

**Российская академия наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения РАН**

УДК 577.3532

На правах рукописи

Никитина Лариса Валерьевна

**ВКЛАД НЕОДНОРОДНОСТИ БЕЛКОВ САРКОМЕРА В
СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ МИОКАРДА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЮ**

03.03.01 - физиология

диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
д.б.н. С.Ю. Бершицкий

Екатеринбург – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Неоднородность сердца на тканевом и молекулярном уровне.....	16
1.2. Структура и свойства сердечного миозина.....	23
1.3. Кальциевая регуляция сокращений сердечной мышцы и методы ее исследования.....	34
1.4. Регуляторная функция тропомиозина	56
1.5. Сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С): структура, свойства и регуляторная функция.....	61
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	67
2.1. Получение мышечных белков.....	67
2.2. Оценка чистоты полученных белков с помощью гель-электрофореза.....	73
2.3. Определение концентрации белков.....	74
2.4. Реконструкция регулируемого тонкого филамента.....	75
2.5. Определение АТФазной активности миозина.....	75
2.6. Метод оптической ловушки.....	78
2.7. Метод искусственной подвижной системы.....	83
2.8. Метод искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом.....	86
2.9. Статистическая обработка.....	90
Глава 3. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИЗОФОРМ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА.....	92
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДА ИЗОФОРМ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА В АКТИВАЦИЮ ТОНКОГО ФИЛАМЕНТА.....	104
Глава 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА.....	132
5.1. Тропомиозин.....	132
5.2. Сердечный миозин-связывающий белок С.....	141

Заключение.....	156
Выводы.....	170
Список сокращений.....	172
Таблица названий и обозначений аминокислот.....	173
Список литературы.....	174

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что сердце структурно и функционально неоднородный орган, а эффективность его основной, насосной, функции достигается скоординированным взаимодействием сокращающихся клеток – кардиомиоцитов. Это даёт основание считать, что целесообразно организованная неоднородность в сердце является необходимым условием для его нормального функционирования [1, 17]. Специфические картины неоднородности миокарда возникают при патологии сердца [1, 12].

В ряде исследований нашего научного коллектива было установлено, что неоднородность механических свойств кардиомиоцитов при их взаимодействии существенно влияет на электро-физиологические характеристики, механическую функцию и кальциевую регуляцию сокращений сердечной мышцы [17, 203]. Неоднородность соотношения изоформ миозина в кардиомиоцитах в трансмуральном направлении в стенке желудочка является одной из физиологических причин механической неоднородности взаимодействующих кардиомиоцитов.

Таким образом, молекулярная неоднородность порождает механическую неоднородность макроуровня, и для понимания механизмов механической неоднородности сердечной мышцы необходимо изучать неоднородность сократительной структуры кардиомиоцитов на молекулярном уровне.

В сердце млекопитающих экспрессируется два типа тяжелых цепей миозина (ТЦМ): α и β [152]. В миокарде желудочка вместе с желудочковой изоформой легких цепей они образуют два основных изомиозина: V1 и V3. Изоформа сердечного миозина V1 является гомодимером, состоящим из $\alpha\alpha$ -тяжелых цепей, а изоформа миозина V3 – гомодимером $\beta\beta$ -тяжелых цепей. По аминокислотной последовательности V1 и V3 изомиозины идентичны на 93 % [207]. Неидентичные 7% аминокислотных остатков, расположенные в актин-связывающем домене, АТФазном кармане и конверторном домене

головки миозина определяют различия в функциональных характеристиках этих двух изоформ сердечного миозина [207, 27, 91, 260, 60, 217, 192].

Было обнаружено, что актин-активируемая АТФазная активность изомиозина V1 в 2-3 раза выше, чем у V3 и это соотношение справедливо для всех видов экспериментальных животных [60]. Такое же соотношение относится и к скорости движения актиновой нити в подвижных системах *in vitro*: изомиозин V1 в 2-3 раза быстрее передвигает актин, чем V3 [60, 192]. Различия же в средней изометрической силе изоформ зависят от вида животного: изомиозин V3 кролика или свиньи развивает силу в 2 раза больше, чем V1, а у крыс и мышей сила, развиваемая этими изоформами, одинакова. Методом оптической ловушки было обнаружено, что изоформы сердечного миозина обладают одинаковыми механическими характеристиками (величина шага и средней силы головки миозина), но различаются кинетическими параметрами, то есть, длительностью взаимодействия сократительных белков в цикле работы молекулы миозина [65, 172, 225].

В интактном сердце имеется заметное различие в экспрессии изоформ миозина V1 и V3 в кардиомиоцитах из разных слоев стенки желудочка [61, 105, 148, 155]. Поскольку экспрессия изомиозинов зависит от вида животного, его гормонального статуса [192, 220], а изменения в соотношении изоформ происходят в онтогенезе и при патологиях сердца [219, 294], то вариации в экспрессии изомиозинов могут участвовать в тонкой адаптации сердечной деятельности.

Разные соотношения изомиозинов V1/V3 могут вносить вклад в механическую функцию кардиомиоцитов двумя путями:

- напрямую, т.е. определяя более высокую скорость развития напряжения/укорочения в случае преобладания изоформы V1, что является установленным экспериментальным фактом [48, 229];

- опосредованно, через модуляцию регуляторных механизмов активации тонкой нити.

Известно, что поступающий в цитозоль кальций связываясь с тропонином С, регуляторным белком, через ряд конформационных изменений в тропониновом комплексе и тропомиозине открывает места на актиновой нити для присоединения миозиновых головок, т.е. образования поперечных мостиков (Хb). Чем больше кальция поступает в клетку, тем больше образуется кальций-тропониновых комплексов (CaTnC) и, следовательно, силогенерирующих поперечных мостиков. В свою очередь, поперечные мостики сами вызывают конформацию регуляторной единицы, состоящей из семи молекул актина, тропонинового комплекса и тропомиозина (A7TnTm) и поэтому влияют на кинетические константы образования/распада кальций-тропониновых комплексов: чем больше поперечных мостиков образовалось вдоль актиновой нити, тем выше сродство тропонина С к кальцию. Это составляет суть кооперативного влияния поперечных мостиков на кинетику образования/распада кальций-тропониновых комплексов [134]. В литературе это эффект называется кооперативностью Хb-CaTnC. Кооперативность Хb-CaTnC реализует обратную связь между кинетикой кальций-тропониновых комплексов и кинетикой поперечных мостиков. Если прямая связь состоит в том, что образование кальций-тропониновых комплексов активирует актин-миозиновое взаимодействие (образование поперечных мостиков), то суть обратной связи в том, что поперечные мостики модулируют процессы связывания/распада кальций-тропониновых комплексов.

Мы предполагаем, что разные изоформы сердечного миозина могут по-разному модулировать эти обратные связи. Эта гипотеза является одним из ключевых элементов данного исследования и ее экспериментальная проверка – одна из центральных задач работы.

Поскольку кооперативность Хb-CaTnC – это механизм, лежащий в основе ряда важнейших феноменов биомеханики сердечной мышцы, связанных с влиянием механических условий сокращений на ее активацию [1, 68], то возможные изменения этой кооперативности в различных

механически взаимодействующих между собой кардиомиоцитах стенки желудочка должны существенно модулировать ход развития напряжения в каждом из них и в стенке в целом. Таким образом, кооперативность Xb-CaTnC может связывать между собой механическую неоднородность миокарда на молекулярном, межклеточном и органном уровнях.

Вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую регуляцию сокращений миокарда традиционно изучается главным образом на препаратах сердечной мышцы и скинированных кардиомиоцитах [86, 101, 113, 160, 246, 287]. Наши исследования с использованием метода искусственной подвижной системы позволяют изучать этот вопрос непосредственно на молекулярном уровне.

Актин-миозиновое взаимодействие – основа мышечного сокращения. Однако в кардиомиоците присутствует целая система структурных и регуляторных белков, которые могут влиять и на сам сократительный акт и на его регуляцию. В частности, возникает вопрос, могут ли эти белки модулировать вклад различных сердечных изомиозинов в кальциевую регуляцию сокращений через кооперативность Xb-CaTnC. В нашей работе мы уделили внимание двум таким белкам – тропомиозину и миозин-связывающему белку С. Роль этих белков активно исследуется в последние годы. Одной из причин этого интереса является то, что согласно недавним исследованиям мутации в генах, кодирующих как α -изоформу тропомиозина, так и сердечную изоформу миозин-связывающего белка С приводят к семейной гипертрофической кардиомиопатии (familial hypertrophic cardiomyopathy, FHC) или дилатационной кардиомиопатии [82, 109, 128]. Возможный вклад остальных структурных и регуляторных белков кардиомиоцита в регуляцию его сократительной активности ожидает своего изучения.

Тропомиозин – белок тонкого филамента саркомера кардиомиоцита, которому принадлежит важная роль в регуляции взаимодействия миозина с актином. Тропомиозин – фибриллярный белок стержнеобразной формы,

состоящий из двух субъединиц. У млекопитающих гены TPM1, TPM2 и TPM3 кодируют соответствующие изоформы α - β - и γ - цепей тропомиозина в поперечнополосатой мышечной ткани. α -Тропомиозин и β -тропомиозин содержатся как в сердечной, так и в скелетной мышечной ткани и содержат по 284 аминокислотных остатка. γ -Тропомиозин входит в состав только медленных скелетных мышечных волокон [247].

Экспрессия изоформ тропомиозина зависит от вида и возраста животного [36, 231]. Наибольшее содержание α -тропомиозина в сердцах взрослых особей крыс и мышей, кроликов и человека. β -тропомиозин экспрессируется главным образом в гистационном периоде в сердцах крыс и мышей. Изменения в экспрессии изоформ также происходят при патологических состояниях сердца. Было показано [165], что увеличение экспрессии β -тропомиозина происходит в сердцах взрослых особей крыс и мышей при гипертрофии, обусловленной перегрузкой давлением. В экспериментах с искусственной сверхэкспрессией β -тропомиозина до 50-60% в сердцах взрослых крыс и мышей найдено, что в них увеличивалась кальциевая чувствительность связи « pCa -сила», падала максимальная скорость расслабления и появлялась диастолическая дисфункция [205]. Дальнейшее увеличение в экспрессии β -тропомиозина до 75-80% приводило к смерти животного вскоре после рождения [36].

Согласно литературным данным, тропомиозин, находясь на актиновом филаменте, регулирует взаимодействие миозина с актином, а также непосредственно влияет на механические характеристики актин-миозинового комплекса [296]. Тропомиозин в отсутствие кальциевой активации тропонина блокирует участки связывания миозина на актиновом филаменте, и в этом заключается его стерический эффект. Известно также, что тропомиозин обладает аллостерическим эффектом [103, 276], влияя на скорость движения тонких филаментов без тропонина, то есть в отсутствие кальциевой регуляции и напрямую модулируя механические характеристики актин-миозинового комплекса на уровне актинового филамента [5, 251, 296].

Поскольку тропомиозин является конформационным посредником в реализации $Xb-CaTnC$ кооперативности, то его изоформы могут влиять на эту кооперативность, и это влияние может оказаться различным для изомиозинов V1 и V3. Исследование этого влияния – следующая задача данной работы.

Другой белок, эффекты которого на актин-миозиновое взаимодействие были исследованы в настоящей работе – это миозин-связывающий белок C (MyBP-C, C-белок) – минорный белок толстого филамента саркомера поперечнополосатых мышц, находящийся в А-диске так называемой C-зоны области перекрытия толстых и тонких нитей саркомера кардиомиоцита [227]. Структура этого белка и его аминокислотная последовательность хорошо известны, показана его структурная роль в толстом филаменте. В ряде работ последних лет установлено, что сердечный миозин-связывающий белок C (сMyBP-C, C-белок) не только является структурным белком, но и принимает участие в регуляции сокращений сердечной мышцы.

Результаты экспериментальных исследований влияния сMyBP-C на регуляцию сокращений трабекул, изолированных из миокарда нокаутных по гену сMyBP-C мышцей, оказались крайне противоречивыми. Так, одни и те же авторы на одной и той же модели нокаутных мышцей в разных работах демонстрируют различное, и даже противоположное влияние сMyBP-C как на кальциевую чувствительность, так и коэффициент кооперативности Хилла связи « pCa -сила» [245, 264]. Результаты исследований преимущественно свидетельствует о том, что отсутствие в мышце сMyBP-C ведёт к увеличению кальциевой чувствительности сокращений и уменьшению коэффициента Хилла кальциевой кривой [158, 186]. В работе Moss с соавторами [264] было также показано влияние сMyBP-C на популяцию поперечных мостиков.

Предполагается, что сMyBP-C модулирует кальциевую чувствительность тонкого филамента [150, 159, 186, 189]. В частности, было показано, что при экстракции из кардиомиоцита до 60-70% сMyBP-C

активное напряжение при субмаксимальной концентрации кальция увеличивалось, наклон связи « pCa -напряжение» уменьшался [150]. Добавление сМуВР-С к кардиомиоциту, из которого он был предварительно экстрагирован, практически восстанавливало как активное напряжение, так и наклон связи « pCa -напряжение».

В исследованиях, проведенных на искусственных подвижных системах, найдено, что добавление как целого сМуВР-С, так и его N-концевых доменов приводит к увеличению кальциевой чувствительности актин-миозинового взаимодействия [52, 102]. Однако на насыщающем кальции присутствие сМуВР-С либо N-концевых доменов уменьшало скорость движения регулируемых тонких нитей как по скелетному миозину, так и по его протеолитическим фрагментам: тяжелому меромиозину и субфрагменту 1 [52, 102]. Все исследования сердечной изоформы белка С, предшествовавшие нашему, были проведены на скелетном миозине или его протеолитических субфрагментах и поэтому было важно изучить его свойства непосредственно на сердечном миозине.

Авторы недавно вышедшей работы [56], используя пептиды сМуВР-С, пытались выяснить механизмы влияния сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие в искусственной подвижной систем и оптической ловушке, но при этом также не рассматривали влияния сМуВР-С в условиях кальциевой регуляции.

В единственной опубликованной до наших исследований работе [58], где в искусственной подвижной системе использовался сердечный миозин вместе с сердечной изоформой МуВР-С, влияние сМуВР-С на регуляцию сокращений не исследовалось. Таким образом, вопрос о влиянии сМуВР-С на регуляцию взаимодействия тонкого филамента с сердечным миозином, и с его изоформами не рассматривался.

Кроме того, полученные на трабекулах данные о влиянии сМуВР-С на регуляцию сократительной активности, с одной стороны, и на количество поперечных мостиков (см. выше), с другой, наводят на мысль о том, что

влияние сМуВР-С на регуляцию связано с механизмом мостиково-тропомиозиновой кооперативности (Хb-СаТnС) и это влияние может быть различно при доминировании той или иной изоформы сердечного миозина (V1 и V3) в кардиомиоците. В таком случае можно предположить, что регуляторное влияние сМуВР-С на сократительную активность зависит от изоформ сердечного миозина. Проверка этой гипотезы также было одной из задач данного исследования.

Основной метод наших исследований – метод искусственной подвижной системы. Он позволяет непосредственно изучать взаимодействие регуляторных и сократительных белков на уровне тонкой нити саркомера, что дает возможность избежать сложностей интерпретации результатов, связанных со свойствами целой мышцы, либо кардиомиоцита. В рамках метода искусственной подвижной системы можно задавать различные концентрации свободного кальция, использовать любые регуляторные и структурные белки кардиомиоцита и регистрировать механические характеристики актин-миозинового комплекса.

Цель работы: исследовать механизмы влияния изоформ миозина, тропомиозина и сердечного миозин-связывающего белка С на сократительную функцию миокарда и ее кальциевую регуляцию.

Задачи исследования

1. Оценить вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия исследуя соотношения « pCa -скорость», « pCa -сила» и «сила-скорость» этих изоформ в искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом.
2. Исследовать влияние изоформ тропомиозина на взаимодействие изоформ сердечного миозина с актином.
3. Исследовать влияние комбинаций изоформ тропомиозина и изоформ сердечного миозина на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия.
4. Исследовать модулирующее влияние сердечного миозин-

связывающего белка С на взаимодействие сердечного миозина как с актином, так и с регулируемым тонким филаментом.

5. Исследовать специфическое влияние сердечного миозин-связывающего белка С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в зависимости от изоформ сердечного миозина.

6. Оценить роль кооперативного влияния поперечных мостиков на сродство кальций-тропониновых комплексов в качестве ключевого молекулярного механизма, реализующего вклад неоднородности сердечного миозина в кальциевую регуляцию сокращений миокарда.

Научная новизна

Впервые на уровне взаимодействующих белков систематически исследовано модулирующее влияние изоформ сердечного миозина на регуляторные механизмы активации тонкой нити. С помощью метода искусственной подвижной системы показано, что тот вклад в сократительную функцию миокарда, который осуществляется изоформами сердечного миозина через кооперативное влияние сильносвязанных поперечных мостиков на кинетику кальций-тропониновых комплексов, различен.

Впервые исследовано модулирующее влияние изоформ тропомиозина как на актин-миозиновое взаимодействие, так и на его регуляцию в сердечной мышце. Показано наличие обоюдного влияния изоформ миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие, а также различное модулирующее воздействие изоформ тропомиозина на выраженность $Xb-CaTnC$ кооперативности с разными изоформами сердечного миозина.

Впервые методом искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом исследовано влияние сердечного миозин-связывающего белка С на зависимость « pCa -скорость» для сердечного миозина кролика и его изоформ. Показано, что С-белок, выступая как регулятор взаимодействия миозина с актином, по-разному воздействует как на кинетические характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, так и на влияние

поперечных мостиков, образованных этими изоформами, на сродство тропонина С к кальцию через механизм Xb-CaTnC кооперативности.

Научная и практическая значимость

Полученные данные свидетельствуют в пользу предложенной автором концепции о вкладе изоформ сердечного миозина в процессы кальциевой активации тонкой нити при сокращении сердечной мышцы. С помощью метода искусственной подвижной системы показано, что влияние изоформ сердечного миозина с разным содержанием тяжелых цепей на сократительную функцию миокарда через механизм Xb-CaTnC кооперативности различно. Это может являться одной из ключевых причин вклада механической неоднородности в сократительную функцию миокарда и ее регуляцию.

Модулирующее влияние изоформ тропомиозина и сердечного миозин-связывающего белка С на процессы кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия в миокарде определяется составом тяжелых цепей изоформ сердечного миозина.

Эти новые данные необходимы для понимания работы сердечной мышцы в норме и ее нарушениях при патологиях сердца, приводящих к изменению состава тяжелых цепей миозина (сахарный диабет, гипер- и гипотиреоз и др.), а также при патологиях, связанных с мутациями в тропомиозине и сердечном миозин-связывающем белке С.

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ зависимостей « pCa -скорость», « pCa -сила» и «сила-скорость» изоформ сердечного миозина в искусственной подвижной системе показал, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов различается для изоформ сердечного миозина V1 и V3.

2. Выявлено обоюдное влияние изоформ сердечного миозина и изоформ тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие. Показано, что различие модулирующего воздействия изоформ тропомиозина на выраженность Xb-CaTnC кооперативности с разными изоформами

сердечного миозина может являться способом тонкой адаптации сердечной деятельности в онтогенезе и при патологии.

3. Полученные на подвижных системах *in vitro* результаты подтверждают регуляторную роль сердечного миозин-связывающего белка С, которая может проявляться в замедлении С-белком кинетики поперечных мостиков сердечного миозина при связи С-белка с актином, и показывают, что С-белок специфически влияет на кальциевую чувствительность и коэффициент Хилла связи « pCa -скорость» в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3, т.е. вносит свой вклад в реализацию кооперативности Xb-CaTnС в сердечной мышце.

Внедрение результатов исследования. Материалы диссертации вошли в учебные программы для студентов ГБОУ ВПО Уральского государственного медицинского университета, ФГАОУ ВПО Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, используются в научных исследованиях при построении математических моделей регуляции сократительной функции миокарда в лаборатории математической физиологии ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Апробация результатов диссертационной работы:

Результаты работы были представлены на международных конференциях «Biological motility: Basic research and practice» (г. Пущино, 2006 г.); «Biological motility: Achievements and Perspectives» (г. Пущино, 2008 г.); «Biological motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies» (г. Пущино, 2010 г.); «Biological motility: Fundamental and Applied Science» (г. Пущино, 2012 г.), «Biological motility: New facts and hypotheses» (г. Пущино, 2014 г.), Joint British-Russian Young Scientists Workshop (Екатеринбург, 2007 г.), на Международном форуме по нанотехнологиям (г. Москва, 2008 г.); на XXXIV, XXXVI и XXXVII «European Muscle Conference» (г. Дебрецен, Венгрия, 2005 г.; г. Стокгольм, Швеция, 2007 г.; г. Амстердам, Нидерланды 2013).

Публикации

Материалы диссертации опубликованы в 40 работах, в том числе 22 – в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук, в соавторстве издана монография.

Личный вклад автора в работу

Автор была организатором и ключевым исполнителем всех этапов исследования. Автором проведен анализ материала, представленного в диссертации и сформулированы выводы.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (301 источник, из них 13 отечественных и 288 зарубежных). Диссертация изложена на 209 страницах, содержит 37 рисунков и 3 таблицы.

Работа была выполнена в лаборатории биологической подвижности Института иммунологии и физиологии УрО РАН при поддержке грантов РФФИ, РФФИ-Урал, Программ фундаментальных исследований Президиума УрО РАН, гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущей школы РФ, грантов ННМИ и ИНТАС. Исследования на оптической ловушке выполнялись в рамках сотрудничества в отделе физической биохимии Национального института медицинских исследований (NIMR MRC, London).

Автор приносит благодарности чл-корр. РАН В.С. Мархасину, д-ру J.E. Molloy (NIMR MRC, London), д.ф.-м.н. Л.Б. Кацнельсону, к.б.н. Г.В. Копыловой, к.б.н. Д.В. Щепкину и Б.Ю. Бершицкому за неоценимую помощь на разных этапах подготовки данной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Неоднородность сердца на многоклеточном уровне. Ее основы на молекулярном уровне.

Известно, что сердце – структурно и функционально неоднородный орган. Механическая неоднородность сердца хорошо установлена как на органном, так и на тканевом (многоклеточном) уровнях организации [28,129, 169, 188].

В частности, было показано, что кардиомиоциты, выделенные из субэпикардальных слоев желудочка крысы и хорька, показывают меньшую диастолическую жесткость по сравнению с субэндокардиальными миоцитами [62]. Это хорошо соотносится с меньшим систолическим напряжением в субэпикарде по сравнению с субэндокардом. Механическая неоднородность затрагивает не только пассивные свойства кардиомиоцитов. Связь «длина саркомера – активное напряжение» значительно больше и немного круче в субэндокардиальных кардиомиоцитах крысы и хорька по сравнению с субэпикардальными [62, 79].

Субэпикардальные миоциты морской свинки имеют более высокую скорость ненагруженного сокращения и расслабления, чем субэндокардиальные [42]. Эта асинхронная активность может быть объяснена региональными различиями в экспрессии изоформ сердечного миозина V1 и V3 [23, 223]. Изомиозин V1 характеризуется более высокой скоростью циклирования поперечных мостиков и поддерживающий более высокую скорость укорочения клетки [215], преобладает в субэпикарде, в то время как в субэндокарде преобладает более медленный изомиозин V3 [23].

Таким образом, механическая неоднородность в сердце наблюдается от молекулярного до органного уровней в норме и при патологии. Это динамическое свойство сердца, которое изменяется во время развития и при патологии. Несмотря на то, что наличие неоднородности в миокарде – твердо установленный факт, ее значение для работы сердца остается не вполне выясненным.

Изучением феномена механической неоднородности сердца на многоклеточном уровне в течение многих последних лет занимается научный коллектив под руководством чл.-корр. РАН В.С. Мархасина [1, 200, 203]. В частности, в моей кандидатской диссертации с помощью метода параллельных мышечных дулетов был исследован вклад механической неоднородности в сократительную функцию миокарда, его способности к расслаблению и совершению внешней работы и выяснены возможные механизмы инотропных, лузитропных и эрготропных эффектов в неоднородном миокарде [1].

Простейшая модель неоднородной системы на многоклеточном уровне – мышечный дулет, т.е. две параллельно расположенные, индивидуально перфузируемые, функционально различающиеся и механически взаимодействующие папиллярные мышцы или трабекулы. Метод позволяет исследовать влияние *взаимодействия* двух неоднородных фрагментов миокарда на их механические характеристики, такие, как зависимости «длина-сила», «сила-скорость», «конечносистолическая длина – характерное время расслабления», т.е. систематически и целенаправленно изучать вклад механической неоднородности в сократительную функцию миокарда. Идея метода проста – сначала регистрируются все возможные механические характеристики каждой из мышц дулета, когда они сокращаются в изоляции, а затем оценивается изменение этих характеристик при сокращении мышц в дулете [1, 8, 13, 200].

