля – 3 августа, 2012 года: сборник тезисов. Пушинский издательский центр РАН, 2012. С. 74.

Добржанская Анна Валерьевна

**СОСТАВ И СВОЙСТВА ТОНКИХ НИТЕЙ ЗАПИРАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ МИДИИ
CRENOMYTILUS GRAYANUS**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 15.11.2013г.

Формат 60x84 1/16. Усл. п. л. 3,08. Тираж 100 экз.

Заказ 637

Отпечатано в дирекции публикационной деятельности ДВФУ
690990, г. Владивосток, ул. Пушкинская 10