Различия в этих характеристиках позволяют оценивать эффект взаимодействия мышц как в контрольных условиях, так и в применявшихся механических, химических и фармакологических вмешательствах, и/или изменениях температуры, и/или изменениях во временной задержке возбуждения между мышцами (временной асинхронизм). При параллельном соединении мышц в изометрическом режиме происходит простое суммирование сил. Механическое взаимодействие имеет место, когда

мышцы укорачиваются под общей нагрузкой. В силу этого было исследовано взаимодействие мышц в изотоническом режиме.

Для анализа возможных внутриклеточных механизмов, ответственных за влияние неоднородности на сократительную активность сердечной мышцы, был использован метод математического моделирования. Математическая модель сократительной активности миокарда в качестве наиболее существенного элемента включает обратные связи между механическими условиями сокращения мышцы (сила, изменение длины мышц, скорость и знак изменения длины) и кальциевой активацией тонкого филамента [1, 196, 200].

В результате исследований мы обнаружили применительно к простейшим неоднородным системам тканевого уровня, что механическая неоднородность способна существенно влиять на инотропные, луситропные и эрготропные свойства сердечной мышцы. Механическая неоднородность в параллельно соединенных мышечных дуплетах приводит к весьма сложному перераспределению напряжений в каждой из мышцы [1, 100, 200]. Установлено также, что такая важная механическая характеристика мышцы, как связь «длина-сила» в общем случае суммируется неаддитивно в мышечных дуплетах, что механическая неоднородность неаддитивно влияет на связь «сила-скорость» на способность миокарда к расслаблению и выполнению внешней работы [1, 200].

Анализ полученных данных показал, что, как правило, под влиянием механической неоднородности изменение механических характеристик мышц дуплета, таких как связи «длина-сила», «сила-скорость», «конечносистолическая длина – характерное время расслабления» имеют противоположно направленный характер: если в одной мышце крутизна связи «длина-сила» увеличивается, то в другой она уменьшается. Изменение связей «сила-скорость» и «конечносистолическая длина – характерное время расслабления» также разнонаправлено. Если неоднородность не слишком велика, т.е. не слишком велики различия во временах достижения максимума

напряжения мышц до их объединения в дуплет, амплитудах, скоростях напряжения и временных задержках возбуждения между мышцами, то изменения механических характеристик могут быть скомпенсированы. Если же неоднородность велика в исходных мышцах или велики временные задержки возбуждения между мышцами, то характеристики дуплета меняются. Это проявляется в отрицательном инотропном, лузитропном и эрготропном эффектах, т.е. при большой степени неоднородности дуплет под данной нагрузкой укорачивается на меньшую величину, способен выполнять меньшую работу и медленнее расслабляется.

Понимание природы общих закономерностей, проявляющихся при любой исходной неоднородности, а именно, разнонаправленного характера изменения механических характеристик мышц при их объединении в дуплет, было получено при исследовании феномена неоднородности на математической модели. В рамках математической модели нам удалось воспроизвести практически все закономерности, полученные в эксперименте. Анализ результатов с использованием математической модели показал, что во всех случаях и при больших, и при умеренных неоднородностях все изменения и в дуплете, и в мышцах объясняются разнонаправленным изменением процесса активации кальцием тонкой нити в мышцах дуплета. В тех случаях, когда в одной из мышц дуплета наблюдается, например, уменьшение крутизны связи «длина-сила» в ее клетках отмечается увеличение количества кальций-тропониновых комплексов и, соответственно, уменьшение уровня свободного внутриклеточного кальция. Напротив, в мышце-партнере наблюдается феномен деактивации и увеличение уровня свободного внутриклеточного кальция [1, 200].

Приведенные данные показывают, что при объединении мышц в дуплет в каждой из них могут наблюдаться весьма сильные отклонения механических характеристик по сравнению с таковыми при работе мышц в изоляции. В то же время в самом дуплете эти изменения бывают существенно демпфированы. Это может служить указанием на то, сколь

важно при анализе механической функции сердца обращать внимание на локальные изменения в стенке камер сердца. В силу внутренних компенсаторных механизмов, о которых говорилось выше, глобальные характеристики насосной и сократительной функции желудочка могут оставаться относительно неизменными в то время как локальные характеристики могут подвергаться сильным изменениям. Такие значительные изменения локальных характеристик могут быть важным патогенетическим фактором, особенно в условиях нарушения микроциркуляции в миокарде.

Важное теоретическое исследование роли механической и биохимической неоднородности миокарда в его механической функции было осуществлено А. Katz [169, 170]. Ввиду тесной корреляции между изоферментным составом кардиомиоцитов, контролирующих сократительный акт, и механическими условиями их функционирования, в этих работах был сделан очень важный вывод: *локальное приспособление механической функции кардиомиоцитов к «местным» механическим условиям в стенке сердца формирует ее глобальную упорядоченную неоднородность. В свою очередь эта глобальная неоднородность обеспечивает весьма однородную механическую функцию сердечной мышцы, оптимизируя ее.* Приспособление кардиомиоцитов к локальным условиям осуществляется специфическим процентным составом изоферментов. Действительно, кардиомиоциты в эндо- и эпикардальных слоях обладают различными биохимическими и электрофизиологическими характеристиками. В них различны доли быстрых и медленных изоформ механоферментов V1 и V3, что делает весьма вероятным различие их механических свойств. Однако все эти характеристики кардиомиоцитов в различных слоях миокарда тонко сбалансированы, обеспечивая эффективную функцию сердечной мышцы как целого.

Из изложенного выше ясно, что роль изоформ миозина в адаптивном поведении кардиомиоцитов должна быть решающей.

Таким образом, было показано, что механическая неоднородность миокарда вносит существенный вклад в его функцию. Неоднородность порождает специфические явления на молекулярном, тканевом и органном уровнях. На каждом из этих уровней организации имеются особые механизмы влияния неоднородности на механику и энергетику сердца. Эти механизмы в целом сердце тонко скоординированы.

Молекулярная неоднородность определяет индивидуальные механические и энергетические отдельных кардиомиоцитов в зависимости от их координат в толще сердечной мышцы. Кластеры клеток, образующие более крупные структурные единицы (фасцикулы или слои), взаимодействуя между собой, глубоко затрагивают аппарат электромеханического сопряжения, а еще большие структуры – сегменты, изменяя свое инотропное состояние, могут модифицировать динамическую геометрию камер сердца. Патология сердца способна на каждом уровне организации изменять характер неоднородности сердечной мышцы, быть одним из важных механизмов нарушения ее функции.

В описанном выше и последующих исследованиях было установлено, что неоднородность механических свойств кардиомиоцитов при их взаимодействии существенно влияет на электрическую и механическую функцию, а также на кальциевую регуляцию сокращений сердечной мышцы [1, 17, 200, 203]. Неоднородность соотношения изоформ сердечного миозина в кардиомиоцитах в трансмуральном направлении в стенке желудочка является одной из физиологических причин механической неоднородности взаимодействующих кардиомиоцитов.

Таким образом, молекулярная неоднородность порождает механическую неоднородность макроуровня. Следовательно, для более глубокого понимания роли механической неоднородности сердечной мышцы необходимо изучать неоднородность сократительной структуры кардиомиоцитов на молекулярном уровне.

1.2. Структура и свойства сердечного миозина

Миозин, сократительный белок поперечнополосатых и гладких мышц – биологический мотор, преобразующий химическую энергию гидролиза АТФ в механическую работу. Миозин - гетерогексамер с молекулярной массой 450-500 кДа и длиной около 1,700 Å, состоящий из двух тяжёлых цепей (200-240 кДа), двух регуляторных (17-21 кДа) и двух существенных лёгких (16-22 кДа) цепей.

Эти шесть полипептидных цепей удерживаются между собой за счёт нековалентных связей и образуют комплекс, называемый мономерным миозином. N-концевая часть тяжёлых цепей миозина формирует глобулярную головку, в которой располагаются актин-связывающий и АТФазный центры, а С-концевая часть сворачивается в асимметричную α -спираль, образуя хвостовую часть молекулы миозина, также называемую «шейкой». На «шейке» находятся лёгкие цепи миозина, выполняющие регуляторную и стабилизирующую функцию при генерации силы головкой миозина.

Изоформы сердечного миозина

В 1977 году австралийский ученый Джозеф Хох (Joseph F.Y. Hoh) впервые разделив в нативном пирофосфатном геле сердечный миозин, выделенный из желудочка крысы, получил три полосы, которые были обозначены и пронумерованы по скорости миграции в геле: V1, V2 и V3. Сердечный миозин, выделенный из предсердия разделился в этом же геле на 2 полосы, названные A1 и A2. Буквы означали принадлежность миозина: V – ventricular (желудочковый), A – atrial (предсердный). Таким образом, были идентифицированы три желудочковые изоформы сердечного миозина V1, V2 и V3 и две предсердные A1 и A2 [152]. Измеренная в геле Ca^{2+} -АТФазная активность желудочковых изоформ сильно различалась и определялась соотношением 6,4 : 3,7 : 1. Также было выявлено, что желудочковые изоформы сердечного миозина различаются составом тяжелых цепей, но не различаются легкими цепями. С помощью пептидного картирования было

показано, что изоформа миозина V1 – гомодимер α -тяжелых цепей миозина, V2 – гомодимер β -тяжелых цепей и также была определена гибридная природа изоформы миозина V2 [233].

Таким образом, в сердце млекопитающих имеется два типа тяжелых цепей миозина (ТЦМ): α и β [152]. Изоформы тяжелых цепей миозина в миокарде желудочка вместе с легкими цепями миозина образуют три вида изомиозинов: V1, V2 и V3 [152]. V1 и V3 – гомодимеры, состоящие из α - или β -тяжелых цепей соответственно, V2 – гетеродимер, состоящий из α - и β -тяжелой цепей. В миокарде предсердий α - и β -тяжёлые цепи миозина вместе с лёгкими цепями атриального типа (ALC1 и ALC2) формируют два вида изомиозинов: A1($\alpha\alpha$) и A2 ($\beta\beta$) [64].

Структурные различия изоформ сердечного миозина

Аминокислотные последовательности изоформ сердечного миозина V1 и V3 большинства исследованных млекопитающих (мышь, крыса, кролик, человек) идентичны на 93 % [207]. Большинство из неидентичных аминокислотных остатков (127 аминокислот из 1938) находятся в следующих частях молекулы миозина: в основании каталитического домена и на стыке с существенной лёгкой цепью (аминокислотные остатки 32-36); у входа в АТФ-связывающий карман и в поверхностной петле 1 (210-214 и 349-351); в поверхностной петле 2, стягивающей актин-связывающую щель (619-641); в области шейки (800-810); и в субфрагменте 2 (1088-1094).

Для выяснения функциональной значимости этих аминокислотных замен были проведены исследования с использованием гибридных и мутантных миозинов. На трансгенных мышах с помощью гибридных миозинов было показано, что поверхностные петли 1 и 2 не отвечают за различие в свойствах изоформ сердечного миозина [29]. Замена же в каталитическом домене сердечного миозина, где гибридный миозин содержал каталитический домен β -цепи миозина, а остальная часть состояла из α -цепи, имела значительные последствия. Такой гибридный миозин

обладал примерно такой же актин-активируемой АТФазной активностью, как и V3 изомиозин, а его кальций-активируемая АТФазная активность была сопоставима с активностью V1. В искусственной подвижной системе гибридный миозин передвигал актиновый филамент со скоростью, не отличающейся от скорости V1. Максимальная изометрическая сила папиллярной мышцы с таким гибридным миозином, не отличалась от мышц, содержащих как V1, так и V3 сердечные изомиозины. Результаты этих исследований показывают, что разница в аминокислотных последовательностях в конверторном, каталитическом доменах и в области рычага между α - и β -тяжёлыми цепями изомиозинов определяет различие в их механических и кинетических характеристиках [86, 207].

В экспериментах с мутантными животными точечные мутации, локализованные в актин-связывающем (R403Q и V606M), нуклеотид-связывающем (R249Q, G256E и R453C) и конверторном доменах (R719Y и R723G) приводили к изменению механических и кинетических свойств миозина [54, 254]. Например, мутация R403Q вызывала увеличение генерации силы миозином, мутация же R453C приводила к обратному эффекту [80].

α - и β -тяжёлые цепи сердечного миозина обладают существенной гомологией среди разных видов экспериментальных животных [207]. Так, последовательности α -тяжёлых цепей миозина крысы, кролика, хомяка и человека идентичны на 95% процентов. Аминокислотная последовательность β -тяжёлых цепей миозина разных животных гомологична на 94%. Например, разница между изомиозинами V1 крысы и кролика всего лишь в восьми аминокислотных остатках, пять из которых находятся в положениях 2, 210, 442, 452, 801 в моторном и актин-связывающем доменах, а три остатка – в области стержня (1092, 1637 и 1681). Эти аминокислотные замены влияют на различие гидролитических и механических свойств данных изомиозинов. Изоформы сердечного миозина V3 кролика и крысы различаются по четырём аминокислотным остаткам в положениях: 424, 573, 1210 и 1368. Два из

четырёх остатков (424 и 573) локализованы в актин-связывающем и нуклеотид-связывающем доменах, соответственно, и могут иметь функциональное значение. Эти аминокислотные замены приводят к тому, что V3 изомиозин крысы имеет большую АТФазную активность и передвигает актиновый филамент с большей скоростью, чем соответствующий изомиозин кролика [207].

Свойства изоформ сердечного миозина

Во множестве экспериментов было показано, что по своим гидролитическим и функциональным характеристикам изоформы сердечного миозина существенно различаются между собой у большинства видов млекопитающих.

Как уже было указано, впервые АТФазная активность изоформ сердечного миозина крысы была измерена в нативном полиакриламидном геле и обнаружено, что V1 изоформа обладает высокой Ca^{2+} -АТФазной активностью, V2 – промежуточной и V3 изоформа миозина – низкой [233]. В дальнейшем в биохимических экспериментах было обнаружено, что актин-активируемая АТФаза изоформы V1 по данным разных авторов в 1.6-3.5 раза выше, чем у V3 [33, 60, 192]. Ca^{2+} -АТФазная активность примерно в 2 раза выше у V1, чем у V3 [23, 33, 207, 257]. K^+ -EDTA-АТФазная активность не различалась для изоформ сердечного миозина [23, 257].

Banerjee и Morkin [32] показали, что актин-активируемая АТФазная активность сердечного миозина из гипертиреоидных кроликов примерно в 1,7 раза выше, чем из эутиреоидных.

Связь между максимальной скоростью укорочения мышцы (V_{\max}) и АТФазной активностью миозина, полученного из данной мышцы, была определена для многих типов мышц [34]. Maughan с соавторами [48] сравнил V_{\max} мышечного пучка из правого желудочка кролика, сердце которого было экспериментально гипертрофировано, и актин-активируемую АТФазную активность миозина этого мышечного пучка с теми же характеристиками мышцы из нормального сердца. В случае гипертрофированного сердца

авторы наблюдали сравнимое уменьшение обоих параметров и заключили, что скорость укорочения отражает скорость циклирования поперечных мостиков миозина.

В работе Schwartz и др. [221] сравнивались максимальные скорости укорочения папиллярной мышцы крысы, содержащей преимущественно изомиозин V1 и папиллярной мышцы с преобладанием изомиозина V3 и было показано, что V_{\max} первой мышцы в 4-5-раз превосходит V_{\max} второй. Для папиллярных мышц кролика это соотношение было около 6 [229]. Хотя вышеприведенные данные указывают на положительную корреляцию, можно заметить, что изменения V_{\max} не обязательно пропорциональны изменениям АТФазной активности. Это может происходить частично из-за влияния на V_{\max} различий в активации и других факторов [249].

С использованием метода искусственной подвижной системы было выявлено, что изоформа V1 передвигает актиновый филамент в два раза быстрее, чем V3 [60, 91, 192, 217, 260]. Следует отметить, что изоформы сердечных миозинов небольших млекопитающих (мышь и крыса) в 1,5-2 раза быстрее передвигают актиновый филамент в искусственной подвижной системе, чем изоформы сердечных миозинов более крупных млекопитающих, таких как кролик, свинья и человек [192].

В литературе нет полного единства мнений о влиянии содержания сердечных изомиозинов на силогенерирующую способность сердечной мышцы. Maughan с соавторами [48] сравнивали максимальные силы, развиваемые химически скинированными волокнами, выделенными из контрольных (V3) и гипертиреозидных (V1) правых желудочков кроликов, и не нашли различий между ними. Сходные результаты были получены с использованием крыс с гипертрофией сердца.

В искусственной подвижной системе было показано, что у небольших животных (мышь, крыса) V1 и V3 изоформы миозина развивают одинаковую силу, тогда как у больших млекопитающих (кролик, свинья) V3 изоформа миозина развивает в два раза большую силу, чем V1 [4, 60, 192, 260].

В экспериментах, исследующих силогенерирующие свойства миофибрилл из желудочков мышей, морских свинок и человека найдено, что миофибриллы мышей с α -ТЦМ развивают такую же силу, как миофибриллы человека с β -ТЦМ [164]. Также было показано, что препараты миокарда, содержащие преимущественно α - или β -сердечный миозин, не различались величиной изометрической силы [114]. Немногочисленные исследования измерения силы миокарда крупных животных показали, что сердечная мышца, содержащая преимущественно β -изоформу, генерирует двойную силу по сравнению с мышцей, содержащей α -ТЦМ [22].

С помощью метода оптической ловушки, позволяющего исследовать характеристики взаимодействия одиночной молекулы миозина с актином, были исследованы механические и кинетические характеристики изоформ сердечного миозина [65, 172]. На уровне изолированных молекул максимальная скорость движения актинового филамента (V_{\max}) определяется как $V_{\max} = d / t_{\text{on}}$, где d – одиночное смещение, создаваемое головкой миозина во время тянущего усилия, а t_{on} – время, в течение которого головка миозина сильно связана с актиновой нитью. Средняя сила (F_{avg}) определяется по следующей формуле: $F_{\text{avg}} = F \times f$, где F – сила, генерируемая одиночной головкой миозина, а f – duty ratio – доля времени от полного АТФазного цикла миозина, во время которого происходит силогенерация поперечным мостиком миозина, т.е. $f = t_{\text{on}} / t_{\text{cycle}}$. В экспериментах на оптической ловушке было найдено, что изоформы сердечных миозинов не различаются параметрами d и F , т.е. параметрами, описывающими механику головки миозина, а различаются кинетическими параметрами t_{on} и F_{avg} : t_{on} для V3 кролика примерно в 1,7 больше, чем для V1 изоформы [172]. Эти параметры и определяют различие в V_{\max} и F_{avg} изоформ сердечных миозинов [65, 172].

Распределение изоформ сердечного миозина V1 и V3 в сердце

Вариабельность соотношения сердечных изомиозинов в сердце теплокровных животных велика. Можно различить две группы животных, у которых различно соотношение изоформ сердечного миозина.

Так, у мелких млекопитающих, таких как мышь и крыса, в миокарде предсердий взрослых особей преобладает α -изоформа тяжелых цепей сердечного миозина. Доля β -изоформы в миокарде предсердий не более 5 % [61]. В миокарде желудочков таких животных также преобладает изомиозин V1, доля V3 не превышает 3-7 % [61].

В миокарде предсердий взрослых особей крупных млекопитающих соотношение α - и β -изоформ либо одинаковое (человек) [218], либо V1 преобладает (кролик) [217]. Миокард желудочков таких животных, в том числе и человека, содержит преимущественно V3 изоформу миозина. Доля изоформы V1 не превышает 10% [218, 284].

На примере небольших животных было показано, что экспрессия сердечных изоформ миозина зависит от возраста, гормонального статуса, а также от перегрузки сердца давлением, возникающим при искусственном стенозе аорты [220].

У мелких животных, таких, как крыса, β -изоформа экспрессируется у плода, а после рождения – α -изоформа. α -Изоформа преобладает у взрослых грызунов, но с возрастом усиливается экспрессия β -изоформы. У крыс в возрасте 2-х месяцев в миокарде левого желудочка доминирует V1 изоформа (70% V1/20% V3), а в возрасте 25 месяцев – V3 изоформа (20% V1/70% V3). С этим изменением экспрессии сердечных изомиозинов ассоциируется снижение сократительной функции миокарда крысы [113]. Необходимо отметить, что данное изменение в экспрессии изоформ миозина происходит в основном в период полового созревания, между 2 и 5 месяцами жизни [61].

У крупных животных в процессе развития экспрессируется преимущественно β -изоформа и ее экспрессия поддерживается в течение жизни. Однако современные исследования показали, что в сердце здорового взрослого человека экспрессируется значительное количество РНК α -изоформы (35 %), которое транслируется в 7 % α -изоформы [219].

У крысы и кролика было показано, что тиреоидный гормон щитовидной железы – трийодтиронин – участвует в регуляции экспрессии

изоформ сердечных миозинов. Под действием трийодтиронина доля V1 изоформы миозина в кардиомиоците увеличивается. При недостатке тиреоидных гормонов в крови блокирующее действие трийодтиронина на экспрессию гена β -цепи миозина снимается, в результате доля V3 формы миозина в кардиомиоците увеличивается [72, 191].

При развитии сахарного диабета у экспериментальных животных (мышь, крыса) изменяется экспрессия изоформ тяжёлых цепей миозина [77, 84]. При любом типе диабета (I и II типа) увеличивается экспрессия β -цепи миозина [75, 77, 84].

С помощью иммунохимического исследования [87] показано наличие обеих изоформ сердечного миозина в одном кардиомиоците одновременно.

В сердце обнаружена региональная неоднородность в распределении изоформ миозина. Так, с помощью моноклональных антител у мыши было выявлено, что клетки, содержащие V3 изоформу миозина, локализованы в основании сердца и вершине папиллярных мышц, а также в перегородке и вершине сердца [252]. Существует трансмуральное распределение изоформ миозина в стенке левого желудочка [61, 105, 148, 155]. С использованием моноклональных антител найдено, что субэпикард взрослого кролика (4 месяца) содержит преимущественно α -изоформу, а субэндокард – β -изоформу тяжёлых цепей миозина [105]. Средняя часть стенки желудочка содержит обе изоформы тяжёлых цепей миозина, при этом были обнаружены соседние группы кардиомиоцитов с разным содержанием изоформ миозина. Кроме того, в одном и том же кардиомиоците могут содержаться разные изоформы миозина. Субэпикард молодых кроликов (1 месяц) содержал преимущественно быструю изоформу миозина, но и в субэндокарде и средней части стенки желудка имелись участки, специфически окрашенные антителами к α -изоформе. Таким образом, в сердце имеется региональная и трансмуральная неоднородность в распределении изоформ миозина, которая меняется в зависимости от возраста животного.

Физиологическая значимость наличия и распределения изоформ миозина в миокарде

Как было указано ранее, в рамках одного интактного сердца существует значительное различие в экспрессии изоформ миозинов V1 и V3 в различных регионах сердца, и в разных слоях стенки желудочка. Экспрессия изоформ сердечного миозина меняется с возрастом и при патологии (гипертрофии, гипо- и гипертиреозе, сахарном диабете).

В физиологических экспериментах было показано, что миофибриллы желудочков сердец мышей, морских свинок и человека развивают примерно одинаковые силы, т.е., преобладающие в миокарде взрослых особей мышей изомиозин V1 обладает такой же силой, как V3 человека [164]. В исследованиях на препаратах миокарда крыс было показано, что максимумы силы препаратов с V1 и V3 не отличаются [75]. Было обнаружено, что сердечные препараты крупных животных, содержащие преимущественно изоформу V3, развивают примерно в два раза большую силу по сравнению с препаратами, в которых преобладала изоформа V1 [22]. Результаты экспериментов, полученные на многоклеточных препаратах сердечной мышцы, соответствуют данным, полученным с помощью метода искусственной подвижной системы на уровне ансамбля молекул.

Исследования экспрессии изоформ сердечного миозина [221] показали, что преимущественная экспрессия V1 у мышей сохраняется в течение всего взрослого периода жизни, в то время как у животных большего размера в течение жизни происходит сдвиг от преобладания V1 к V3. Эта тенденция имеет, вероятно, адаптивное значение. У сердец крупных животных больший объем систолического выброса, чем у мелких животных, и изоформа V3 способна развивать большую силу для обеспечения насосной функции сердца у крупных животных. Организм мыши для поддержания необходимой температуры тела имеет очень высокую скорость метаболизма, в результате частота сердцебиения составляет примерно 600 ударов/мин по сравнению с частотой 70 ударов/мин у человека. Для оптимизации циркуляции крови

мышы необходим быстро сокращающийся миозин с высокой силогенерирующей способностью. Изоформа V1 мышы соответствует этим требованиям, она обеспечивает скорость движения тонкой нити 5-6 мкм/с и силу, эквивалентную таковой V3 кролика [192]. Таким образом, в результате эволюции сердце мышы приспособилось обеспечивать необходимую силу для компенсации малого объема выброса. У более крупных животных V1 изоформа выделена в основном из предсердий, где низкой силы достаточно для меньшей сократительной активности. Таким образом, наличие изоформ миозина в сердце имеет адаптивное значение.

В процессе онтогенеза значительно изменяются гемодинамические условия работы сердца и также значительно – состав изомиозинов кардиомиоцитов предсердий и, особенно, желудочков. Следовательно, не вызывает сомнений то, что пропорции механоферментов отражают приспособление миоцитов к механическим условиям их функционирования. Таким образом, в мышечных волокнах с различным набором изоформ сердечного миозина вследствие самой гетерогенности этих изоформ может возникать специальный молекулярный механизм тонкого приспособления механических и электрических характеристик мышцы к текущим нагрузкам на нее.

Трансмуральные различия в экспрессии изоформ тяжелых цепей сердечного миозина определяют региональную неоднородность механической функции левого желудочка, регулирует генерацию силы в толще стенки желудочка и работу во время систолы [287]. Региональную неоднородность механической функции левого желудочка во время цикла «сокращение-расслабление» определяют несколько факторов: архитектура волокон стенки желудочка, трансмуральная последовательность активации и различия в генерации силы волокнами в толще стенки желудочка. В частности, укорочение волокон эндокарда предшествует укорочению волокон эпикарда, и как было обнаружено, во время изоволюмического сокращения волокна эпикарда вызывают принудительное растяжение

волокон эндокарда, т. е. происходит активация растяжением [237]. Это возможно благодаря тому, что волокна эндокарда и эпикарда образуют противоположно направленные спиральные структуры в толще стенки желудочка [111].

В экспериментах на скинированных препаратах желудочков свиньи [287] установлено, что увеличение экспрессии изомиозина V1 в эпикарде приводит к тому, что развитие силы в волокнах эпикарда ускоряется, и, несмотря на то, что они активируются позже, чем волокна эндокарда, волокна эпикарда и эндокарда во время систолы сокращаются одновременно [184, 214, 285]. Преимущественное наличие в эндокарде изоформы миозина V3 способствует замедлению развития силы, вызванной активацией растяжением, удлинняя продолжительность систолы. Таким образом, различие в трансмуральной экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина в желудочке свиньи способствует синхронизации генерации силы в толще стенки желудочка.

Как и изоволюмическое сокращение, изоволюмическое расслабление в сердце не является пассивным и вовлекает региональную неоднородность сокращения и растяжения волокон [184, 285, 286]. В период изоволюмического расслабления происходит укорочение волокон эндокарда и это приводит к растяжению волокна эпикарда [184, 214, 285, 286]. Это растяжение в процессе изоволюмического расслабления, как предполагают, способствует обращению направления систолического закручивания, которое претерпевает левый желудочек во время систолы, и присасыванию крови желудочком в диастолу, так что диастолическое наполнение усиливается, что ведёт к увеличению выброса крови во время следующей систолы [273]. Следовательно, вызванное растяжением задержанное развитие силы в эндокарде может быть важным модулятором диастолической функции, способствуя в процессе изоволюмического расслабления изменению направления систолического закручивания.

Было показано, что уменьшение экспрессии изомиозина V1 при хронической сердечной недостаточности сопряжено с ослаблением механической функции желудочков [155, 219]. При увеличении экспрессии медленной изоформы V3 в сердце уменьшается потребность в АТФ [252] и возрастает эффективность сокращения [160, 171, 218].

Сдвиг изоформ сердечного миозина при хронической сердечной недостаточности оказывает влияние на экономичность мышечного сокращения, так как мышцы, содержащие медленную изоформу V3, генерируют напряжение более эффективно, чем содержащие быструю изоформу V1 [228]. Несмотря на то, что этот сдвиг изоформ уменьшает сократимость, замедляя цикл поперечного мостика, он увеличивает производительность миокарда, т.е. увеличивает количество работы, произведенной за счёт энергии гидролиза одной молекулы АТФ. Происходит адаптация сердечной деятельности к условиям работы сердца, испытывающего энергетический недостаток [108].

Таким образом, эффективность насосной функции сердца зависит от точной координации и синхронизации региональной механической активации [203], при отсутствии которых существенно снижается сократительная функция сердца [184]. Так было показано [287], что различие в трансмуральном распределении изоформ тяжелых цепей миозина в желудочках свиньи играет важную роль в модуляции и синхронизации развития силы в толще стенки желудочка. Увеличение экспрессии изомиозина V1 в эпикарде ускоряет развитие силы, и, таким образом, укорочение ранее активированных волокон эндокарда с преимущественной экспрессией V3 координируется с последовательно активированными волокнами эпикарда во время систолы. Уменьшение экспрессии V1 в эндокарде замедляет вызванную растяжением генерацию силы и способствует удлинению систолы, поддерживая укорочение волокон эндокарда в процессе изоволюмического расслабления, чтобы усилить диастолическое наполнение посредством растянувшихся волокон эпикарда.

Таким образом, трансмуральный градиент изоформ сердечного миозина V1 и V3 с разным содержанием тяжелых цепей в сердце способствует оптимизации механической функции благодаря синхронизации генерации силы в толще стенки желудочка. Отсутствие изомиозина V1 при хронической сердечной недостаточности может нарушать синхронизацию механического сокращения и приводить к изменениям сократительной функции [287].

1.3. Кальциевая регуляция сокращений сердечной мышцы

На молекулярном уровне силогенерация либо укорочение мышцы происходит за счёт циклического взаимодействия молекул миозина с актином тонкой нити, во время которого они присоединяются к ней, совершают рабочий шаг и отсоединяются, гидролизуя АТФ (*более подробно см. ниже*). Процесс регуляции сокращений представляет собой активацию/деактивацию тонкого филамента кальций-регуляторной тропонин-тропомиозиновой системой и определяется ходом изменения концентрации кальция в цитозоле, который, в свою очередь регулируется электрической активацией клетки, т.е. развитием потенциала действия. Потенциал действия возникает в клетках рабочего миокарда в ответ либо на пейсмекерный, либо на внешний (в условиях эксперимента или использования кардиостимуляторов) электрический импульс и формируется при участии целого ряда ионных токов через мембрану, включая кальциевые, калиевые и натриевые токи. Эти процессы охвачены целым рядом обратных связей. Например, механические условия сокращений, а также образование и распад поперечных мостиков влияют на кальциевую и электрическую активацию клеток.

В тонком филаменте кардиомиоцита семь молекул G-актина, одна молекула тропомиозина и одна молекула тропонина (A_7TmTn) [134] образуют структурно-функциональную единицу, которая называется регуляторной группой. Тропонин состоит из трёх взаимодействующих между собой субъединиц: TnC, TnI и TnT. Тропонин С ответственен за связывание

кальция в тропониновом комплексе, тропонин I – за связывание с актином и ингибирование АТФазной активности миозина, тропонин T связывает тропониновый комплекс с тропомиозином [134].

***Вызванные кальцием структурно-конформационные
изменения тонкого филамента***

При связывании тропонином С кальция в тонком филаменте происходит ряд структурных изменений, которые делают возможным взаимодействия миозина с актином [135].

Актин состоит из двух доменов: внешнего (субдомены 1-2) и внутреннего (субдомены 3-4). На поверхности молекулы актина есть два вида участков связывания с головкой миозина. Участки первого вида отвечают за слабое, т.е. электростатическое, связывание и находятся в субдомене 1 актина (аминокислотные остатки 1-4, 24-25 и 93-95). Участки второго вида – сильно–связывающие, гидрофобные, входят в состав субдомена 3, субдомена 2 следующего мономера актина и в соединение между субдоменами 3 и 1 (аминокислотные остатки 341-354, 144-148 и 332-334). В отсутствие ионов кальция ингибиторный регион тропонина I взаимодействует с аминокислотными остатками 1-7 и 23-27 субдомена 1 актина. В результате тропониновый комплекс вместе с тропомиозином фиксируется на внешнем домене актина и тем самым закрывает участки связывания миозина с актином [134, 135].

После связывания кальция тропонин С переходит из закрытой конформации в открытую, при этом регуляторная часть тропонина I (аминокислотные остатки 116-131) взаимодействует с N-терминальной частью тропонина С, а ингибиторная часть (аминокислотные остатки 104-115) диссоциирует от актина и становится ближе к центральной α -спирали тропонина С [44]. Связь между тропонином С и тропонином Т также усиливается. В результате молекула тропомиозина перестаёт фиксироваться на внешнем домене актина и скатывается внутрь канавки, образованной

двумя цепями F-актина. До недавнего времени считалось, что для активации тонкого филамента было достаточно только ионов кальция, и тропомиозин на актиновой нити находился в двух состояниях, *on* или *off*, т.е. в открытом или закрытом. Тропомиозин в закрытом состоянии препятствует взаимодействию актина с миозином, а в открытом доступен для связывания. McKillop и Geeves [199] предложили новую модель, в которой для полной активации тонкого филамента, кроме кальция, необходимо прикрепление миозиновой головки к сильно-связывающему участку актина. В модели McKillop и Geeves тропомиозин на актиновом филаменте может находиться в трёх состояниях: блокирующем, закрытом и открытом. В отсутствие ионов кальция тропомиозин находится в блокирующем состоянии, располагаясь на внешнем домене актина (субдомены 1 и 2). В этой позиции тропомиозин блокирует большинство миозин-связывающих мест. Связывание кальция с тропонином С ведет к структурным изменениям в тропониновом комплексе, которые позволяют тропомиозину передвигаться на внешнюю часть внутреннего домена актина (субдомены 3 и 4). В этом закрытом состоянии большинство, но не все, миозин-связывающие участки актина открыты, что делает возможным слабое (электростатическое) связывание миозина с актином. Затем головка миозина прикрепляется к сильно-связывающим (гидрофобным) участкам на поверхности актина, что ведёт к дальнейшему азимутальному смещению тропомиозина из закрытого состояния на внутреннюю часть внутреннего домена актина, т.е. в открытое состояние, при котором все миозин-связывающие участки актина становятся доступны миозиновым головкам [25, 199]. Именно в таком положении тропомиозина становится возможной генерация силы поперечными мостиками миозина.

Цикл поперечного мостика

В цикле поперечного мостика можно выделить несколько стадий [134].

1. Стадия 1 – быстрое и необратимое связывание молекулы АТФ и формирования комплекса актомиозин-АТФ ($A \cdot M \cdot АТФ$).

2. Стадия 2 – быстрая диссоциация актина от комплекса актин-миозин-АТФ ($A \sim M \cdot АТФ$), во время которой происходит движение верхнего и нижнего 50 кДа доменов головки миозина друг от друга.

3. Стадия 3 – поворот шейки относительно моторного домена.

4. Стадия 4 – быстрое, но обратимое, расщепление АТФ, после чего головка миозина снова слабо связывается с актином с образованием комплекса ($A \sim M \cdot АДФ \cdot P_i$). Эта стадия быстрая, но в отсутствие ионов кальция тропомиозин стерически блокирует доступ головки миозина к сильно-связывающим участкам на актиновом филаменте. Однако, если кальций связан с тропонином С, то тропонин I отсоединяется от актина, позволяя комплексу тропомиозин - тропонин открыть слабо-связывающие участки на актине.

5. Стадия 5 – слабо-связанный комплекс миозина с актином ($A \sim M \cdot АДФ \cdot P_i$) переходит в сильно-связанный комплекс ($A \cdot M \cdot АДФ \cdot P_i$). При этом, чем выше концентрация ионов кальция, тем больше доля времени, в течение которого открыт доступ миозина к сильно-связывающим участкам актина. Следовательно, скорость присоединения поперечного мостика зависит от концентрации кальция.

6. Стадия 6 – в головке миозина происходят структурные изменения, при которых верхний и нижний 50 кДа домены миозина движутся навстречу друг другу, происходит выпрямление шейки миозина, что приводит к высвобождению фосфата из нуклеотид-связывающего кармана. Или же верхний и нижний 50 кДа домены миозина движутся навстречу друг другу, позволяя фосфату высвободиться из нуклеотид-связывающего кармана, в результате чего происходит выпрямление шейки миозина, т.е. шаг генерации силы. Таким образом, фосфат высвобождается из нуклеотид-связывающего кармана в процессе силогенерирующего шага, или перед ним.

7. Стадии 7 и 8 – после выхода фосфата из комплекса $A \cdot M \cdot АДФ \cdot P_i$ с образованием $A \cdot M \cdot АДФ$ происходит быстрое высвобождение АДФ из нуклеотид-связывающего кармана и миозин опять способен связать

следующую молекулу АТФ [1, 130, 134]. Сильно-связанные миозиновые головки препятствуют переходу комплекса тропомиозин - тропонин в заблокированное или закрытое состояние. В отсутствие кальция головки отсоединяются в конце цикла, позволяя комплексу тропомиозин - тропонин закрыть сильно-связывающие участки на актине, деактивируя тем самым тонкий филамент.

Кооперативность в сердечной мышце.

Кооперативные (аллостерические) эффекты широко распространены среди белков, особенно ферментов. Ферменты, в которых наблюдаются такие эффекты, называются аллостерическими. Данные ферменты характеризуются сигмоидальной зависимостью скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата или метаболита-регулятора, несколькими центрами связывания субстрата [7].

В поперечнополосатой мышце кооперативные явления широко распространены. Donaldson и Kerrick [89] впервые использовали уравнение Хилла:

$$F = F_0[Ca^{2+}]^h / (K^h + [Ca^{2+}]^h) \quad (1)$$

для описания зависимости силы, развиваемой мышцей, от концентрации ионов кальция. В данном уравнении h – коэффициент кооперативности Хилла. При изучении мышечного сокращения уравнение широко применяется для описания зависимости между концентрацией кальция и силой. Переменная K^h – концентрация ионов кальция, при которой достигается сила, равная половине максимальной силы, называемая кальциевой чувствительностью. Поскольку обычно концентрация ионов кальция выражается в pCa ($-\log_{10}[Ca^{2+}]$), уравнение можно переписать: $F = F_0 / [1 + 10^{h(pCa_{50} - pCa)}]$, где pCa_{50} – концентрация ионов кальция, необходимая для полумаксимальной активации мышцы. Коэффициент кооперативности Хилла отражает степень кооперативности кальциевой активации. Если связывание кальция с одним сайтом контролирует силу в отношении один к одному, то $h = 1$. Если же, как

в скелетной мышце, кальций связывается с двумя сайтами, то h может увеличиваться до 1,2 [67] при условии, что сайты независимы и связывание с обоими сайтами необходимо для активации. Для изометрической силы коэффициент кооперативности Хилла обычно больше 1, при этом его значение меняется примерно от ~ 2 до 5-6 в скелетной и сердечной мышцах [69, 117]. Значение коэффициента кооперативности зависит от экспериментальных условий и способа анализа полученных данных. Было показано [134], что при усреднении значений силы, полученных в нескольких экспериментах на волокне при данном значении концентрации кальция (pCa) с дальнейшим построением кривой зависимости « pCa – сила», различия в кальциевой чувствительности волокон могут отражаться пониженным значением коэффициента кооперативности Хилла по сравнению с коэффициентами, полученными для отдельных волокон. Поэтому более корректно находить параметры уравнения Хилла для каждого мышечного волокна и усреднять значения коэффициентов h и pCa_{50} .

Концепция кооперативности сформулирована Gordon с соавт. [134] на примере активации скелетной мышцы, в которой одна молекула тропонина С может связываться с двумя ионами кальция. Молекула сердечного тропонина С имеет только один центр связывания кальция и поэтому может связываться только с одним ионом кальция.

Сила, развиваемая мышцей в изометрическом состоянии, зависит от количества сильно-связанных поперечных мостиков и силой, развиваемой каждым из них. В свою очередь это зависит от количества актин-связывающих участков, доступных для сильного связывания миозином. Максимальное количество поперечных мостиков, присоединенных во время сокращения неизвестно [134]. Из особенностей структуры молекул актина и миозина следует, что к семи мономерам актина может быть присоединено не более четырех головок миозина. Вероятно, что во время изометрического сокращения только 20-40 % из всех поперечных мостиков присоединены в

каждый момент времени, что соответствует примерно 1-2 головкам миозина на 7 актиновых мономеров.

Упрощенная хемомеханическая модель цикла поперечного мостика [134] описывает взаимодействие одной молекулы миозина с одной молекулой актина тонкого филамента. Из особенностей структуры саркомера вытекает, что активация вовлекает множество потенциальных взаимодействий миозина с молекулами актина вдоль каждого тонкого филамента. Эта активация должна вовлекать кооперативность внутри и между регуляторными единицами (A_7TnTm).

Известно несколько механизмов кооперативности, благодаря которым при связывании ионов кальция с тропонином С (TnC) через конформационные изменения в тонком филаменте (см. выше) с последующим образованием поперечного мостика происходит кооперативное увеличение количества поперечных мостиков вдоль актинового филамента.

Первый из них – мостико–тропониновая кооперативность ($Xb-CaTnC$): сильное связывание поперечных мостиков в одной регуляторной группе A_7TmTn увеличивает сродство TnC к кальцию в этой группе или в соседних регуляторных группах. Имеются доказательства, что этот механизм проявляется в присутствии ригорных поперечных мостиков как в скелетной [41, 49, 124], так и в сердечной мышце [151]. Было показано, что связывание ионов кальция с TnC усиливается в активно сокращающейся сердечной мышце [151], но не в скелетной [122]. Было обнаружено [43], что в сердечной мышце связывание кальция с одним TnC способствует связыванию $S1$ с актином в той же самой регуляторной единице, которое в свою очередь усиливает связывание кальция с соседним TnC , «включая», таким образом, данную регуляторную единицу. Было показано [20, 140], что циклирующие поперечные мостики влияют на структуру TnC скелетно-мышечного тонкого филамента. Таким образом, хотя эта кооперативность невелика в скелетно-мышечных волокнах, она важна в сердечной мышце [134, 194].

Второй механизм – это тропонин-тропониновая кооперативность (TnC-TnC): связывание ионов кальция с одним центром на TnC увеличивает либо сродство к кальцию второго центра на этой же молекуле TnC (как в случае тропонина скелетной мышцы), либо число молекул TnC в ближайшей окрестности вдоль тонкой нити, активируемых этим связыванием. Это взаимодействие осуществляется благодаря соединению голова-хвост между молекулами тропомиозина вдоль тонкого филамента [40, 209, 212]. Замещение сердечного TnC в препаратах сердечной мышцы на скелетный TnC увеличивает значение коэффициента кооперативности [208], подтверждая, что существует кооперативность между NH₂-терминальными участками скелетного TnC.

Третий механизм: прямая активация тонкого филамента сильно-связанными поперечными мостиками независимо от связывания кальция. Сильно-связанные поперечные мостики могут усиливать активацию этой же самой регуляторной единицы и соседних регуляторных единиц. Факторы, которые изменяют присоединение или доступность поперечных мостиков (такие как уменьшение расстояния между тонкими и толстыми филаментами, а также увеличение длины саркомера или движение головки миозина от тонкого филамента, позволяющее фосфорилироваться легким цепям миозина) могут усиливать кальциевую чувствительность и/или крутизну кривой «*p*Ca-сила».

Наиболее изучены первые два типа кооперативности, влияющие на кинетику связывания/распада комплексов CaTnC (следовательно, на образование миозиновых поперечных мостиков), т.е. играющие ключевую роль в процессах регуляции сокращений: тропонин-тропониновая (CaTnC-CaTnC) и мостико-тропониновая кооперативность (Xb-CaTnC).

В растворных экспериментах было установлено [67] наличие кооперативной зависимости сродства TnC к кальцию как от концентрации прикрепленных головок миозина, так и от концентрации CaTnC комплексов. В свою очередь Gordon и Bell [134, 173, 194] в работах на скинированном

скелетном волокне и сердечной трабекуле с помощью линейного дихроизма показали, что сильное связывание поперечных мостиков в сердечной трабекуле вызывает структурные изменения в TnC, тогда как в скелетном волокне такого эффекта не наблюдалось.

Механизмы кооперативности сократительных белков имеют большое значение для кальциевой регуляции сокращений интактной сердечной мышцы [134, 135]. Известно, что в сердце млекопитающих имеется значительная вариация в экспрессии изоформ сердечного миозина V1 и V3 как в разных регионах сердца, так и внутри кардиомиоцитов в разных слоях стенки желудочка. Содержание изоформ миозина меняется в процессе развития и при патологии (гипертрофии, гипо- и гипертиреозе, сахарном диабете). Различие в соотношениях изоформ V1 и V3 в кардиомиоците прежде всего прямо проявляется в различных скоростных характеристиках развития напряжения: при преобладании быстрой изоформы, V1, напряжение в клетке сердечной мышцы развивается быстрее. Однако очень важно изучить тот вклад, который разные соотношения изомиозинов вносят в механическую функцию миокарда не напрямую, т.е. не как силогенерирующие единицы, а через кооперативное влияние сильно-связанных поперечных мостиков на сродство тропонина С к кальцию (кооперативность Xb-CaTnC)[46]. Вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую регуляцию сокращений миокарда традиционно изучался главным образом на фрагментах ткани сердечной мышцы и изолированных кардиомиоцитах [86, 101, 113, 160, 246, 287]. В этих экспериментах регистрировались связи «pCa-сила», «pCa-скорость», определялись коэффициент кооперативности и кальциевая чувствительность этих зависимостей.

Зависимость «pCa-скорость»

В предложенной А.Ф. Нухлеу в 1957 г. [156] модели мышечного сокращения предполагается, что скорость ненагруженного укорочения (V_u) в максимально активированной мышце зависит от скорости открепления

поперечных мостиков и определяется балансом между позитивно и негативно напряженными поперечными мостиками. Согласно модели Huxley, изометрическая сила прямо пропорциональна количеству поперечных мостиков, в то время как скорость ненагруженного укорочения не зависит от их количества. В дальнейшем было показано [94, 291], что скорость ненагруженного укорочения при различных условиях в большей степени зависит от скорости диссоциации или размера шага поперечных мостиков, чем от их количества. В экспериментах было обнаружено, что скорость ненагруженного укорочения в максимально активированном мышечном волокне определяется скоростью лимитирующего шага в цикле поперечного мостика [66, 204, 253]. В экспериментах на интактных волокнах найдено [232], что V_u не зависит от концентрации кальция, тогда как Julian [168] показал, что при уменьшении концентрации кальция значение V_u падает. В ряде работ на скинированных мышечных волокнах было найдено уменьшение V_u при низких значениях концентрации кальция в растворе [71, 204, 210].

Зависимость «pCa-сила»

Результаты исследований кальциевой регуляции развития силы, выполненных на скинированных кардиомиоцитах и препаратах миокарда с преобладанием той или иной изоформы миозина, несколько противоречивы.

В исследованиях на скинированных трабекулах и кардиомиоцитах крысы [113, 160, 246] было обнаружено, что экспрессия изоформ тяжелых цепей миозина не оказывает влияния как на наклон кривой «pCa-сила», так и на кальциевую чувствительность. Похожие результаты получены на скинированных многоклеточных препаратах из субэпикарда (~ 12,5 % - α -ТЦМ) и субэндокарда (2,8 % - α -ТЦМ) свиньи [287].

На скинированных кардиомиоцитах у крыс, обработанных пропилтиоурацилом при увеличении экспрессии β -изоформы тяжелых цепей миозина, было показано уменьшение [101] или увеличение (на скинированных препаратах желудочка) [131] кальциевой чувствительности.

При этом во всех выше упомянутых работах на скинированных кардиомиоцитах и препаратах миокарда крыс было установлено, что максимальное значение силы не зависит от изоформы миозина.

В экспериментах на скинированных трабекулах интактных крыс и крыс, обработанных пропилтиоурацилом [71] было показано, что коэффициент кооперативности и кальциевая чувствительность зависимости « pCa -сила» выше для трабекул, содержащих V3 изоформу миозина. Максимальная сила статистически недостоверно выше у трабекул, содержащих преимущественно V1 изоформу.

Robbins с соавторами [99] исследовали влияние изоформ сердечного миозина на зависимость « pCa -сила» на скинированных полосках папиллярных мышц трансгенных кроликов, которые содержали около 40 %, либо 12 % α -ТЦМ, и интактных кроликов с низким содержанием α -ТЦМ (около 2 %). Было обнаружено, что кальциевая активация развития силы не зависит от изоформного состава сердечного миозина, максимальная сила статистически значимо выше у папиллярных мышц, содержащих преимущественно V1 изоформу.

В исследованиях влияния тяжелых цепей миозина на развитие силы и кальциевую чувствительность в сердце мышей в онтогенезе на скинированных трабекулах было установлено, что при увеличении содержания изоформы V1 после рождения мышей кальциевая чувствительность уменьшается, а коэффициент кооперативности не меняется [71].

Зависимость «сила-скорость»

Связь «сила-скорость» – важнейшая характеристика сокращающейся мышцы. В 1938 году Арчибальд Хилл опубликовал работу [149], где впервые была построена зависимость между нагрузкой на скелетную мышцу лягушки и скоростью укорочения мышцы. Хилл установил, что чем больше нагрузка на мышцу, тем меньше максимальная скорость ее укорочения, и наоборот. Это выражается зависимостью «сила-скорость», представляющей

фундаментальную характеристику работоспособности мышцы. Уравнение Хилла [149], описывающее соотношение между нагрузкой (или силой, F) и скоростью укорочения (V) можно записать в виде:

$$(F+a) \cdot V = b \cdot (F_0 - F), \quad (2)$$

где a и b – асимптоты прямоугольной гиперболы. Постоянная a выражена в долях силы F , b представляет собой относительную скорость укорочения мышцы. Если нагрузка равна нулю, то уравнение принимает вид: $V_{\max} = b F_0/a$. В отсутствие укорочения ($V=0$) $F=F_0$, при $F=0$ $V=V_{\max}$. Значение F_0 определяется максимальным числом молекул миозина, связанных с актином и генерирующих силу, тогда как V_{\max} соответствует максимальной скорости АТФ-зависимого актин-миозинового взаимодействия. Отношение a/F_{\max} характеризует степень кривизны связи «сила-скорость»: чем выше значение a/F_{\max} , тем больше степень кривизны.

Последующие исследования этой зависимости на различных типах как интактных [93, 145], так и скинированных [38, 183] мышц и мышечных волокнах различными методами показали, что существует заметное отклонение от классической гиперболы Хилла в области больших нагрузок.

Edman [93] получил кривую зависимости «сила-скорость», у которой скорость в области больших нагрузок падает быстрее, чем на теоретической кривой. Автор предложил модифицированную версию гиперболического уравнения Хилла, которая включает дополнительную функцию, позволяющую описать отклонение в области больших нагрузок. Было обнаружено, что изменение кривизны связи «сила-скорость» при низких и средних нагрузках связано с изменением кривизны в области больших нагрузок. Это показывает, что кинетика сократительного процесса меняется специфическим образом, когда нагрузки на мышцу достигают критического уровня. Edman дает следующее объяснение двухфазной природы (т.е. отклонение от классической гиперболы) кривой «сила-скорость». Согласно общепринятому представлению, активная генерация силы в мышце основана на циклическом взаимодействии поперечных мостиков с тонким

филаментом. Поперечные мостики действуют как независимые силогенераторы и при низких нагрузках это так. Как показано в экспериментах на интактных волокнах [94], скорость сокращения при нулевой нагрузке не зависит от изменений длины саркомера и состояния активации сократительной системы, которые меняют количество поперечных мостиков, доступных для взаимодействия с тонким филаментом. Двухфазный характер кривой должен означать, что независимый характер поперечных мостиков теряется в области больших нагрузок, когда высокая плотность поперечных мостиков налагает ограничение на неприкрепленные головки миозина в поиске подходящего участка связывания на актиновом филаменте. В модели поперечных мостиков, включающей два и более прикрепленных состояния [106, 157], увеличивающаяся крутизна кривой «сила-скорость» при больших нагрузках может быть объяснена возросшей фракцией мостиков, входящих в состояние низкой продукции силы, когда их плотность становится чрезмерно высокой.

Было высказано предположение [3, 73, 179], что в экспериментах на препаратах сердечной мышцы в отклонении кривой «сила-скорость» от гиперболы играет роль последовательная податливость мышечных препаратов. Предполагалось, что последовательная податливость является результатом поврежденных концов препарата, прикрепленного к датчикам, т.е. является артефактом методики эксперимента, а не отражением свойств собственно актин-миозинового взаимодействия. С помощью математической модели сократительной активности миокарда было найдено, что выраженность отклонения связи «сила-скорость» зависит от степени податливости последовательного элемента: чем сильнее укорачивается волокно, тем сильнее инактивация и соответственно, более выраженное отклонение [26].

В 1978 году Kaufmann с соавторами [145] исследовали зависимость «сила-скорость» на папиллярных мышцах кошки. Авторы отмечают, что форма кривых «сила-скорость» зависит от метода регистрации: кривые,

которые были получены методом постнагрузочных сокращений, имеют в области больших нагрузок направленную вверх выпуклость (их результаты), а кривые, полученные, например, методами быстрого и медленного отпускания мышцы [95, 226], имеют вогнутость, направленную вниз.

В исследованиях влияния разных изоформ тяжелых цепей скелетномышечного миозина крысы на связь «сила-скорость» в скинированных мышечных волокнах [38], было установлено, что для волокон, содержащих медленную изоформу 1 скелетномышечного миозина и двух типов волокон с быстрой изоформой 2В и 2Х, форма кривой этой зависимости отклоняется вверх от гиперболической в области больших нагрузок. Результаты этих исследований показывают, что форма кривой «сила-скорость» определяется свойствами волокна, зависящими от состава сократительных белков.

В ряде исследований связи «сила-скорость», выполненных на скинированных кардиомиоцитах крыс, содержащих преимущественно либо V1, либо V3 изоформы сердечного миозина [146, 197, 235], кривые зависимости «сила-скорость» имеют вид классической гиперболы.

Зависимость «сила-скорость» при насыщающей (pCa 4,5) и ненасыщающей (pCa 5,6) концентрациях кальция была получена в экспериментах на скинированных кардиомиоцитах крыс [197]. Было показано, что при низкой концентрации кальция наблюдалось уменьшение скорости укорочения при всех относительных нагрузках.

В исследованиях, проведенных на скинированных кардиомиоцитах эутиреоидных крыс и крыс после тиреоидэктомии [146] было установлено, что 1) скорость нагруженного укорочения и мощность зависят от экспрессии тяжелых цепей сердечного миозина, 2) максимальная кальций-активируемая изометрическая сила одинакова для кардиомиоцитов, содержащих V1 и V3 изоформы, 3) кривая зависимости «сила-скорость» имеет более вогнутую форму для кардиомиоцитов с V3, чем для V1.

В экспериментах, проведенных на скинированных кардиомиоцитах крыс [235], содержащих разные отношения V1 или V3 изоформ сердечного миозина, была получена зависимость «сила-скорость» при насыщающей концентрации кальция (pCa 4,5) и при его фактическом отсутствии (pCa 9,0). Было установлено, что кривые зависимости «сила-скорость» для кардиомиоцитов, содержащих преимущественно β -ТЦМ, находятся ниже, по сравнению с кривыми, полученными на кардиомиоцитах с преобладанием α -ТЦМ, т. е. скорость укорочения кардиомиоцитов с β -ТЦМ была меньше на всем диапазоне нагрузок. Кривизна связи «сила-скорость», оцененная по соотношению a/F_{max} , больше для кардиомиоцитов с β -ТЦМ.

Практически все исследования на кардиомиоцитах выполнены на крысах. Robbins с соавторами [99] исследовали влияние изоформ сердечного миозина на связь «сила-скорость» на скинированных полосках папиллярных мышц трансгенных кроликов и волокнах из желудочков трансгенных мышей [27]. Связь «сила-скорость», полученная в экспериментах на кардиомиоцитах трансгенных животных, имеет вид классической гиперболы. Скорость укорочения кардиомиоцитов и полосок, содержащих преимущественно изомиозин V1, была выше на всем диапазоне нагрузок, а кривизна полученных гипербол больше для изоформы V3, что совпадает с результатами экспериментов на препаратах сердечной мышцы нормальных кроликов.

В 1990 году группа японских ученых [263] разработали методику, позволяющую регистрировать связь «сила-скорость» на уровне сократительных белков. С помощью центрифужного микроскопа ими была получена зависимость «сила-скорость» для покрытых скелетным миозином полистироловых шариков микронного диаметра, движущихся по актиновому кабелю водоросли *Nitellopsis*. Этим же методом была получена связь «сила-скорость» для изоформ сердечного миозина крысы [118]. Зарегистрированную кривую авторы назвали «двойной гиперболой» из-за характерного отклонения от гиперболической формы в области больших

нагрузок. Форма кривой соответствует классической гиперболе примерно в диапазоне нагрузок от 0 до $0,25 F_{max}$, далее скорость выходит на плато вплоть до нагрузок $0,75 F_{max}$. С дальнейшим ростом нагрузки наблюдается резкое падение скорости вплоть до нуля. Формы кривых «сила-скорость» изоформ V1 и V3 отличаются: на кривых, полученных с изоформой V1, момент выхода скорости на плато наступает раньше.

С использованием метода искусственной подвижной системы с актин-связывающим белком α -актинином в качестве нагрузки [138] была получена связь «сила-скорость» для скелетного миозина. В экспериментах в проточной камере с помощью изменения состава буфера имитировались условия, которые наступают в мышечной клетке при синдроме хронической усталости. Были построены связи «сила-скорость» для миозина скелетных мышц нормальных кроликов и кроликов с синдромом хронической усталости. Форма полученных ими кривых значительно отличалась от гиперболической в области малых нагрузок, что может быть связано со специфическим составом буфера, используемого в экспериментах. Буфер содержал свободный фосфат и АДФ в значительных количествах, что не могло не повлиять на взаимодействие сократительных белков, а значит, и на характеристики связи «сила-скорость».

Warshaw с соавторами [255] с помощью метода «оптической ловушки» зарегистрировали связь «сила-скорость» на ансамбле для 8 молекул скелетного миозина при их взаимодействии с тонким филаментом. Авторы заключают, что отношение «сила-скорость» для мышцы является отражением внутренних свойств грузозависимого взаимодействия в актин-миозиновом комплексе на молекулярном уровне.

Исследование кальциевой регуляции сокращений сердечной мышцы методом искусственной подвижной системы

Один из подходов, с помощью которого можно изучать механизмы регуляции сокращения в скелетной и сердечной мышцах – метод искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом [37,

46, 47, 154, 242], являющийся модификацией метода искусственной подвижной системы [178].

Суть метода искусственной подвижной системы состоит в следующем. Исследуемый моторный белок фиксируется на внутренней поверхности проточной камеры, покрытой нитроцеллюлозой, после чего в камеру заливается раствор, содержащий филаментарный актин, окрашенный родамин-фаллоидином. Актин взаимодействует с миозином, образуя ригорный комплекс. С помощью экспериментальной установки, состоящей из инвертированного флуоресцентного микроскопа с интенсифицированной видеокамерой, соединенной с компьютером, можно видеть актиновые филаменты в виде светящихся нитей. При добавлении в камеру раствора, содержащего АТФ, актин начинает двигаться по поверхности, покрытой моторным белком. Видеоизображение движения флуоресцентно окрашенных актиновых филаментов записывается на жесткий диск компьютера с помощью программного обеспечения для дальнейшей обработки. Используя специальное программное обеспечение, можно измерять скорости скольжения актиновых нитей по поверхности, покрытой миозином или его протеолитическими фрагментами, такими как тяжёлый меромиозин или S1. Таким образом, этот метод позволяет изучать взаимодействие сократительных белков на молекулярном уровне, точнее, на уровне ансамблей молекул.

Метод искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом

В методе искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом вместо актинового филамента используется реконструированный тонкий филамент, состоящий из актина и регуляторных белков: тропонина и тропомиозина [9, 11]. В зависимости от конкретной задачи исследования тонкий филамент можно реконструировать, используя как различные изоформы регуляторных белков, так и их мутанты [126, 162].

В такой системе экспериментатор может задавать различные концентрации свободного кальция в растворе, регистрировать связи « pCa -сила» и « pCa -скорость», что дает возможность напрямую исследовать характеристики актин-миозинового взаимодействия и его регуляцию, исключая эффекты, связанные с механическими свойствами саркомера, мышечной клетки и ткани. Метод позволяет сравнивать характеристики изоформ сократительных и регуляторных белков и их различных комбинаций [34, 36, 156]. Метод позволяет оценивать такие характеристики кальциевой активации тонкого филамента, как коэффициент кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность для связей « pCa -скорость» и « pCa -сила».

В 1989 году Honda с соавторами [154] впервые наблюдали кальций-зависимое движение комплекса филаментарного актина с тропомиозином и тропонином. Затем этот метод стали использовать для исследования кальциевой регуляции сокращений как скелетной [461], так и сердечной [15, 41, 243] мышц. Был разработан метод, в котором тонкие нити в скинированном мышечном волокне были энзиматически расщеплены и затем реконструированы, используя актин и регуляторные белки [125, 268]. Было показано [41], что нет отличий в результатах при использовании нативных и реконструированных тонких филаментов. С помощью метода двойного окрашивания Sata с соавторами [15] доказали, что регуляторные белки встраиваются равномерно в структуру тонкого филамента. Также авторы обнаружили, что при понижении значения pH и температуры, и при увеличении концентрации неорганического фосфата кальциевая чувствительность сократительных белков уменьшается таким же образом, как в мышцах и клеточных препаратах. Таким образом, было доказано, что реконструированные тонкие филаменты полноценны в структурном и функциональном отношении и метод искусственной подвижной системы с реконструированным тонким филаментом может быть использован для изучения взаимодействия белков и его регуляции.

В настоящее время метод искусственной подвижной системы с использованием полностью или частично реконструированной тонкой нити широко применяется для исследования влияния как природных – нормальных и патологических, – так и искусственно модифицированных сократительных и регуляторных белков на регуляцию сокращений мышц.

Регулируемое кальцием движение тонкого филамента в искусственной подвижной системе. Зависимость «pCa-скорость»

Метод искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом дает возможность разрешить некоторые противоречия в результатах, полученные с использованием скинированных мышечных волокон. С использованием скелетно-мышечных сократительных и регуляторных белков [154, 202], было показано, что скорость скольжения тонких филаментов регулировалась согласно предсказанию модели Huxley («on-off» механизм); то есть, при $pCa > 5,7 - 6,1$ филаменты были связаны с поверхностью и не двигались. При дальнейшем понижении pCa , а именно при $pCa < 5,7$ [103] и $pCa < 6,0$ [202], филаменты двигались с максимальной скоростью. Эти результаты были подтверждены с использованием скелетно-мышечных сократительных и сердечных регуляторных белков [15]. В этих публикациях отсутствовала характеристика движения филаментов, не был описан анализ движения филаментов, не давались критерии выбора филаментов для определения их скорости скольжения, не указывалось соотношения белков тонкого филамента (актин:Тm:Тn). В другой работе [120] был проведен анализ движения филаментов в зависимости от количества регуляторных белков, связанных с тонким филаментом. Филаменты для анализа отбирались случайным образом, в зависимости от концентрации кальция в растворе были проанализированы скорости и количество движущихся филаментов. Авторы показали, что количество движущихся филаментов зависело от концентрация кальция. Однако регуляция в данных экспериментах была неполной, так как даже при низкой

концентрации кальция $< 10^{-9}$ М 20 % филаментов двигалось с довольно высокой скоростью. Это было связано с тем, что в экспериментах использовался АТФ-содержащий раствор с низким содержанием тропонина (менее 100 нМ) и совсем без добавления тропомиозина. При таких условиях в растворе происходит диссоциация регуляторных белков от тонкого филамента, что приводит к неполной регуляции.

В дальнейших исследованиях [46, 47] использовались скелетные или сердечные регуляторные белки со скелетным актином. Для получения полностью регулируемого тонкого филамента во все растворы, содержащие тонкий филамент, добавлялось по 100 нМ тропомиозина и тропонина. Движение регулируемых филаментов было проанализировано системой автоматической обработки в диапазоне значений pCa от 4,5 до 9,0. Исследования были выполнены при различных значениях pH растворов: 7,4 [47] и 7,0 [46]. Были определены средние скорости скольжения филаментов и фракции движущихся филаментов и при разных концентрациях свободного кальция в растворе. Было обнаружено, что:

- при значениях pCa 9 филаменты практически не движутся, при pCa 4,5 - 5,0 80 - 90 % тонких филаментов движется с максимальной скоростью, таким образом, достигается полная регуляция движения тонких филаментов;
- скорость и количество движущихся тонких филаментов зависит от pCa и могут быть описаны уравнением Хилла;
- кооперативность скорости движения филаментов не очень высока ($h < 2,2$), в то время как зависимость количества двигающихся филаментов от концентрации кальция кооперативна в большей степени;
- при сравнении кривых « pCa -сила», полученных на сканированных мышечных волокнах, сокращающихся при тех же условиях, при которых проводятся эксперименты в искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом и условиях в экспериментах с микроиглой для измерения силы в искусственной подвижной системе, было обнаружено, что pCa_{50} для кривой « pCa -сила» на 0,4 - 0,8 единиц меньше,

чем для кривой « pCa -скорость». Таким образом, при уменьшении концентрации кальция сила снижается быстрее, чем скорость.

Gordon с соавторами [134] делают вывод о том, что зависимость « pCa -скорость», полученная методом искусственной подвижной системы с реконструированной тонкой нитью, аналогична связи « pCa -сила».

***Определение относительной изометрической силы, развиваемой
миозином в искусственной подвижной системе***

Для определения изометрической силы в искусственной подвижной системе применяют несколько подходов. Один из них – «протокол смеси», при котором исследуемый миозин смешивается с более медленным миозином, и определяется скорость скольжения филаментов по полученной смеси белков [260]. В качестве более медленного может использоваться нециклирующий NEM- или $pPDM$ -обработанный миозин. Эта методика была впервые предложена Haerberle и Hemric [141], которые показали, что нециклирующий NEM- или $pPDM$ -обработанный миозин может ингибировать движение филамента, присоединяясь к актину. По наклону кривой зависимости скорости скольжения актинового филамента от процентного состава моторных белков (NEM- или $pPDM$ -обработанного миозина) определяется относительная средняя сила. Результаты такого подхода хорошо согласуются с прямыми измерениями относительной изометрической силы с помощью микроиглы [60, 295]. Сам же метод определения относительной изометрической силы с помощью микроиглы применяется очень редко в связи с его трудоемкостью. Недостатком применения модифицированного миозина является то, что его свойства со временем меняются.

Вместо химически модифицированного миозина исследователи стали использовать актин-связывающий белок α -актинин. α -Актинин образует сшивки вдоль нити актина, является структурным компонентом саркомера в области Z-линии.

Свойства α -актинина, выделенного в чистом виде, остаются неизменными более года, и данный белок очень эффективен для остановки движения филамента актина в искусственной подвижной системе [37, 166]. Количество α -актинина, необходимого для торможения движения филаментов линейно зависит от концентрации головок миозина в проточной камере и средней силы, развиваемой ими. В экспериментах [192] сравнивались наклоны кривых зависимости концентрации α -актинина от концентрации миозина для скелетного миозина цыпленка, миозина гладких мышц и изоформ сердечного миозина кролика, и было обнаружено, что относительные средние изометрические силы были такими же, как полученные прямым методом измерения силы с помощью микроиглы. В экспериментах на искусственной подвижной системе было показано [59], что α -актинин не влияет на свойства самих мышечных белков и на их взаимодействие между собой. Эти исследования подтверждают то, что актин-связывающий белок α -актинин – хороший инструмент для измерения относительной силы, развиваемой миозином в искусственной подвижной системе. И этим инструментом широко пользуются исследователи во всем мире.

Зависимость «pCa-сила» в искусственной подвижной системе

В настоящее время интенсивно исследуются механизмы регуляции сократимости сердечной мышцы с использованием метода искусственной подвижной системы. В основном изучается влияние различных изоформ регуляторных белков (особенно тропонина) в норме и при патологии, чего нельзя сказать про изоформный состав миозина. При этом надо заметить, что вклад механизмов кооперативности в регуляцию взаимодействия сократительных белков в искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом остается очень мало исследованным.

Noguchi с соавторами [217] в экспериментах на искусственной подвижной системе получили зависимость «pCa-сила» для изоформ сердечного миозина кролика. При анализе полученных данных авторам не

удалось выявить вклад различных изомиозинов в кальциевую регуляцию. Частично это связано с тем, что их анализ был недостаточно полон. Авторы не определяли значения коэффициента кооперативности Хилла, хотя из рисунка 5 в их статье видно, что углы наклона кривых « pCa -сила» отличаются, а значит должны различаться и коэффициенты кооперативности. Угол наклона кривой « pCa -сила» выше для изоформы V1, а значит и коэффициент кооперативности для этой изоформы должен быть больше. Поскольку авторы не приводят значения коэффициента Хилла, неизвестно, является ли это отличие статистически достоверным.

1.4. Регуляторная функция тропомиозина

В поперечнополосатых мышцах важная роль в регуляции взаимодействия миозина с актином принадлежит тропомиозину. Тропомиозин относится к фибриллярным белкам, имеет стержнеобразную форму длиной около 400 ангстрем и диаметром 10–20 ангстрем и состоит из двух субъединиц, масса каждой из которых составляет примерно 33 кДа. Молекула тропомиозина представляет собой левозакрученную суперспираль, состоящую из двух параллельных правозакрученных α -спиралей. N- и C-концевые части тропомиозина участвуют в соединении молекул друг с другом.

В поперечнополосатой мышечной ткани у млекопитающих за синтез субъединиц тропомиозина ответственны гены TPM1, TPM2, TPM3, которые кодируют α - β - и γ -цепи тропомиозина, соответственно [231]. α -Тропомиозин и β -тропомиозин экспрессируются в сердечной и в скелетной мышечной ткани. Ген TPM3 ответственен за синтез полноразмерного γ -тропомиозина, входящего в состав медленных мышечных волокон. γ -Тропомиозин на 93% идентичен α -тропомиозину и на 86% – β -тропомиозину [247].

$\alpha\alpha$ -Гомодимеры тропомиозина значительно более стабильны, чем $\beta\beta$ -гомодимеры, и поэтому преобладают в большинстве мышц, тогда как $\beta\beta$ -гомодимеры встречаются редко. В то же время $\alpha\beta$ -гетеродимеры стабильны,

и большинство поперечнополосатых мышц млекопитающих содержит как $\alpha\alpha$ -гомомеры, так и $\alpha\beta$ -гетеромеры [247]. Сердечная мышца небольших млекопитающих содержит исключительно $\alpha\alpha$ -гомомеры тропомиозина, тогда как в сердце крупных млекопитающих встречаются и $\alpha\beta$ -гетеромеры изоформ тропомиозина [231].

Экспрессия изоформ тропомиозина в сердце зависит от вида и возраста животного [36, 231]. α -Тропомиозин преобладает в сердцах взрослых особей крыс и мышей, кроликов и человека. β -тропомиозин экспрессируется в сердцах крыс и мышей до рождения. Изменения в экспрессии изоформ тропомиозина происходят при патологии сердца. В частности, в экспериментах с вызванной перегрузкой давлением гипертрофией левого желудочка взрослых крыс происходит повторная экспрессия фетальных изоформ тропомиозина: α -тропомиозин заменяется β -тропомиозином [165]. В экспериментах со сверхэкспрессией β -тропомиозина в сердцах взрослых крыс и мышей показано, что увеличение β -цепи до 50-60% увеличивает кальциевую чувствительность связи « pCa -сила» и приводит к диастолической дисфункции. Дальнейшее увеличение экспрессии β -цепи до 75-80% приводит к смерти животных сразу после рождения [247].

В отсутствие тропонина и миозина [288], изоформы тропомиозина располагаются в разных частях актинового филамента. Так, сердечный тропомиозин, состоящий из $\alpha\alpha$ -гомомеров, располагается на внешнем домене актина (субдомены 1 и 2), т.е. согласно модели McKillop и Geeves тропомиозин находится в блокирующем состоянии. Скелетный тропомиозин, состоящий из $\alpha\alpha$ -гомомеров и $\alpha\beta$ -гетеромеров, располагается на внешней части внутреннего домена актина (субдомены 3 и 4), что соответствует закрытому состоянию тропомиозина [25, 288]. В работе Chandy с соавторами [63] было показано, что $\alpha\alpha$ -тропомиозин обладает большей ротационной подвижностью на поверхности актина, чем $\alpha\beta$ -тропомиозин. Согласно данным экспериментов по соосаждению, $\alpha\alpha$ -тропомиозин и $\beta\beta$ -

тропомиозин связываются с фибриллярным актином (F-актином) с одинаковым сродством [247].

Согласно данным литературы тропомиозин связывается с актином кооперативно, т.е. исходное связывание его молекул с актиновым филаментом способно усиливать связывание других его молекул [103, 276]. В биохимических исследованиях показано, что тропомиозин, выделенный из поперечнополосатых мышц, регулирует актин-активируемую Mg^{2+} -АТФазную активность миозина [185].

Исследования регуляторного влияния как сердечной, так и скелетной изоформы тропомиозина проводились в экспериментах на *in vitro* подвижных системах с использованием в качестве моторного белка миозина быстрых скелетных мышц [90, 120, 238]. Результаты этих исследований оказались весьма противоречивыми. Так, в работе Honda с соавторами [90] скелетный тропомиозин увеличивал скорость движения F-актина, а по данным Marston с соавторами [120, 238] он либо не изменял скорость его движения, либо увеличивал ее (в случае α -гомомеров тропомиозина).

Было показано [296], что тропомиозин непосредственно влияет на механические характеристики актин-миозинового комплекса. В этом исследовании в качестве моторного белка использовался быстрый скелетный миозин, а тропомиозин был выделен из сердца быка. Авторы показали, что тропомиозин увеличивает силу, развиваемую поперечными мостиками миозина, а также снижает скорость движения актина при ненасыщающей концентрации миозина в проточной камере [296]. Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазной активности скелетного миозина [185]. При низкой концентрации изолированных головок миозина (субфрагмент 1 миозина, или S1) скелетный тропомиозин ингибировал, а при высокой концентрации S1 – стимулировал актин-активируемую Mg^{2+} -АТФазу скелетного миозина [185]. С точки зрения Gordon с соавторами [134] эти результаты можно объяснить тем, что тропомиозин влияет на взаимодействие миозина с актином как стерически,

так и аллостерически. Стерический эффект заключается в том, что тропомиозин блокирует участки связывания миозина на актиновом филаменте. Поэтому низкой концентрации S1 недостаточно для активации актин-тропомиозинового филамента, а при высокой концентрации S1 происходит полная активация актин-тропомиозинового филамента, и при этом проявляется кооперативное (аллостерическое) взаимодействие между головками миозина (S1), опосредованное тропомиозином. Дело в том, что при малой концентрации S1 миозина тропомиозин, находясь на актиновой нити, стерически блокирует места связывания миозина с актином. В результате головок миозина, которые связались с актином, становится совсем мало и они слишком удалены друг от друга, чтобы могло проявиться кооперативное (аллостерическое) взаимодействие между ними, опосредованное тропомиозином. При высокой концентрации S1 миозина, связавшихся с актином головок миозина много и поэтому такой аллостерический эффект проявляется, и актин-активируемая АТФазная активность растет.

Согласно работам Ali с соавт. [18] и Oguchi с соавт. [280] аминокислотная последовательность тропомиозина содержит участки, которые называются квази-повторами. Эти повторяющиеся участки содержат последовательности, богатые остатками глутаминовой кислоты, и чередуются с участками, бедными отрицательно заряженными аминокислотными остатками. Такие участки называются квазиэквивалентными, поскольку они не идентичны по аминокислотному составу. Предполагают, что они являются местами связывания тропомиозина с участками актина, богатыми положительно заряженными аминокислотами [18, 280].

В пользу гипотезы об аллостерическом влиянии тропомиозина на актомиозиновое взаимодействие говорят также работы L.Тобасман с соавторами [103, 276]. В этих работах было показано, что в отсутствие миозина и тропонинового комплекса мутантный тропомиозин с делецией

двух или трёх участков в средней части молекулы имеет константу связывания с F-актином того же порядка, что и α -тропомиозин дикого типа. При добавлении S1 к F-актину происходит кооперативное усиление связывания с F-актином α -тропомиозина дикого типа, но не мутантного тропомиозина [103, 276]. В недавней работе Товастан с соавторами [18] было показано, что химерные тропомиозины дрожжей, содержащие участки скелетного α -тропомиозина, по-разному влияют на константу связывания S1 с F-актином. Так, например, присутствие третьего квази-повтора в молекуле тропомиозина дрожжей увеличивало константу связывания S1 с F-актином, тогда как химерный тропомиозин с наличием других квази-повторов скелетного α -тропомиозина, так же, как и дрожжевой тропомиозин дикого типа, не оказывали влияния на связывание S1 с F-актином.

Помимо этого, было показано, что мутантный тропомиозин с делецией квази-повторов в средней части молекулы оказывает влияние на механические свойства актомиозинового комплекса. Так, в экспериментах на *in vitro* подвижных системах такой мутантный тропомиозин снижал скорость движения регулируемых филаментов при насыщающей концентрации кальция [103]; в изолированных полосках миокарда мутантный тропомиозин приводил к уменьшению максимальной изометрической силы [190, 289].

В связи со всем вышеизложенным, можно предположить, что изоформы тропомиозина поперечнополосатых мышц, которые различаются по аминокислотной последовательности в средней части молекулы, могут по-разному влиять на взаимодействие миозина с актином и это влияние может быть специфичным для изоформ сердечного миозина. Поскольку тропомиозин является конформационным посредником в реализации Xb-CaTnC кооперативности, то его изоформы могут влиять на эту кооперативность, и это влияние может оказаться различным для изомиозинов V1 и V3.

1.5. Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С): структура, свойства и регуляторная функция

Миозин-связывающий белок С (МуВР-С, С-белок) был впервые обнаружен как примесь в миозиновых препаратах, выделенных из скелетных мышц [227] около 40 лет назад. На сегодняшний день обнаружено три изоформы С-белка в поперечнополосатой мышечной ткани: две в скелетной мышечной ткани, в быстрых и медленных волокнах, соответственно, и одна изоформа в сердечной мышце.

С-белок – это полярный белок, хорошо растворимый при достаточно низкой ионной силе раствора, имеющий стержнеобразную форму длиной 48 нМ и массу около 140-150 kDa [262]. С-белок состоит из одной полипептидной цепи длиной примерно в 1300 аминокислотных остатков и представляет собой мультидоменный белок, образованный 8 иммуноглобулиновыми и 3 фиброниктиновыми доменами, обозначаемыми от С0 на N-конце до С10 на С-конце молекулы [262].

Функции N- и С-конца различны. N-конец регулирует взаимодействие миозина с актином, а С-конец выполняет структурную роль, упорядочивая молекулы миозина в толстом филаменте [55]. С-белок связывает миозин в двух местах: С-конец (домены С7-С10) связывает стержневую часть миозина (лёгкий меромиозин) и титин, а N-конец (домены С1-С2) – S2-фрагмент миозина [139, 277]. Линкерный участок между С0 и С1 доменом С-белка, содержащий большое количество пролина и аланина, связывает актин. С0 домен тоже способен связывать актин, но с гораздо меньшим сродством. Участок, соединяющий С1 и С2 домены С-белка, состоящий примерно из 100 аминокислотных остатков, несет три сайта фосфорилирования.

В последнее время наиболее интенсивно изучается сердечная изоформа С-белка (сМуВР-С), поскольку стало известно, что часть наследственных кардиомиопатий (*Familial Hypertrophic Cardiomyopathy - FHC*) связана с мутацией в сердечной изоформе С-белка [109]. Наследственная гипертрофическая кардиомиопатия является клинически и генетически

гетерогенной болезнью, которая наследуется как аутосомный доминантный ген. Морфологические изменения, сопровождающие болезнь следующие: гипертрофия кардиомиоцитов и беспорядочные внутритканевые фиброзы. Наследственная гипертрофическая кардиомиопатия является причиной сердечной недостаточности и внезапной остановки сердца. Наследственную гипертрофическую кардиомиопатию в чистом виде вызывают более 150 мутаций в 11 генах, которые кодируют белки саркомера, а в 85% случаев мутация содержится в MYBPC3 и MYH7, кодирующих миозин-связывающий белок С и β -тяжелую цепь миозина, соответственно [109].

Вторая важная причина наиболее интенсивного изучения сердечной изоформы С-белка заключается в том, что появился ряд работ, в которых показано, что миозин-связывающий белок С, традиционно считавшийся структурным компонентом толстого филамента, может принимать участие в регуляции сокращений сердечной мышцы.

В настоящее время влияние сердечной изоформы С-белка на характеристики актин-миозинового взаимодействия изучены не полностью. В работах Hartzell и Yamamoto [143, 301] было показано, что сердечная изоформа С-белка усиливает актин-активируемую АТФазную активность сердечного миозина, но на базальную способность миозина (в отсутствие в растворе актина) гидролизовать АТФ С-белок не влияет.

Влияние С-белка на актин-активируемую АТФазную активность, а также на кальций-чувствительную актин-миозиновую АТФазную активность сердечных изомиозинов V1 и V3 не исследовалось, в отличие от влияния фосфорилирования С-белка на кальций-чувствительную актин-миозиновую Mg-АТФазную активность. Так, в работе Robbins [53] использовались мыши, экспрессирующие мутантную форму С-белка с делецией девяти аминокислотных остатков в линкерном участке, соединяющим С1 и С2 домены С-белка. Такой белок не мог быть фосфорилирован. Миофибриллы, выделенные из миокарда таких мышей обладали большей кальций-

чувствительной актин-миозиновой Mg-АТФазной активностью, чем миофибриллы из миокарда не трансгенных мышей [50, 53].

С помощью коседиментационных экспериментов в работах Warshaw и Moss [52] было показано, что сердечная изоформа С-белка связывает скелетный F-актин дозо-зависимым образом, но исследования с сердечной изоформой F-актина не проводились. Известно, что сердечная изоформа G-актина отличается от скелетной четырьмя аминокислотными заменами в молекуле: две аминокислотные замены в N-терминальной части молекулы (положения 2 и 3 содержат глутамин) и две замены в C-терминальной (положения 299 и 358). Поэтому можно ожидать различных результатов связывания сердечного С-белка с сердечным и скелетным актином. В недавней работе группы Harris [222], в которой проводились исследования взаимодействия четырех N-терминальных доменов С-белка с F-актином, было показано, что эти домены не равнозначны по силе взаимодействия с F-актином. Оказалось, что определяющим звеном во взаимодействии С-белка с F-актином оказались С1 и С2 домены, а также m-домен (линкер между С1 и С2). В дальнейших экспериментах в данной работе авторы использовали пептид, состоящий только из этих доменов. При исследовании влияния кальция на взаимодействие данного пептида с регулируемым тонким филаментом было показано, что кальций не влияет на взаимодействие С1-m-С2 доменов С-белка с регулируемым тонким филаментом. Однако следует отметить, что исследований взаимодействия полноразмерной сердечной изоформы С-белка с регулируемым тонким филаментом не проводилось.

В работе Yamamoto с соавт. [300] с использованием скелетной изоформы С-белка, а также актина, тропонина и тропомиозина было показано, что связывание С-белка с тонким филаментом зависит от кальция. Так, в отсутствие кальция С-белок значительно меньше связывается с тонким филаментом, чем в его присутствии. Исследований связывания сердечной изоформы С-белка с тонким филаментом (состоящим из сердечных изоформ актина, тропомиозина и тропонина) не проводилось. С помощью методики

низкоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронных пучков были получены данные по относительному расположению N-терминальных доменов миозин-связывающего белка С (C0-C2) на F-актине [55]. Оказалось, что C0 и C1 домены С-белка взаимодействуют с Dnase I - связывающей петлёй одного мономера актина и субдоменом 1 соседнего мономера актина в филаментарном актине. На основании полученных данных авторы предсказывают взаимодействие C0 и C1 доменов С-белка с тропомиозином, которое влияет на активацию тонкого волокна, особенно при низком кальции.

Предполагается, что С-белок модулирует кальциевую чувствительность филамента [150, 159, 186, 189]. В частности, в исследованиях Hofmann и др. [150] было показано, что при экстракции до 60-70% С-белка из кардиомиоцита активное напряжение при субмаксимальной концентрации кальция увеличивалось, наклон связи « pCa -напряжение» уменьшался, указывая на то, что кооперативность кальциевой активации уменьшается. Добавление С-белка к кардиомиоциту, из которого С-белок был предварительно экстрагирован, практически восстанавливало как активное напряжение, так и наклон связи « pCa -напряжение».

Участие мутаций С-белка в генезе семейной гипертрофической кардиомиопатии было экспериментально доказано моделированием её развития на мышцах, нокаутных по гену С-белка. Отсутствие С-белка в сердце таких мышечей приводило к гипертрофической кардиомиопатии [189, 158], которая характеризовалась утолщением стенки левого желудочка и фиброзом. Функциональные нарушения сократимости миокарда таких мышечей выражались в уменьшении фракции выброса и максимальной конечно-систолической жесткости левого желудочка при отсутствии изменений в максимальной скорости развития напряжения [189].

Сегодня С-белок изучается в различных аспектах, включая гипертрофическую кардиомиопатию, структуру и функцию саркомера как в норме, так и при патологии [236, 248]. С-белок рассматривается в качестве

потенциального диагностического биомаркера инфаркта миокарда и прогностического маркера сердечной недостаточности [51, 248].

Результаты исследований влияния С-белка на регуляцию сокращений в экспериментах на трабекулах, изолированных из миокарда нокаутных по гену С-белка мышей, оказались крайне противоречивыми. Так, одни и те же авторы на одной и той же модели нокаутных мышей в разных работах демонстрируют различное, и даже противоположное влияние С-белка как на кальциевую чувствительность, так и коэффициент Хилла связи « pCa -сила» [80, 264]. Такие противоречия объясняли тем, что при отсутствии С-белка в кардиомиоците могут запускаться различные компенсаторные процессы, такие, как сдвиг в изоформах сердечного миозина, а также изменение степени фосфорилирования белков саркоплазматического ретикулума [57]. Все же, значительная часть результатов свидетельствует о том, что при отсутствии С-белка в мышце происходит увеличение кальциевой чувствительности и уменьшение коэффициента Хилла [158, 186]. В работе из лаборатории Moss'a [264] также было показано влияние С-белка на популяцию сильно-связанных мостиков.

Исследований роли сердечной изоформы С-белка в искусственных подвижных системах не так много. В большинстве работ в качестве моторного белка использовали скелетный миозин. Так в исследованиях в лабораториях Warshaw [52] и Harris [222] было показано, что присутствие С-белка в проточной камере уменьшает скорость движения как регулируемого, так и нерегулируемого филамента дозо-зависимым образом. В работе Saber с соавт. [52] при исследовании влияния С-белка на зависимости « pCa -скорость» и « pCa -сила» найдено, что С-белок увеличивает кальциевую чувствительность соотношения « pCa -скорость», но не влияет на коэффициент Хилла. Что касается соотношения « pCa -сила», то С-белок уменьшает кальциевую чувствительность и негативно влияет на кооперативность (в несколько раз уменьшался коэффициент Хилла).

В работе группы профессора Lecarpentier [58], единственной, где использовался *сердечный* С-белок вместе с *сердечным* миозином, не исследовалось влияние С-белка на регуляцию сокращений. Было показано, что присутствие С-белка приводило к увеличению скорости движения актинового филамента. При исследовании влияния С-белка на генерацию силы поперечными мостиками миозина было найдено, что при отсутствии С-белка в камере относительная сила, оцененная по концентрации актин-связывающего белка α -актинина, падала в несколько раз по сравнению с присутствием С-белка. Авторы также изучали влияние фосфорилирования С-белка как на скорость движения актинового филамента, так и на относительную силу, генерируемую головками миозина. Фосфорилирование С-белка не приводило к изменению скорости движения актинового филамента, но значительно увеличивало силу, генерируемую головками миозина.

Таким образом, вопрос о возможном влиянии С-белка на регуляцию сократительной активности миокарда оставался в значительной степени открытым.

Данные о влиянии С-белка на регуляцию сократительной активности, с одной стороны, и на кинетику популяции поперечных мостиков (см. выше), с другой, наводят на мысль о том, что влияние С-белка на регуляцию связано с механизмом мостиково-тропониновой кооперативности ($Xb-CaTnC$) и это влияние может быть различно при доминировании той или иной изоформы сердечного миозина (V1 и V3) в кардиомиоците. В таком случае можно предположить, что С-белок специфически влияет на регуляцию сократительной активности в зависимости от изоформ сердечного миозина.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным методом исследования вклада изоформ белков саркомера в кальциевую регуляцию сокращений миокарда был метод искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом: в качестве моторных белков использовались изоформы сердечного миозина кролика, регулируемый тонкий филамент состоял из филаментарного актина и тропомиозина с тропониновым комплексом. В исследовании также использовались метод определения АТФазной активности и метод оптической ловушки.

2.1. Получение мышечных белков

Получение сердечного миозина

Миокард левого желудочка гипертиреоидных кроликов содержит преимущественно изоформу миозина V1, гипотиреоидных – изоформу миозина V3 [60, 148]. Для получения чистых изоформ сердечного миозина применялась описанная ниже медикаментозная обработка кроликов.

Гипертиреоидизм достигался внутримышечной инъекцией L-тироксина (0,2 мг/кг; Sigma) 2-х месячным кроликам весом 1,5 кг в течение двух недель, гипотиреоидизм – добавлением пропилтиоурацила (0,8 мг/мл; Sigma) в питьевую воду кроликам в течение трех недель [60] После окончания этой медикаментозной обработки выделяли сердечную ткань левого желудочка и быстро замораживали в жидком азоте. Материал хранился при температуре -86 °C в течение 4-6 месяцев.

Все операции по выделению миозина проводили при температуре 4 C [193]. Сердечную ткань из левых желудочков измельчали и растирали в соотношении 1:10 (вес/объем) в растворе, содержащем 20 мМ фосфатного буфера, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 2 % тритона X-100, 5 мМ дитиотрейтола, 0,5 мМ фенилметилсульфонил флуорида, pH 6,5, в течение 10 мин. Затем полученную смесь центрифугировали в течение 20 мин при 10000 g. Осадок в течение 30 мин экстрагировали эквивалентным количеством (вес/объем)

буфера следующего состава: 1 М КСl, 40 мМ фосфатного буфера, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, рН 6,5. Смесь центрифугировали в течение 20 мин при 10000 g. Экстракция проводилась повторно в течение 10 минут. К объединенному супернатанту добавлялся 9-кратный объем деионизированной воды на 1 час для осаждения миозина. После центрифугирования осадок миозина растворялся эквивалентным объемом (вес/объем) высокоионного буфера: 1 М КСl, 40 мМ фосфатного буфера, 4 мМ MgCl₂, рН 6,5. Для хранения миозин перемешивался с охлажденным до 4 °С глицерином в соотношении 1 : 1 (по объему) и хранился при –20° С.

В день эксперимента смесь миозина с глицерином перемешивали с деионизированной водой в соотношении 1 : 10. Через 1 час миозин осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 20 мин и растворяли эквивалентным объемом высокоионного буфера АВ (вес/объем): 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 500 мМ КСl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, рН 7,5. В день эксперимента неработающие молекулы миозина удаляли с помощью следующего метода [46]. В раствор миозина добавляли филаментарный актин в молярном соотношении 1:1,5 и АТФ до концентрации 2 мМ, смесь центрифугировали в течение 20 мин при 60000 g (ротор TLA 120.1, центрифуга OPTIMA TLX Beckman Coulter). При этом молекулы миозина, имеющие поврежденные головки, необратимо связанные с филаментарным актином, осаждались, а в растворе оставались только неповрежденные молекулы миозина. Полученный таким образом миозин использовался в течение одного экспериментального дня.

Получение актина

Для исследований использовался скелетно-мышечный актин кролика.

Актин выделяли из ацетонового порошка по методу Pardee [230] с незначительными модификациями.

Ацетоновый порошок получали из *m. latissimus dorsi* кролика калифорнийской породы по методу Pardee [230] с незначительными модификациями.

Выделенные мышцы помещали на лед на 30 мин. Затем из них тщательно удаляли соединительную, жировую ткань, кровеносные сосуды, и с помощью мясорубки перемалывали в фарш.

Фарш в течение 15 минут при перемешивании экстрагировали раствором Губа–Штрауб: 0,3 М КСl, 0,1 М КН₂РО₄, 0,05 М К₂НРО₄, 0 1 М ЭГТА, 1 мМ ДТТ, рН 6,5 (300 мл раствора на 100 г фарша). Осадок после центрифугирования (20 мин при 5000 g) использовался для получения ацетонового порошка.

Осадок перемешивали с 1 л 0,05 М NaHCO₃ в течение 10 мин, после чего жидкость удалялась с помощью центрифугирования. Затем эта процедура повторялась с 1 л 1 мМ ЭДТА, рН 7,0. Далее осадок промывали деионизированной водой дважды по 5 мин. После центрифугирования осадок 4 раза на 10 мин заливали 500 мл ацетона до исчезновения мути. Все растворы были охлаждены до температуры 4 °С. Высушивали порошок при комнатной температуре в вытяжном шкафу в течение ночи.

Полученный ацетоновый порошок хранился в морозильнике при –20 °С в течение нескольких лет.

Все операции по получению актина проводились при температуре 4 °С. Актин экстрагировали из ацетонового порошка в течение 30 мин при перемешивании в буфере А следующего состава: 2 мМ Трис-НСl, 0,2 мМ Na₂АТФ, 0,2 мМ СаСl₂, 0,005 % NaN₃, 0,5 мМ ДТТ, рН 8,0 (на 1 г ацетонового порошка – 20 мл буфера).

Экстракт центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин.

Повторную экстракцию проводили при тех же условиях в течение 10 мин. Реэкстракт и экстракт смешивали и центрифугировали при 80000 g в течение 60 мин. Супернатант фильтровали через фильтр Whatman®54 22 мкм.

Для полимеризации актина концентрацию KCl в супернатанте увеличивали до 50 мМ, MgCl₂ – до 2 мМ, АТФ – до 1 мМ. Время полимеризации составляло не менее 2 часов.

Для осаждения тропомиозина в раствор полимеризованного актина медленно (в течение 30 мин.) добавляли при перемешивании твердую соль KCl до конечной концентрации 0,8 М. При этом рН раствора поддерживался на уровне 8,3-8,5.

Полимеризованный актин центрифугировали в течение 1 часа при 300000 g (ротор TLA 120.1, центрифуга OPTIMA TLX Beckman Coulter). Осадок тщательно промывали буфером А и перерастворяли этим же буфером (3 мл буфера на 1 г первоначального веса ацетонового порошка).

Для деполимеризации актин диализовали против буфера А в течение 24 часов. Для осаждения недеполимеризовавшегося актина раствор центрифугировали в течение 1 часа при 300000 g.

Актин замораживали жидким азотом небольшими порциями и хранили при –20 °С в течение 6 месяцев.

Полимеризовали актин, повышая концентрацию KCl в растворе до 50 мМ, MgCl₂ – до 1 мМ, АТФ – до 1 мМ. Температура раствора 4 °С. Время полимеризации 12 часов.

Для получения меченого актина использовали тетраметилродамин-фаллоидин (ТМРФ; Sigma-Aldrich Company Ltd.). ТМРФ растворяли в метаноле и замораживали порционно по 4 мкМ на пробирку. Свежеприготовленный филаментарный актин разводили до концентрации 2 мкМ и добавляли в размороженную пробирку с ТМРФ. Полученный раствор оставляли на 12-20 часов при 4 °С для окрашивания F-актина. При хранении при температуре 4-8 °С меченый актин сохраняет свои свойства в течение нескольких месяцев.

Получение сердечного тропонина

Сердечный тропонин выделяли из ацетонового порошка по методу Potter [234] с небольшими модификациями.

Ацетоновый порошок из левого желудочка сердца быка получали по методике, аналогичной получению ацетонового порошка из скелетных мышц. Тропонин экстрагировали в течение 2 часов в буфере: 1 М КСl, 25 мМ Трис-НСl, рН 7,0, 0,1 мМ ДТТ в соотношении 20 : 1 (объем /вес). Экстракт центрифугировали в течение 20 мин при 10000 g. Осадок перерастворяли в том же буфере в соотношении 7,5 : 1 (объем/вес первоначального порошка) и снова центрифугировали в течение 10 мин при 11000 g. Значение рН объединенного супернатанта повышали до 8,0 с помощью 1 Н КОН и затем в раствор медленно добавляли сульфат аммония до концентрации 30 % насыщения (167 г соли на 1 л раствора) в течение 1 часа при постоянном перемешивании и контроле значения рН. После центрифугирования в течение 15 мин при 11000 g в супернатант медленно, в течение 1 часа, добавляли сульфат аммония до концентрации 42,5 % насыщения при постоянном перемешивании (73 г (NH₄)₂SO₄ на 1 л раствора). Значение рН поддерживали в пределах 7,0 - 8,0. Смесь центрифугировали 15 мин при 11000 g. Осадок сердечного тропонина растворяли в минимальном объеме буфера (10 мМ имидазола, рН 7,0, 50 мМ КСl, 0,1 мМ СаСl₂, 0,1 мМ ДТТ, 0,02 % NaN₃) и диализовали в течение 12 часов против этого же буфера.

Тропонин замораживали небольшими порциями в жидком азоте и хранили при -86 °С. Тропонин использовали в течение 4 месяцев.

Хроматографическая очистка тропонина не применялась, т.к. было показано [46], что стабильность тропонина после нее уменьшается.

Получение сердечного тропомиозина

Тропомиозин был получен из ацетонового порошка из сердца быка по методу Smillie [258] с небольшими модификациями.

Тропомиозин экстрагировали в течение ночи в соотношении 10 : 1 (объем/вес) в буфере: 1 М КСl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,0, 0,1 мМ ДТТ. После центрифугирования в течение 15 мин при 10000 g проводили повторную экстракцию тем же самым буфером в соотношении 7 : 1 в течение 2 часов.

После центрифугирования (15 мин при 10000 g) значение pH комбинированного экстракта доводили 1 N HCl до 4,6 при перемешивании в течение 30 минут. После центрифугирования (15 мин при 10000 g) осадок перерастворяли буфером для экстракции в соотношении 10 : 1 к весу ацетонового порошка, при этом значение pH поддерживали равным 7,0. Далее повторялась изоэлектрическая преципитация при pH 4,6. Финальный осадок растворяли трис-буфером (10 mM Трис-HCl, 0,01 % NaN_3 , 0,1 mM ДТТ, pH 7,0) в соотношении 15 : 1. Добавляли сульфат аммония до концентрации 53 % насыщения (31,2 г на 100 мл) при pH 7,0 в течение 30 мин. Раствор центрифугировали 20 мин при 10000 g. Супернатант приводили к 65 % насыщающему раствору твердой солью (7,34 г/100 мл) при pH 7,0 с 1,0 M NaOH. Раствор центрифугировали 20 мин при 10000 g. Финальный осадок растворяли трис-буфером в соотношении 1 : 1 (вес первоначально взятого порошка к объему буфера) и диализовали в течение 12 часов против этого же буфера.

После диализа тропомиозин замораживали небольшими порциями в жидком азоте и хранили при $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$. Тропомиозин использовали 4 месяца.

Тропомиозин использовали без финальной очистки с помощью хроматографии, поскольку было показано [46], что использование очищенного или неочищенного тропомиозина не влияет на результаты в методе искусственной подвижной системы.

Все операции при получении актина, тропонина и тропомиозина проводились при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Получение сердечного миозин-связывающего белка С

Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С, С-белок) был получен из куриных сердец по методу Hartzell и Glass [144] с небольшими модификациями. После экстракции сМуВР-С осаждался сульфатом аммония до финального насыщения 55% и растворялся буфером, содержащим 70 mM KCl, 10 mM MES, 2 mM NaN_3 , 0,1 mM ЭДТА, 3 mM 2-меркаптоэтанола,

pH 6,45, и диализовался против этого же буфера. После диализа сMyBP-C был очищен с помощью жидкостной хроматографии на 5-ml HiTrap Q HP колонке (AKTA basic 10 FPLC, Amersham Biosciences) с линейным градиентом от 70 mM до 300 mM NaCl в буфере следующего состава (10 mM MES, 2 mM NaN₃, 0,1 mM ЭДТА, 3 mM 2-меркаптоэтанола, pH 6,45. сMyBP-C), который элюировал в области 90-130 mM по NaCl, концентрировали добавлением сульфата аммония с последующим центрифугированием при 15000 g в течение 15 минут. Осажденный сMyBP-C растворяли буфером АВ, содержащим 80 mM KCl, и диализовали против этого же буфера.

Также следует отметить, что наша модификация методики Hartzell [144] с применением одной стадии хроматографии вместо двух значительно ускоряет процесс получения сMyBP-C. Данные модификации методики [59] позволили нам получать минорный белок кардиомиоцита сMyBP-C в достаточном для исследования количестве с концентрацией 2-4 мг/мл из небольшого количества миокарда.

2.2. Оценка чистоты полученных белков с помощью геля электрофореза

Проверка состава тяжелых цепей миозина

Проверка состава тяжелых цепей миозина проводилась при помощи геля электрофореза.

Вертикальный денатурирующий полиакриламидный гель электрофорез (ПААГ) с додецил сульфатом натрия проводился по опубликованной методике [132, 293] с небольшими изменениями. Использовался гель размером 160 × 200 × 0,75 мм. Концентрация акриламида была 12 % для разделительного геля (отношение акриламид/бисакриламид 200 : 1) и 3,5 % для концентрирующего геля (отношение акриламид/бисакриламид 20 : 1). Разделительный гель содержал 0,75 M трис буфера, pH 9,3, 10 % глицерина, 0,1 % додецил сульфата натрия. Концентрирующий гель содержал 0,125 M трис буфера, pH 6,8, 10 % глицерина, 0,1 % додецил сульфата натрия. Пробы

миозина растворялись в буфере, содержащем 625 мМ трис-НСl, рН 6,8, 15 мМ дитиотрейтола, 0,1 мМ фенолметилсульфонил флуорида, 1 % додецил сульфата натрия, 0,01 % бромфенолового голубого, 15 % глицерина. Загружалось по 0,8 мкг белка. Электрофорез проводился при постоянной силе тока 24 мА в течение 5 часов при температуре 15 °С.

Окрашивание серебром. После электрофореза гель помещался на 3 мин в 1 % раствор азотной кислоты, потом быстро промывался водой. Окрашивание проводилось 0,012 М раствором нитрата серебра в течение 15 мин, затем гель быстро промывали водой. Проявление осуществлялось в растворе, содержащем 0,28 М Na_2CO_3 и 0,019 % формальдегида. Проявляющий раствор заменялся 10 % уксусной кислотой на 5 мин. Далее следовала промывка водой в течение 10 мин. На всех этапах использовалась деионизированная вода.

Для определения процентного соотношения α - и β -тяжелых цепей миозина в пробе гели сканировались с помощью денситометра и программного обеспечения TDS Quantity фирмы BioRad.

Оценка чистоты актина и регуляторных белков

Оценку чистоты актина и регуляторных белков проводили с помощью денатурирующего полиакриламидного геля электрофореза с додецил сульфатом натрия (SDS) по Laemmli [182] в 10 % разделительном геле.

2.3. Определение концентрации белков

Концентрацию миозина после выделения из сердечной мышцы определяли спектрофотометрическим способом, коэффициент экстинкции миозина $0,53 \text{ см}^{-1}$.

Концентрацию миозина после очистки от неработающих головок определяли по методу Bradford [39]. В качестве стандартного белка использовался сердечный миозин быка.

Концентрацию актина определяли спектрофотометрическим способом по разнице поглощения раствора на длинах волн 290 и 310 нм, коэффициент экстинкции $0,62 \text{ см}^{-1}$ [230].

Для определения концентрации тропонина и тропомиозина использовали коэффициенты экстинкции $0,45 \text{ см}^{-1}$ и $0,29 \text{ см}^{-1}$, соответственно, на длине волны 276 нм [46].

2.4. Реконструкция регулируемого тонкого филамента

Тонкий филамент реконструировали путем смешивания актина, тропонина и тропомиозина в следующих концентрациях: 400 нМ родамин-фаллоидин окрашенного F-актина, 80 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина при $4 \text{ }^\circ\text{C}$ в буфере: 25 мМ KCl, 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ, $\text{pH } 7,5$ [46, 47]. Время инкубации филамента до его использования различно у разных авторов [46, 47, 120]. Так, некоторые авторы [46, 47] ставили филаменты на инкубацию на ночь, в то время как другие [120] инкубировали тонкие филаменты только 30-60 минут. По нашим наблюдениям тонкие филаменты собираются буквально сразу же после смешивания, мы инкубировали их в течение 30 мин.

Проверка содержания актина, тропонина и тропомиозина в тонких нитях проводилась с помощью SDS гель-электрофореза по Laemmli [182] в 10 % разделительном геле.

2.5. Определение АТФазной активности миозина

АТФазная активность миозина определялась по методу Kodama [175] с некоторыми модификациями. Метод основан на определении свободного неорганического фосфата в растворе с использованием реактива малахитового зеленого, содержащего 2 г Na_2MoO_4 , 0,3 г малахитового зеленого и 0,5 г Triton X-100 в 1 л $0,7 \text{ M HCl}$. Все измерения АТФазной активности проводились при $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Эксперименты с растворами мышечных белков по определению АТФазной активности миозина обычно выполняются при низкой концентрации актина и высокой ионной силе или при низкой ионной силе и высокой концентрации актина. В экспериментах с растворами белков используют ТММ (тяжёлый меромиозин) или S1 (субфрагмент 1 миозина), потому что миозин при нормальной ионной силе (0,1-0,2 М) полимеризуется и осаждается [10], а субфрагменты миозина растворимы в воде. Мы определяли АТФазную активность миозина при низкой ионной силе раствора и высокой концентрации актина. Предварительно миозин был полимеризован при низкой ионной силе (100 мМ КСl).

Актин-активируемую Mg^{2+} -АТФазную активность миозина определяли по свободному фосфату в буфере следующего состава: 25 мМ имидазола, 4 мМ $MgCl_2$, 25 мМ КСl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, рН 7,5. Проба объемом 0,25 мл содержала F-актин в концентрации от 0,5 до 25 мкМ (по G-актину) и 0,05 мкМ головок миозина. Реакцию запускали добавлением 2 мМ АТФ. Через 2 мин реакцию останавливали добавлением 0,25 мл 5,25 % $HClO_4$, что приводило к выпадению белка в осадок. Пробы центрифугировали 1-2 мин при 10000 g, доводили деионизированной водой до объема 500 мкл и проводили определение свободного фосфата. Для этого к смеси добавляли 500 мкл реактива малахитового зеленого и инкубировали 20 мин при 28 °С.

После развития окраски измерялась абсорбция смеси на длине волны 680 нм, определялась концентрация свободного фосфата и рассчитывалась АТФазная активность миозина, которая выражалась как количество микромолей гидролизованной АТФ на 1 головку миозина за 1 секунду.

Актин-активируемая АТФазная активность миозина имеет гиперболическую зависимость от концентрации актина [107] и может быть описана уравнением:

$$V = V_{\max}[\text{Actin}]/(K_m + [\text{Actin}]), \quad (3)$$

где V – скорость гидролиза АТФ миозином в присутствии актина, V_{\max} – экстраполированное значение скорости гидролиза АТФ при насыщающей

концентрации актина, K_m – концентрация актина, при которой скорость АТФазной реакции достигает половины своего максимального значения (константа диссоциации актина от миозина в присутствии АТФ).

Основные параметры кинетики Михаэлиса-Ментен определялись с помощью графика двойных обратных координат (графика Лайнуивера-Бэрка) [6], были получены значения V_{max} и K_m для актин-активируемой АТФазной активности изоформ сердечного миозина.

Определение регулируемой Mg^{2+} -АТФ-азной активности миозина проводится в присутствии тонкого филамента, т.е. актиновый филамент содержит тропомиозин и тропониновый комплекс. Поэтому, когда в растворе нет свободного кальция, Mg^{2+} -АТФ-азная активность филаментов сердечного миозина отсутствует. С увеличением концентрации свободного кальция Mg^{2+} -АТФ-азная активность филаментов сердечного миозина увеличивается. Реакционная смесь при определении Ca^{2+} -регулируемой АТФазной активности миозиновых филаментов содержала следующие концентрации белков: 0,05 мкМ миозиновых филаментов (по миозину), от 0,01 мкМ до 0,1 мкМ сМуВР-С; 10 мкМ актина, 2 мкМ тропомиозина и 2 мкМ тропонина. Для наших экспериментов мы взяли две характерные концентрации свободного кальция в растворе: ненасыщающую ($pCa7$) и насыщающую ($pCa4$).

Необходимая концентрация свободного кальция достигалась добавлением в финальный раствор, содержащий АТФ, соответствующего количества $CaCl_2$, которое было рассчитано с помощью свободно доступной в интернете программы WEBMAXC STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>).

Во всех экспериментах по измерению Mg^{2+} -АТФазной активности миозина с С-белком миозиновые филаменты предварительно инкубировались в течение 2 мин с С-белком в соотношении молярных концентраций сМуВР-С к миозину: 1:5, 1:2, 1:1 и 2:1.

2.6. Метод оптической ловушки

Метод использовался для определения механических и кинетических характеристик взаимодействия *одиночных* молекул изоформ сердечного миозина с актином. Суть метода оптической ловушки в следующем. Луч лазера, сфокусированный высокоапертурным объективом, способен захватывать и удерживать в фокусе микроскопические объекты, образуя «оптическую ловушку» (английские термины: *optical trap* или *optical tweezers*) [29, 112]. На основе этого явления была создана установка для исследования механических характеристик одиночных молекул миозина [213]. В наших экспериментах лазерная оптическая ловушка использовалась для удержания в растворе двух полистироловых шариков диаметром 1 мкм, покрытых NEM-миозином, который служит «клеем», необратимо связывая филаментарный актин (рисунок 1). Флуоресцентно окрашенная актиновая нить крепилась к этим шарикам и растягивалась между ними смещением одного из лучей с помощью двухкоординатного акусто-оптического дефлектора. К поверхности проточной камеры прикреплялись стеклянные шарики большего диаметра (1,7 мкм), которые использовались как пьедестал для миозина, свойства которого мы изучаем. Актиновая нить с помощью микроманипулятора подводилась к пьедесталу с моторным белком, где в присутствии АТФ происходило актин-миозиновое взаимодействие. По смещению положения шариков, регистрируемого квадрантными фотодиодами, записывали одиночные взаимодействия молекулы миозина с актиновой нитью, или «события», сопровождающиеся отклонением шариков из фокуса луча. Из статистического распределения величин событий в зависимости от используемого режима работы ловушки, то есть с обратной связью или без неё, определяли, соответственно, либо среднюю силу, либо размер шага одиночных молекул миозина, а также продолжительность их взаимодействия.

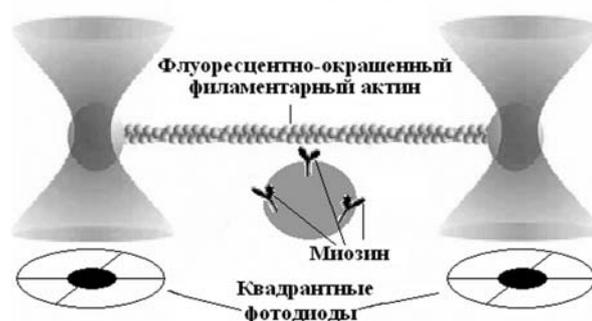


Рисунок 1 – Принципиальная схема метода оптической ловушки.

Экспериментальная установка

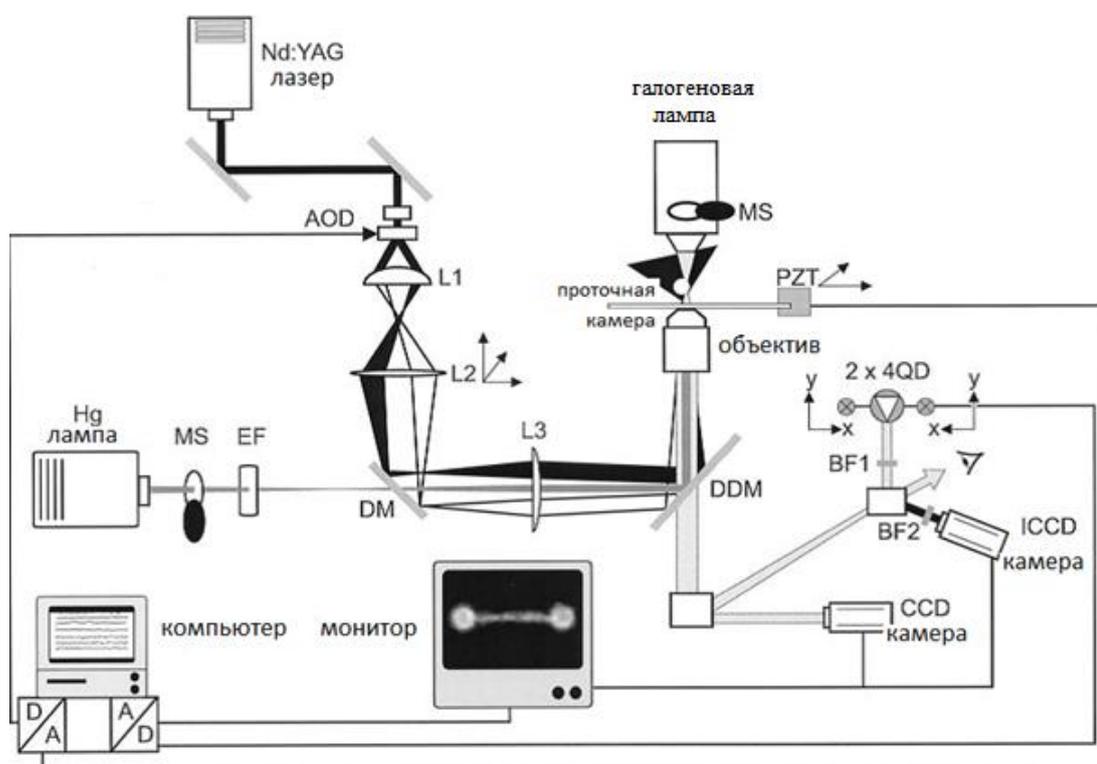


Рисунок 2 – Блок-схема установки оптической ловушки.

Для установки (рисунок 2) был использован инвертированный эпифлуоресцентный микроскоп (Axiovert 135; Zeiss, Germany) [213]. Луч инфракрасного лазера с диодной накачкой Nd:YAG (Atlas Model 321, Germany; длина волны 1064 nm) объединяется с прошедшим через узкополосный фильтр (EF 5 546FS10.25; Andover Corp., Salem, NH) излучением ртутной лампы, возбуждающим флуоресценцию родамина, с

помощью «горячего зеркала» (DM 5 820DCSP; Omega Optical, Brattleboro, VT). Оба луча входят в эпифлуоресцентный порт микроскопа. Дихроическое зеркало (DDM 5 570DCLP, Omega, Optical, Brattleboro, VT) отражает возбуждающий свет (546 нм) и излучение лазера (1064 нм), но пропускает флуоресценцию родамина на 570 нм, что позволяет одновременно удерживать шарики в оптической ловушке и наблюдать флуоресценцию актиновой нити. Настройка лазерного луча осуществляется с помощью двух зеркал, а положение ловушки контролируется двумя ортогонально расположенными окусто-оптическими дефлекторами (TeO_2 кристаллы N45035-3-6.5 DEG-1,06; драйвер N64010–1002ASDFS-2; NEOS Technologies). Для создания двух оптических ловушек луч переключали между двумя x -у координатами с частотой 10 кГц. Для грубой установки положения экспериментальной камеры использовалась моторизованная подача, для точной – трехкоординатная пьезоэлектрическая платформа (PZT). Положения ловушек регистрировали четырехквadrантными фотодиодами (2 x 4QD 5 S1557, Hamamatsu Photonics, Japan) [213]. Проекция шариков разделяли с помощью призмы, каждая из них проецировалась на свой четырехквadrантный фотодиод. Отраженное рассеяние лазерного луча блокировалась барьерным фильтром (BF1). Флуоресценция актина регистрировалась интенсифицированной CCD камерой (Photon-P46036A; EEV, Chelmsford, UK) через узкополосный фильтр (BF2 5 LP590; Zeiss). Светлопольное освещение (100 Вт галогеновая лампа) использовалось для получения увеличенного изображения шариков ловушки и шариков на покровном стекле (CCD camera, P46310; EEV). Желаемое увеличение достигалось с помощью объектива Acroplan 1003, 1,3 N.A. и дополнительной линзы Optovar 2,53 в оптическом канале. Для выбора светлопольного или флуоресцентного режима использовался механический переключатель [213].

Конструкция проточной камеры

Для экспериментов использовалась распространенная конструкция проточной камеры. На предметное стекло клеили две полоски двухстороннего скотча толщиной около 0,1 мм и шириной около 5 мм, к которым крепилось покровное стекло, покрытое с одной стороны нитроцеллюлозой таким образом, чтобы нитроцеллюлозная поверхность оказалась внутри камеры. Раствор нитроцеллюлозы готовился следующим образом: нитроцеллюлозу растворяли в ацетоне до концентрации 1 %, затем этот раствор разбавляли амилацетатом до концентрации 0,05 %. 1 мкл 0,05 % раствора нитроцеллюлозы наносили на покровное стекло с одной стороны и размазывали его кончиком микропипетки движением в одном направлении.

Протокол эксперимента

Растворы.

1. Высокоионный буфер АВ содержал: 25 мМ имидазола, 4 мМ $MgCl_2$, 500 мМ КСl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, рН 7,5.

2. Буфер АВ содержал: 25 мМ имидазола, 4 мМ $MgCl_2$, 25 мМ КСl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, рН 7,5.

Изомиозины V1 и V3 растворяли до концентрации 1 мкг/мл в высокоионном буфере АВ. Проточная экспериментальная камера заполнялась в следующей последовательности:

- 50 мкл миозина в концентрации 1 мкг/мл на 2 минуты,
- 50 мкл 0,5 мг/мл БСА в АВ буфере на 1 минуту,
- 50 мкл буфера АВ, содержащего также кислород поглощающую систему (глюкоза 3,5 мг/мл, каталаза 0,02 мг/мл, глюкозо-оксидаза 0,15 мг/м), 1,5, 5 или 10 мкМ АТФ, 1 мкМ покрытых NEM-миозином флуоресцентных шариков (Sigma) и 1нМ скелетного F-актина, окрашенного родамин-фаллоидином [281].

Предметное стекло с заполненной проточной камерой помещаем на предметный столик микроскопа. На экране монитора можно наблюдать

единичные флуоресцентно окрашенные полистироловые шарики и нити актина. Перемещением предметного стола микроскопа шарики «ловим» в оптические ловушки, затем сначала к одному шарiku, а потом к другому прикрепляем флуоресцентно окрашенную актиновую нить. Получается собранная так называемая «гантель» - два шарика и между ними нить актина. Перемещением одной из ловушек нить актина растягиваем между шариками. Переключателем режим работы микроскопа переводим в светлопольный. Находим на поверхности проточной камеры шарик большего диаметра, который служит пьедесталом для миозина. Подводим с помощью микроманипулятора собранную «гантель» к шарiku и «сканируем» поверхность этого шарика в поисках молекулы миозина. При нахождении миозина регистрируем одиночные взаимодействия молекулы миозина с актиновой нитью, или «события».

Анализ результатов

На рисунке 3 показан пример экспериментальной записи, полученной методом оптической ловушки, и анализа этой экспериментальной записи. Бордовым цветом показаны взаимодействия одиночной молекулы миозина с актином («события»). Амплитуды одиночных перемещений миозином нити актина рассчитываются как разности среднего значения «события» и среднего значения соседних по отношению к «событию» (синяя линия) фрагментов записи, в которых отсутствовало прикрепление миозина к актину. Для оценки продолжительности актин-миозинового взаимодействия необходимо точно определить начало и конец «события». На нижней дорожке рисунка показано, как определение дисперсии и порога помогает упростить идентификацию начала и конца «события».

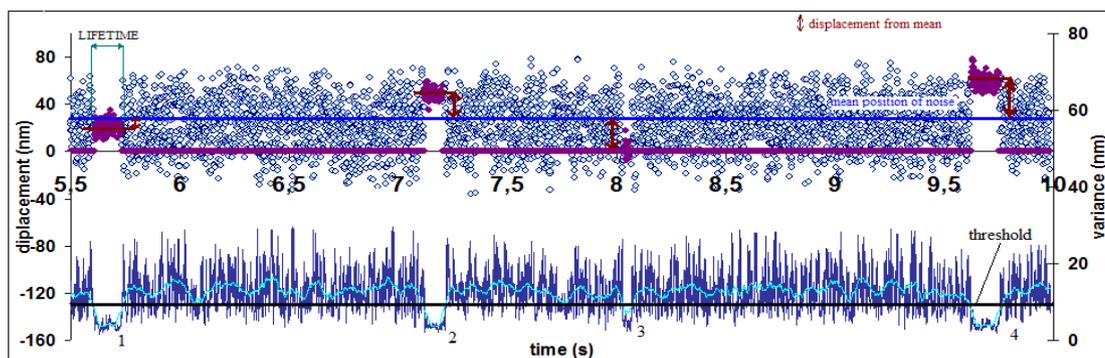


Рисунок 3 – Пример анализа экспериментальной записи, полученной методом оптической ловушки для изомиозина V3.

Примечание: верхняя дорожка – пример экспериментальной записи, показывающий взаимодействие молекулы миозина с актином («событие»). Стрелками показано смещение каждого «события» относительно средней позиции. Нижняя дорожка - дисперсия и порогой уровень. На данной дорожке идентифицировано четыре «события». Экспериментальная запись занимает 4.5 сек, данные получены при 1.5 М Mg.АТФ, 23°C.

2.7. Метод искусственной подвижной системы

Суть метода искусственной подвижной системы состоит в следующем. Исследуемый моторный белок, миозин, фиксируется на покрытой нитроцеллюлозой внутренней поверхности проточной камеры, которая устанавливается на предметном столике инвертированного флуоресцентного микроскопа. После этого в камеру заливается раствор без АТФ, содержащий филаментарный актин, окрашенный родамин-фаллоидином. Актин взаимодействует с миозином, образуя ригорный комплекс, в результате чего светящиеся актиновые нити укладываются на поверхности, и это позволяет настроить фокус объектива на эту поверхность. С помощью интенсифицированной видеокамеры, установленной на микроскопе, можно наблюдать нити актина и регистрировать их изображение. При добавлении в камеру раствора, содержащего АТФ, актин начинает двигаться по миозиновой поверхности. Видеоизображение движения флуоресцентно

окрашенных нитей филаментарного актина записывается на жесткий диск компьютера с помощью программного обеспечения для дальнейшей обработки. Используя специальное программное обеспечение, измеряется скорость скольжения актиновых нитей по поверхности, покрытой миозином или его протеолитическими фрагментами, такими как тяжёлый меромиозин или S1. Таким образом, этот метод позволяет изучать взаимодействие сократительных белков на молекулярном уровне, точнее, на уровне ансамблей молекул.

Экспериментальная установка

Для установки (рисунок 4) был использован инвертированный эпифлуоресцентный микроскоп (Axiovert 200 M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH), укомплектованный ртутной лампой HBO 100 и набором фильтров (Filter Set 20; Carl Zeiss) для флуорофора тетраметилродамина. Узкополосный зеленый фильтр 1 выделяет из излучения ртутной лампы свет с длиной волны 546 нм для возбуждения флуоресценции тетраметилродамина, который отражается в объектив дихроическим зеркалом. Флуоресценция тетраметилродамина на длине волны 575 нм проходит через дихроическое зеркало и дополнительно фильтруется эмиссионным фильтром 2.

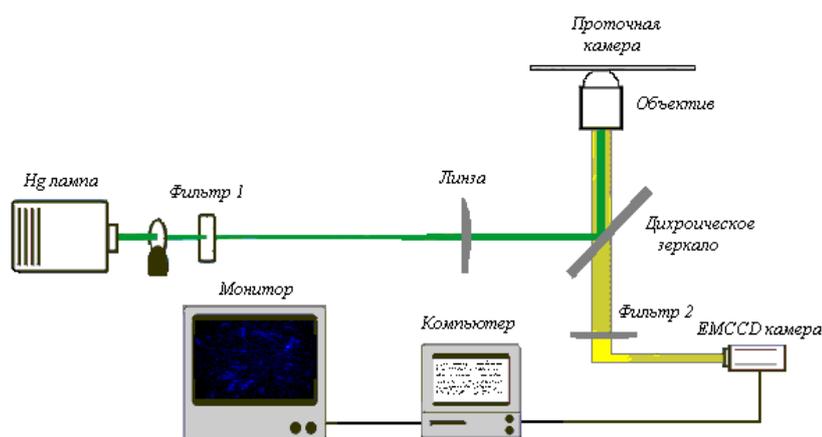


Рисунок 4 – Схема экспериментальной установки.

Изображение флуоресцентно окрашенного F-актина регистрировалось с помощью EMCCD видеокамеры iXon-897BV (Andor Technology). Для экспериментов использовался масляно-иммерсионный объектив Alpha Plan-Fluar 100×1,45 NA (Carl Zeiss). Для последующей обработки изображение записывали на жесткий диск компьютера с помощью программного обеспечения GMimPro [195].

Протокол эксперимента

Все эксперименты с использованием метода искусственных подвижных систем были выполнены при температуре 28 °С.

Растворы

1. Буфер АВ– содержал: 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, рН 7,5.

2. Буфер АВ+ содержал: 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, 2 мМ АТФ, рН 7,5.

3. Высокоионный буфер АВ содержал: 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 500 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, рН 7,5.

Протокол эксперимента.

50 мкл раствора миозина в концентрации 200 или 300 мкг/мл в зависимости от эксперимента загружали в проточную камеру и инкубировали 3 мин.

Камеру промывали последовательно высокоионным буфером АВ и буфером АВ–.

Для того, чтобы заблокировать участки поверхности нитроцеллюлозы, не занятые миозином, в камеру добавляли 50 мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 1 минуты.

Добавляли 50 мкл некрашеного F-актина в концентрации 50 мкг/мл в буфере АВ+ (АВ– и 2 мМ АТФ) на 5 мин для блокировки неработающих миозиновых головок.

Камеру трижды промывали буфером АВ–.

Загружали 50 мкл окрашенного родамин-фаллоидином F–актина в концентрации 10 нМ в буфере АВ– на 7 мин.

Камеру промывали раствором АВ–/БСА/ГОК (АВ– буфер, 0,5 мг/мл БСА и «кислород-поглощающая система», ГОК: 3,5 мг/мл глюкозы, 0,02 мг/мл каталазы, 0,15 мг/мл глюкозо-оксидазы и 5 мМ 2-меркаптоэтанола), что вело к ригорному соединению тонкой нити с миозином.

Добавляли раствор, состоящий из АВ+/БСА/ГОК.

2.8. Метод искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом

В методе искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом мы реконструировали тонкий филамент из скелетного актина и тропонина с тропомиозином, полученных из сердца быка. Протокол эксперимента в данной модификации отличался тем, что вместо чистого F–актина в камеру загружался раствор регулируемых тонких филаментов на основе окрашенного родамин-фаллоидином F–актина в буфере АВ–, содержащий, кроме того, 100 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина для предотвращения их диссоциации от филаментов.

Для инициализации скольжения тонкого филамента по поверхности, покрытой миозином, добавляли финальный раствор, состоящий из АВ+/БСА/ГОК; 100 нМ тропонина; 100 нМ тропомиозина и свободного кальция.

Тестом на хорошее качество собранного филамента являлось отсутствие движения филаментов при добавлении в камеру раствора с АТФ без свободного кальция. В таких условиях актиновая нить начинала двигаться по миозину, регулируемый филамент – нет. При добавлении же раствора, содержащего и АТФ, и свободный кальций, наблюдалось скольжение регулируемого филамента по миозину, скорость которого

зависела от концентрации свободного кальция в растворе. Следует отметить один важный момент. При низкой концентрации филаментов, загружаемых в камеру, происходит их диссоциация [47]. Для предотвращения диссоциации в раствор с филаментом добавляли избыточное количество тропонина и тропомиозина. Мы протестировали разные концентрации тропонина и тропомиозина, добавляемые в раствор с реконструированными филаментами. Было обнаружено, что при добавлении в раствор тропомиозина и тропонина в концентрациях 10 нМ в отсутствие ионов кальция и в присутствии АТФ почти все филаменты продолжали двигаться со скоростью, близкой к скорости движения F-актина. Это означает, что при данной концентрации избыточного тропонина и тропомиозина диссоциация тонкого филамента значительна. При дальнейшем увеличении концентрации регуляторных белков количество движущихся филаментов уменьшалось, и при концентрации по 100 нМ движения филаментов не наблюдалось. Наши результаты совпадают с литературными данными [47].

Определение скорости скольжения филаментов

Определение скорости скольжения филаментов осуществлялось с помощью программы GMimPro, разработанной в Национальном институте медицинских исследований (Лондон, Англия) [195] и доступной по адресу: gmimpro.

В литературе [46, 47, 153] имеется анализ разных подходов к измерению скоростей движения филаментов в искусственных подвижных системах. Все эти подходы дали сравнимые результаты в значениях скоростей движения. Мы определяли скорости скольжения филаментов следующим образом.

В процессе эксперимента обычно записывали не менее 10 полей из разных частей одной проточной камеры. Длительность записи составляла 30 с, интервал между кадрами – 500 мс. Для каждого филамента было измерено более 10 дистанций с равными промежутками времени. Для каждого

филамента определялась его средняя скорость за время его перемещения и стандартное отклонение. Только те филаменты, которые имели стандартное отклонение средней скорости менее 30 %, использовались для дальнейших расчетов, так как только они двигались непрерывно и равномерно. Распределение скоростей в поле зрения микроскопа имело вид нормального распределения. Обработывалось от 10 до 20 филаментов в поле зрения микроскопа.

Определение соотношения «pCa-скорость»

Для определения связи «pCa-скорость» были проведены эксперименты по определению скорости скольжения реконструированного тонкого филамента при различных концентрациях свободного кальция в растворе рабочей камеры от pCa 4 до pCa 8. Необходимая концентрация свободного кальция достигалась добавлением в финальный раствор, содержащий АТФ, соответствующего количества CaCl₂, которое было рассчитано с помощью доступной в интернете программы WEBMAXC STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>).

По экспериментальным данным была построена кривая зависимости «pCa-скорость» с помощью уравнения Хилла методом наименьших квадратов.

Определение изометрической силы, развиваемой поперечными мостиками миозина

Силу, развиваемую молекулами миозина, определяли, используя в качестве нагрузки актин-связывающий белок α -актинин [37, 166]. Суть метода заключается в том, что иммобилизованный на поверхности проточной камеры α -актинин, связываясь с тонкими нитями, препятствует их движению. Чем больше развиваемая миозиновыми головками сила, тем больше α -актинина требуется для остановки тонких нитей. Та минимальная концентрация α -актинина, которая полностью останавливает движение тонких филаментов, принимается за изометрическую силу. Заметим, что α -

актинин не оказывает влияния ни на регуляторную функцию тонкого филамента, ни на его взаимодействие с миозином [59].

Протокол эксперимента по измерению относительной изометрической силы, развиваемой поперечными мостиками миозина с помощью α -актинина был следующим. После присоединения миозина к нитроцеллюлозной поверхности камера промывалась последовательно высокоионным и низкоионным буферами, затем в неё загружался α -актинин в буфере АВ– и инкубировался в течение 10 мин. Далее в камеру добавлялись белки, как описано выше. α -Актинин связывался с актином, затрудняя движение актинового филамента. Количество α -актинина, прикрепленного к поверхности, постепенно увеличивали до достижения полной остановки филаментов.

Определение соотношения «pCa-сила»

Для построения связи «pCa-сила» в качестве характеристики силы использовалась минимальная концентрация α -актинина, останавливающая движение филаментов при данной концентрации кальция, отнесенная к концентрации α -актинина, требуемой для остановки движения при насыщающей концентрации кальция. Полученные данные хорошо аппроксимируются сигмоидой, соответствующей характеру связи «pCa–сила». Кооперативность связи «pCa-сила» определяется как наклон центрального прямолинейного участка сигмоиды, а тангенс угла этого наклона является коэффициентом кооперативности Хилла. Уравнение Хилла, которому соответствует сигмоида в полулогарифмических координатах, выглядит следующим образом:

$$F = 1/[1+10^{(h(pCa_{50}-pCa))}], \quad (4)$$

где: F – безразмерная сила, выраженная в долях к F_{\max} , h – коэффициент кооперативности Хилла, pCa_{50} – значение pCa , при котором достигается сила, равная половине максимальной силы.

Кальциевая зависимость силы была измерена на двух концентрациях миозина, загружаемого в камеру: 200 и 300 мкг/мл для обеих его изоформ.

Определение соотношения «сила-скорость»

Для построения зависимости «сила-скорость» определялась скорость скольжения реконструированных тонких филаментов по поверхности проточной камеры, покрытой изоформами сердечного миозина при различных концентрациях α -актинина, загружаемого в камеру. Для построения зависимости «сила–скорость» были проведены эксперименты при насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0) концентрациях свободного кальция в финальном буфере, содержащем АТФ.

Механическая нагрузка была выражена как отношение концентрации α -актинина, загружаемого в камеру, к максимальному значению концентрации α -актинина (соответствующему изометрическому состоянию). Теоретическая кривая зависимости «сила–скорость» аппроксимировалась с помощью гиперболического уравнения Хилла:

$$(F / F_0 + a) \cdot V = b \cdot (1 - F / F_0), \quad (5)$$

где V – скорость скольжения регулируемого филамента при данной нагрузке, F и F_0 – текущее и максимальное значение нагрузки, соответственно, a – константа силы, b – константа скорости.

Значения констант a и b были определены линеаризацией гиперболического уравнения Хилла [16, 120]. Для этого строилась зависимость $(1 - F / F_0) \times V$ от F / F_0 , которая отсекает на оси y значение $1 / V_{\max}$, а на оси x – значение a / F_0 , отношение $1 / b$ определяется наклоном данной прямой.

2.9. Статистическая обработка

Эксперименты по определению АТФазной активности миозина проводились трижды. Значения K_m и V_{\max} представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Для построения зависимости « pCa -скорость» бралась скорость, усредненная не менее, чем по 100 филаментам для каждого значения pCa . При определении зависимости «сила–скорость» были усреднены скорости

скольжения не менее, чем 100 филаментов при каждой концентрации α -актинина. Значения скоростей, силы и мощности представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Эксперименты по определению зависимостей « pCa -скорость» и « pCa -сила» были проведены трижды. Значения коэффициента Хилла и pCa_{50} этих зависимостей были найдены в каждом эксперименте и затем усреднены. Значения скоростей, сил, коэффициентов Хилла и pCa_{50} представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel» и «Статистика 6.0», для оценки значимости различий использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИЗОФОРМ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА

Для исследования сократительной функции сердечной мышцы, в которой главным звеном является молекулярный мотор, прежде всего необходимо оценить свойства этого мотора. В качестве моторных белков в сердце существует две изоформы сердечного миозина, которые в «чистом» виде для исследования их свойств и участия в сократительной функции сердечной мышцы и её регуляции, получают по общепринятой методике медикаментозной обработкой лабораторных животных (глава «Материалы и методы исследования»).

Изоформа миозина V1 была выделена из миокарда левого желудочка гипертиреоидных, изоформа V3 – гипотиреоидных кроликов. Состав тяжелых цепей изоформ сердечного миозина, выделенного из левых желудочков кроликов определяли методом полиакриламидного гель-электрофореза (ПААГ) с додецил сульфатом натрия (рисунок 5). Из рисунка видно, что миокард левого желудочка гипертиреоидных кроликов содержал преимущественно изоформу миозина V1 (~90%), гипотиреоидных – изоформу миозина V3 (~90%). Сдвиг изоформ сердечного миозина, и их чистота соответствуют литературным данным [60].

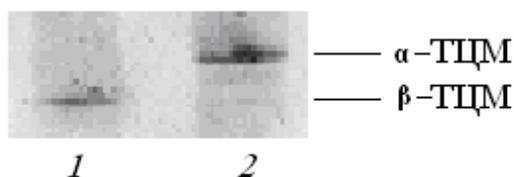


Рисунок 5 – Денатурирующий полиакриламидный гель-электрофорез изоформ тяжелых цепей миозина из желудочков кроликов, обработанных пропилтиоурацилом (дорожка 1) и L-тироксинном (дорожка 2).

В нашем исследовании мы провели сравнение функциональных характеристик изоформ сердечного миозина V1 и V3 кролика, используя методы оптической ловушки и искусственной подвижной системы.

Для сравнения функциональных характеристик изоформ сердечного миозина V1 и V3 определялись:

- актин-активируемая Mg^{2+} -АТФазная активность миозина;
- величина шага перемещения актиновой нити одиночной молекулой миозина;
- длительность одиночного перемещения актиновой нити одиночной молекулой миозина при различных концентрациях АТФ;
- скорость скольжения актиновой нити по покрытой миозином поверхности;
- скорость скольжения регулируемого тонкого филамента по покрытой миозином поверхности при различных концентрациях кальция;
- сила, развиваемая молекулами миозина.

***Актин-активируемая Mg^{2+} -АТФазная активность
изоформ сердечного миозина***

Зависимость Mg^{2+} -АТФазной активности миозина от концентрации актина для изомиозинов V1 и V3 в координатах Михаэлис-Ментен показана на рисунке 6 (панель А). Зависимости скорости актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазной реакции от концентрации актина (рисунок 6, панель Б) были преобразованы в график Лайнуивера-Бэрка и из него найдены значения V_{max} и K_m для каждой изоформы миозина. V_{max} и K_m , соответственно, были равны $5,2 \pm 0,98 \text{ с}^{-1}$ и $8,09 \pm 5,65 \text{ мкМ}$ для V1; $3,06 \pm 0,93 \text{ с}^{-1}$ и $8,13 \pm 2,31 \text{ мкМ}$ для V3. Значения V_{max} для изоформы V1 примерно в 1,7 раза выше, чем для V3. Результаты согласуются с данными, полученными другими авторами [33, 60, 192].

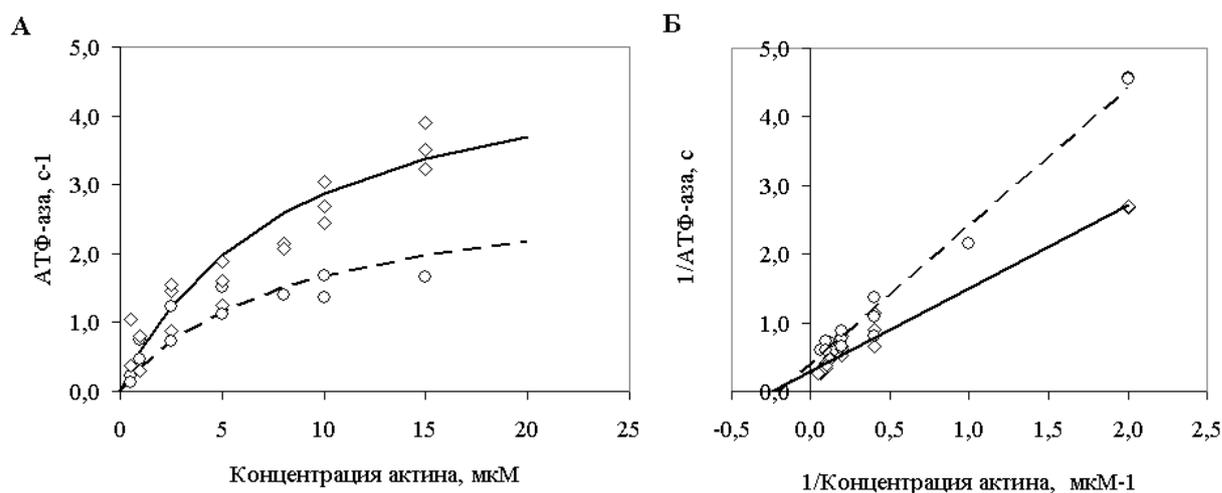


Рисунок 6 – Зависимость актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазной активности изоформ сердечного миозина V1 и V3 от концентрации актина (панель А), график Лайнуивера-Бэрка для данных, представленных на панели А (панель Б).

Примечание: ромбами и сплошной линией обозначены экспериментальные точки и аппроксимирующая кривая для V1, кружками и пунктирной линией – для V3.

Механические и кинетические характеристики сердечных изомиозинов, оцененные на уровне взаимодействия одиночных молекул (оптическая ловушка)

Для исследования ансамблей молекул миозина, в том числе их неоднородных популяций, необходимо количественно оценить механические свойства элементов этих ансамблей, т.е. изолированных изоформ V1 и V3. Т.к. элементарным мотором в актин-миозиновом комплексе является субфрагмент 1 молекулы миозина (S1, или головка), то для понимания механических свойств молекулы необходимо изучить сначала механические свойства этого субфрагмента. А, имея ясность о свойствах молекулы, можно переходить к исследованию свойств ансамблей (популяций), состоящих как из чистых изомиозинов, так и с различными их соотношениями.

При взаимодействии одиночных молекул миозина с нитью актина максимальная скорость движения нити, V_{\max} , зависит от амплитуды (d) и длительности ($t_{\text{он}}$) одиночного перемещения следующим образом: $V_{\max} = d/t_{\text{он}}$.

Поэтому различия в d и/или $t_{\text{он}}$ могут объяснять различия в V_{max} для изомиозинов V1 и V3.

Средняя сила F_{avg} одной молекулы миозина определяется силой F , которую она развивает, и долей времени f в рабочем цикле молекулы (duty cycle), в течение которой миозин сильно связан с актином в изометрических условиях, следующим образом $F_{\text{avg}} = Ff$. Таким образом, различия в F_{avg} между изомиозинами V1 and V3 могут быть объяснены изменениями силы и/или рабочего цикла одного мостика. В обоих случаях различия в V_{max} и F_{avg} могут отражать различия в механических (d и F) и кинетических ($t_{\text{он}}$ и f) характеристиках цикла молекулы этих миозинов [172].

С помощью оптической ловушки мы измерили амплитуды и длительности одиночного шага изоформ сердечного миозина V1 и V3. На рисунке 7 показаны распределения амплитуд одиночных перемещений нитей актина изомиозинами V1 и V3 [225].

Полученные гистограммы сдвинуты относительно средней нулевой линии на $5,4 \pm 1$ нм (среднее значение \pm ошибка среднего) для V1 и $7,4 \pm 0,9$ нм для V3. Величина этого сдвига представляет собой рабочий шаг миозина (working stroke).

Таблица 1 – Амплитуды одиночного перемещения нитей актина (в нанометрах) изоформами сердечного миозина V1 и V3 при различных концентрация АТФ.

	1,5 μM АТФ	5 μM АТФ	10 μM АТФ
V1	5,4 \pm 1,0 (n=217)	4,6 \pm 0,9 (n=270)	3,16 \pm 0,8 (n=378)
V3	7,4 \pm 0,9 (n=308)	7,1 \pm 0,7 (n=408)	3,23 \pm 0,7 (n=401)

Примечание: значения амплитуд одиночного перемещения представлены как среднее значение \pm ошибка среднего.

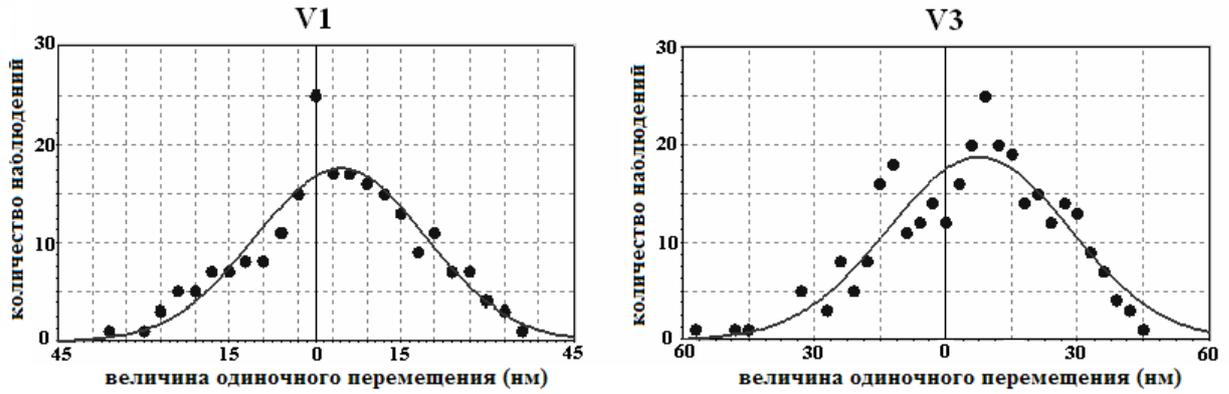


Рисунок 7 – Гистограммы распределение амплитуд перемещения актиновой нити одиночными молекулами миозина (распределение частоты встречаемости амплитуды перемещения).

Примечание: измерения сделаны на одном (для V1) и двух (для V3) актиновых филаментах при концентрации MgATФ 1,5 μ M. Кривая, аппроксимирующая экспериментальные данные, соответствует Гауссовскому распределению.

На рисунке 8 показаны гистограммы распределения длительностей одиночного перемещения для изоформ сердечного миозина V1 и V3.

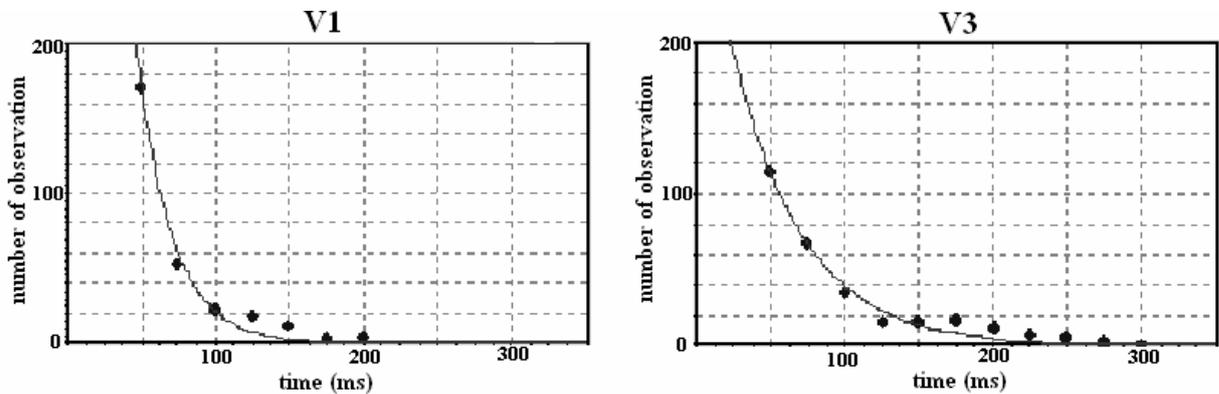


Рисунок 8 – Гистограммы распределения длительностей одиночного перемещения (распределение частоты встречаемости продолжительности перемещения) для изоформ сердечного миозина.

Примечание: измерения были получены на одном (для V1) и двух (для V3) актиновых филаментах при концентрации MgATФ 5 μ M. Экспериментальные точки аппроксимированы экспоненциальной кривой.

Таблица 2 – Длительности одиночных перемещений нитей актина (в миллисекундах) изоформами сердечного миозина V1 и V3 при различных концентрация АТФ.

	1,5 μM АТФ	5 μM АТФ	10 μM АТФ
V1	114 \pm 7,7 (n=217)	52 \pm 3,2 (n=270)	36 \pm 1,9 (n=378)
V3	141 \pm 8,0 (n=308)	90 \pm 4,5 (n=408)	55 \pm 2,2 (n=401)

Примечание: значения длительностей одиночного перемещения представлены как среднее значение \pm ошибка среднего.

Из таблицы 2 видно, что длительности одиночных перемещений нитей актина зависели от концентрации АТФ для обеих изоформ сердечного миозина. Длительности одиночных перемещений различались у изомиозинов для всех концентраций АТФ и были меньше для изоформы миозина V1.

Таким образом, с помощью метода оптической ловушки нами было найдено, что средняя величина одиночного перемещения нитей актина при концентрациях АТФ 1.5 и 5 мкМ была незначительно меньше для изоформы V1, при концентрации АТФ 10 мкМ не различалась. Длительности одиночных перемещений нитей актина при всех концентрация АТФ были больше для изомиозина V3, что может указывать на более медленное циклирование поперечных мостиков изомиозина V3 [225].

Зависимость скорости связывания АТФ изоформами сердечного миозина V1 и V3 от концентрации АТФ приведена на рисунке 9. Максимальная скорость реакции, полученная из уравнения Михаэлиса-Ментен равна 43,73 с^{-1} для изомиозина V1 и 20,89 с^{-1} для V3. Константа Михаэлиса (K_m) – 6,05 μM и 3,11 μM для V1 и V3, соответственно.

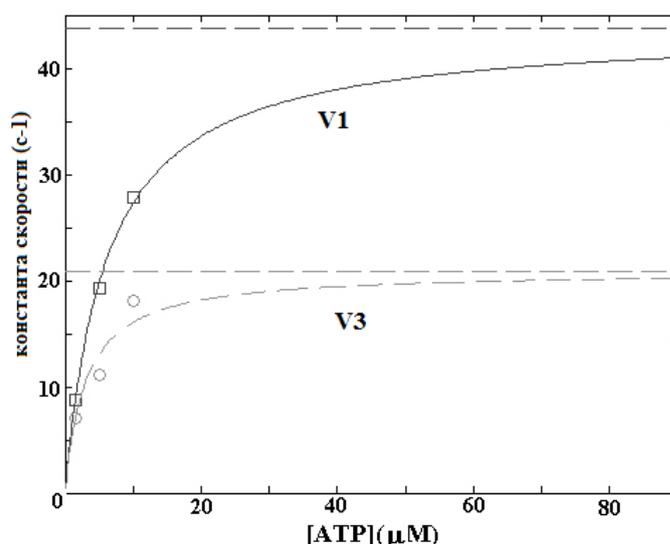


Рисунок 9 – Зависимость скорости связывания АТФ (1/время связывания) от концентрации АТФ для изомиозинов V1 и V3.

Примечание: характеристики кривых Михаэлиса-Ментен:

$K_m = 6,05 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 43,73 \text{ c}^{-1}$ (сплошная линия на рисунке 9) для V1;

$K_m = 3,11 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 20,89 \text{ c}^{-1}$ (штриховая линия на рисунке 9) для V3.

Сравнение скоростей скольжения нерегулируемого (F-актина) и регулируемого тонкого филамента в искусственной подвижной системе для обеих изоформ сердечного миозина

На рисунке 10 представлены скорости скольжения F-актина и регулируемого тонкого филамента, состоящего из актина, тропомиозина и тропонина по изомиозином V1 и V3. Скорость скольжения F-актина по изомиозину V1 была равна $1,0 \pm 0,1$ мкм/с, по V3 – $0,59 \pm 0,11$ мкм/с. При насыщающей концентрации кальция ($p\text{Ca } 5$) скорость движения регулируемой тонкой нити для изомиозина V1 составила $3,69 \pm 0,39$ мкм/с, для V3 – $2,12 \pm 0,21$ мкм/с.

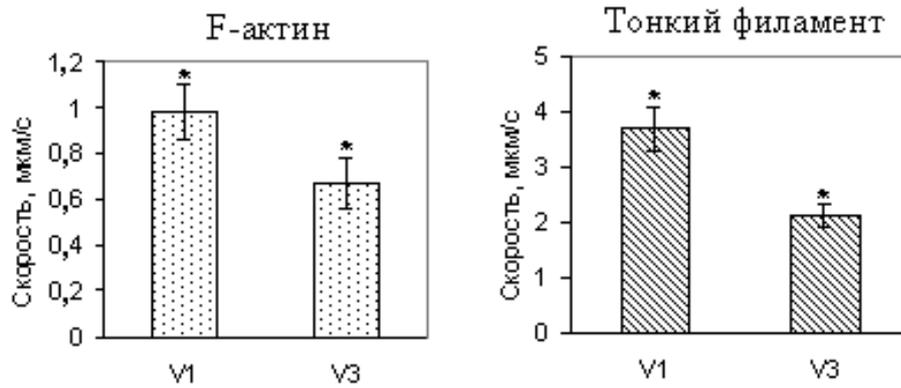


Рисунок 10 – Сравнение скорости движения нерегулируемого (филаментарного актина) и регулируемого тонкого филамента для изомиозинов V1 и V3 в искусственной подвижной системе.

Примечание: * - достоверные отличия между изоформами миозина $P < 0,001$.

Результаты наших экспериментов показали, что скорость скольжения как нерегулируемой, так и регулируемой тонкой нити по изомиозину V1 в 1,7 раза выше, чем по V3. Скорость скольжения регулируемого филамента при насыщающей концентрации кальция выше скорости нерегулируемого филамента для обеих изоформ примерно в 3,8 раза.

С момента использования метода искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом исследователи активно обсуждают вопрос различия скоростей скольжения регулируемого тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция и F-актина по одному и тому же моторному белку. В наших экспериментах мы определили, что скорость скольжения регулируемого тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция выше по сравнению со скоростью F-актина. Ряд авторов наблюдал увеличение скорости скольжения тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция при использовании скелетных [46, 120] и сердечных регуляторных белков [47, 243], в то время, как другие исследователи [15, 154] такого эффекта с сердечными регуляторными белками не обнаружили. Различие в результатах может быть объяснено методическими отличиями. Например, в одних исследованиях [154] состав буфера, используемого для экспериментов в искусственной подвижной

системе, отличался от «традиционного» состава буфера, в частности, значение pH было равно 8,0 (обычно используется pH 7,4-7,5), белки загружались в проточную камеру в очень высокой концентрации (1 мг/мл), что делало раствор очень вязким, что может влиять на взаимодействие молекул в искусственной подвижной системе и являться дополнительным сопротивлением движению нитей.

Исследователями предпринимались попытки объяснить различие в скоростях скольжения регулируемого филамента и актина. Так, Gordon с соавторами [46] объясняли бóльшую скорость скольжения регулируемого тонкого филамента по сравнению со скоростью F-актина увеличением Mg^{2+} -актин-активируемой АТФазной активности миозина в присутствии регулируемого тонкого филамента по отношению к АТФазной активности с чистым актином [41]. Другие исследования [154, 242] показали отсутствие связи между изменениями скорости скольжения регулируемого тонкого филамента и Ca^{2+} -актин-активируемой АТФазной активностью миозина при увеличении концентрации кальция [157]. Таким образом, только изменением АТФазной активности миозина при росте концентрации кальция нельзя объяснить увеличение скорости скольжения тонкого филамента.

Следующее объяснение данного явления было связано с возможным влиянием регуляторных белков на актин-миозиновое взаимодействие. Были высказаны следующие предположения: взаимодействие скелетно-мышечных тропонина и тропомиозина с актином меняет структуру актина и, таким образом, влияет на взаимодействие последнего с миозином [256]. Ионы кальция могут влиять через тропонин-тропомиозиновый комплекс на взаимодействие актина с миозином, меняя кинетику поперечных мостиков [243]. В работе Reisler с соавторами [116] показано, что характеристики актин-миозинового взаимодействия зависят от конформационных изменений в тонком филаменте.

В исследованиях с мутантным тропомиозином было показано [190], показали, что тропонин и ионы кальция усиливают гидрофобное

взаимодействие между актином и миозином. Этот эффект может быть объяснен положительным аллостерическим влиянием тропомиозина на актин, в результате которого большее количество гидрофобных аминокислотных остатков на актине становится доступным для стереоспецифического связывания между актином и миозином. Это может быть причиной возрастания скорости скольжения регулируемого филамента при насыщающей концентрации ионов кальция по отношению к скорости нерегулируемого тонкого филамента.

Сравнение сил, развиваемых поперечными мостиками изоформ V1 и V3 сердечного миозина

С помощью актин-связывающего белка α -актинина в экспериментах на искусственной подвижной системе как с нерегулируемым, так и с регулируемым тонким филаментом была измерена относительная сила, развиваемая поперечными мостиками изомиозинов V1 и V3.

Так, при добавлении 200 мкг/мл α -актинина в проточную камеру количество движущихся нерегулируемых филаментов (F-актина) для изомиозина V1 было в два раза больше, чем для V3 [225].

В искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом сравнивалась относительная сила при двух концентрациях изомиозинов V1 и V3 на поверхности проточной камеры: 200 и 300 мкг/мл при насыщающей концентрации свободного кальция (pCa 4) [4].

Из рисунка 11 видно, что изометрическая сила, оцененная по количеству α -актинина, останавливающего все тонкие филаменты, для V3 в 2 раза выше, чем для V1 при обеих концентрациях миозина. Следует отметить, что для обеих изоформ количество α -актинина, остановившего движение филаментов в 6 раз выше при концентрации миозина 300 мкг/мл, чем при концентрации 200 мкг/мл.

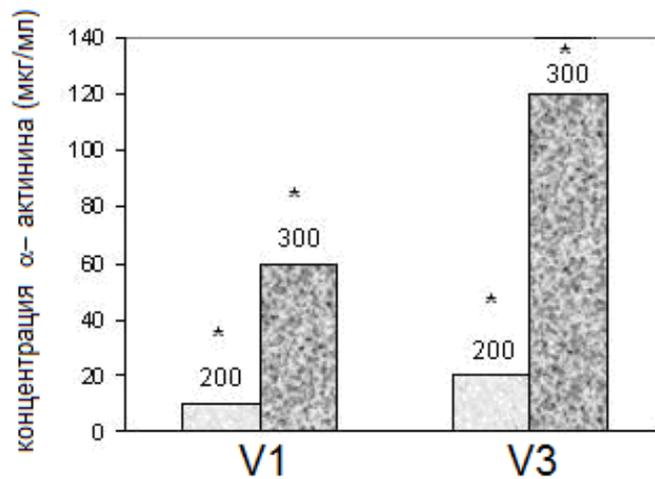


Рисунок 11 – Относительная изометрическая сила изомиозинов V1 и V3 при разных концентрациях загружаемого в проточную камеру миозина: 200 мкг/мл (светлый столбик) и 300 мкг/мл (темный столбик).

Примечание: * - достоверные отличия между изоформами миозина, $P < 0,001$.

Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что относительная сила, развиваемая сердечным изомиозином V3 кролика в 2 раза больше, чем V1, что соответствует данным других исследователей, полученным в экспериментах на искусственной подвижной системе как с нерегулируемым филаментом [60, 192], так и с использованием реконструированной тонкой нити [217]. Причем на регулируемой тонкой нити этот результат нами был получен при различных концентрациях миозинов, в то время как в опубликованных ранее экспериментах с регулируемой тонкой нитью с α-актинином в качестве нагрузки [217] была протестирована только одна концентрация миозинов. При использовании двух концентраций миозина нами было найдено, что сила увеличивается непропорционально росту концентрации миозина, загружаемого в проточную камеру.

В результате проведенных экспериментов мы определили, что изоформа V1 сердечного миозина кролика передвигает и актиновую нить, и регулируемый тонкий филамент значительно быстрее, чем изомиозин V3. В

свою очередь изометрическая сила, оцененная по количеству α -актинина, останавливающего все тонкие филаменты, для V3 в 2 раза выше, чем для V1.

Таким образом, по нашим данным изомиозин V1 кролика является более быстрым, но обладающим меньшей силотенерирующей способностью молекулярным мотором, чем V3.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДА ИЗОФОРМ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА В АКТИВАЦИЮ ТОНКОГО ФИЛАМЕНТА

Вклад изоформ сердечного миозина в кальциевую регуляцию сокращений миокарда традиционно изучался главным образом на фрагментах ткани сердечной мышцы и изолированных кардиомиоцитах [86, 101, 113, 160, 246, 287].

Благодаря появлению метода искусственной подвижной системы возникла возможность изучать непосредственное взаимодействие регуляторных и сократительных белков на уровне тонкого филамента, что дает возможность избежать сторонних эффектов, связанных с пассивными механическими свойствами мышечной ткани и клеток, диффузией веществ. В рамках метода искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом можно задавать различные концентрации свободного кальция и регистрировать связи « pCa -скорость», « pCa -сила» и «сила-скорость» на уровне взаимодействующих белков. Метод позволяет оценивать такие характеристики кальциевой активации тонкого филамента, как коэффициент кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность для связей « pCa -скорость» и « pCa -сила». Метод позволяют менять, в частности, соотношение изоформ сердечного миозина и наблюдать, как эти изменения могут влиять на характеристики актин-миозинового взаимодействия. Важно отметить, что, поскольку данный метод позволяет контролировать (а в данном случае поддерживать постоянным) состав регуляторных белков и экспериментально варьировать только соотношение $V1$ и $V3$, то и $CaTnC$ - $CaTnC$ кооперативность будет оставаться неизменной и поэтому только Xb - $CaTnC$ кооперативность в этом случае будет полностью ответственна за изменения коэффициента Хилла и кальциевой чувствительности.

Сравнение зависимостей «pCa-скорость» изоформ V1 и V3 сердечного миозина

Зависимость «pCa-скорость» широко используется при исследовании взаимодействия сократительных и регуляторных белков в присутствии кальция в искусственной подвижной системе [217]. Мы использовали эту связь для исследования вклада сердечного миозина с разным содержанием изоформ тяжелых цепей через механизм Xb-CaTnC кооперативности в активацию тонкого филамента.

Зависимости скорости скольжения регулируемой тонкой нити по изоформам сердечного миозина V1 и V3 в диапазоне концентраций кальция в растворе (pCa 5- 8) были получены в экспериментах на искусственной подвижной системе (рисунок 12).

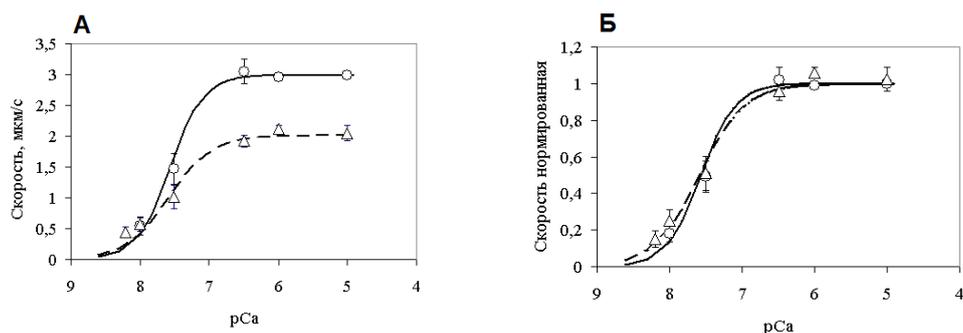


Рисунок 12 – Ненормированные (А) и нормированные (Б) зависимости скорости движения регулируемой тонкой нити от концентрации свободного кальция для изомиозинов V1 (сплошная линия) и V3 (пунктирная линия).

Примечание: кружками и треугольниками обозначены значения скоростей, полученных в экспериментах на искусственной подвижной системе для V1 и V3 соответственно. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла (см. текст). Значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам.

Полученные экспериментальные данные хорошо аппроксимируются линией регрессии, соответствующей уравнению Хилла:

$$V = V_{\max}(1+10^{h(pCa-pCa_{50})})^{-1}, \quad (6)$$

где V_{\max} – максимальная скорость движения тонкой нити при насыщающей концентрации кальция, выраженная как V/V_{\max} , h – коэффициент кооперативности Хилла, pCa_{50} – значение pCa , при котором достигается скорость, равная половине максимальной.

Коэффициент кооперативности Хилла кривой « pCa -скорость» (рисунок 12) достоверно не отличаются для изоформ сердечного миозина: $1,83 \pm 0,12$ и $1,39 \pm 0,39$ для изомиозинов V1 и V3, соответственно. Кальциевая чувствительность, определяемая величиной pCa_{50} одинакова для обеих изоформ: $7,56 \pm 0,01$ для V1 и $7,57 \pm 0,01$ для V3. В опубликованной ранее работе, в которой сравнивались кривые зависимости « pCa -скорость» изоформ сердечного миозина кальциевая чувствительность изоформы V3 была незначительно, но статистически достоверно выше, что указывало на ее бóльшую чувствительность к кальцию [9].

Noguchi с соавторами [217] не нашли различий в кальциевой чувствительности зависимости « pCa -скорость» изоформ V1 и V3 кролика в искусственной подвижной системе. В их работе значения pCa_{50} статистически не отличались для обеих изоформ сердечного миозина. Значение коэффициента кооперативности авторы не определяли, хотя из рисунка 4, приведенного в статье, видно, что угол наклона кривой зависимости « pCa -скорость» выше для изоформы V1, а значит, её коэффициент кооперативности должен быть выше. Поскольку авторы не приводят значения коэффициента Хилла, неизвестно, является ли это отличие статистически достоверным.

Анализируя полученные результаты, следует подчеркнуть, что сигмоидальный вид кривой « pCa -скорость», полученной в искусственной подвижной системе требует дополнительного обсуждения. Исходя из теории мышечного сокращения, скорость ненагруженного укорочения не должна зависеть от количества поперечных мостиков [156]. В связи с этим, возникает вопрос, в чем причина сигмоидального характера зависимости « pCa -скорость». Homsher с соавторами [47] предложили четыре гипотезы, которые

могут объяснить сигмоидальность этой кривой в искусственной подвижной системе: 1) при низкой концентрации кальция слабо-связанные головки миозина являются нагрузкой, препятствующей движению филаментов; 2) в условиях искусственной подвижной системы скорость движения филаментов зависит от количества поперечных мостиков [292], которое, в свою очередь, зависит от концентрации кальция; 3) скорость цикла поперечного мостика зависит от концентрацией кальция; 4) регуляторные белки тонкого филамента могут взаимодействовать с белками, связанными с нитроцеллюлозной поверхностью, создавая при этом нагрузку, против которой работают циклирующие поперечные мостики миозина.

Согласно полученным экспериментальным данным, можно исключить некоторые гипотезы. Первая из них может быть исключена, так как скорость движения тонкого филамента зависит от концентрации кальция и при высокой ионной силе, при которой слабые взаимодействия поперечных мостиков минимальны [250, 265]. При возрастании ионной силы происходит увеличение коэффициента кооперативности и кальциевой чувствительности [46], указывая на то, что слабо-связанные поперечные мостики могут тормозить движение филаментов при низких концентрациях ионов кальция.

Homsher с соавторами [47] исследовали влияние концентрации скелетно-мышечного ТММ на зависимость « pCa -скорость». Авторы выявили, что при уменьшении концентрации моторного белка коэффициент кооперативности и кальциевая чувствительность уменьшаются, что подтверждает гипотезу 2. К этому же выводу приходит другая группа исследователей [46], которая обнаружила снижение кальциевой чувствительности и увеличения коэффициента кооперативности при уменьшении концентрации моторного белка – также скелетно-мышечного ТММ. Различие в изменениях коэффициента Хилла при уменьшении концентрации ТММ, вероятно, можно объяснить отличиями в составе АТФ содержащего буфера, в котором различались pH , ионная сила и температура, которые влияют на скорость движения филаментов [46, 154].

Другие исследователи считают [15, 46, 47], что сигмоидальный вид кривой « pCa -скорость» может быть связан с уменьшением доли сильно-связанных поперечных мостиков при низких концентрациях кальция.

Позже исследования показали, что регуляторные белки могут модулировать высвобождение АДФ кальций-зависимым образом [137, 243], т.е. появились данные в пользу гипотезы 3.

Сигмоидальный характер связи « pCa -скорость» указывает на то, что движение регулируемых филаментов в искусственной подвижной системы происходит против нагрузки. Нагрузку может создавать сама нитроцеллюлозная поверхность проточной камеры. Так, в исследованиях с использованием нитроцеллюлозной поверхности проточной камеры [46, 47, 243], скорость движения филаментов при низких концентрациях кальция падала значительно. Frazer и Marston [120], использовавшие силикон в качестве рабочей поверхности, наблюдали незначительное уменьшение скорости, тогда как эти же авторы [37] наблюдали большее падение скорости на нитроцеллюлозной поверхности. Кроме того, было показано [141], что в методе искусственной подвижной системы, имеется нагрузка, создаваемая, скорее всего, нециклирующими поперечными мостиками прикрепленных к поверхности молекул миозина, образующимися в результате фотохимического окисления из-за яркого излучения, возбуждающего флуоресценцию. Таким образом, может иметься два фактора, которые могут выступать в качестве неучтенной нагрузки: нитроцеллюлозная поверхность проточной камеры и нефункционирующие поперечные мостики, связанные с поверхностью камеры и актином.

Таким образом, движение филаментов по поверхности проточной камеры в отсутствие задаваемой экспериментатором нагрузки нельзя считать ненагруженным. Наблюдаемая в искусственной подвижной системе связь « pCa -скорость», фактически, представляет собой связь « pCa -сила» с неучтенной нагрузкой. Этим объясняется сигмоидальный характер кривых зависимости « pCa -скорость». В отличие от предыдущих исследований [217],

мы впервые сравнили и кальциевую чувствительность, и коэффициент кооперативности зависимости « pCa -скорость» для изоформ сердечного миозина V1 и V3 кролика. Наши данные в разных экспериментах несколько различались. В одной серии экспериментов было обнаружено, что и коэффициенты кооперативности, и кальциевая чувствительность обеих исследованных изоформ сердечного миозина не отличаются. В другой - существовали достоверные различия в обеих характеристиках [9]. Однако по наклону кривой « pCa -скорость» трудно сравнивать кооперативное влияние изоформ V1 и V3, поскольку, как мы уже указывали, наклон сигмоиды « pCa -скорость» содержит в себе неучтённую нагрузку. Такая связь затрудняет интерпретацию результатов, и связь « pCa -сила» даёт более достоверную информацию о кооперативных эффектах изоформ миозина. Следует отметить, что в экспериментах на искусственной подвижной системе зависимость « pCa -скорость» гораздо чаще используется при исследовании взаимодействия сократительных и регуляторных белков в присутствии кальция в связи с тем, что получить эту зависимость проще и быстрее, чем зависимость « pCa -сила».

Сравнение зависимостей « pCa -сила» изоформ V1 и V3 сердечного миозина

Регистрация связи « pCa -сила» – один из основных экспериментальных методов исследования механизмов кооперативности в мышцах. Считается, что наклон центральной части этой кривой (коэффициент кооперативности Хилла) – интегральная характеристика всех типов кооперативности, присущих мышце. Связь « pCa -сила» традиционно регистрируется на скинированных мышечных волокнах [38, 93, 95] или кардиомиоцитах [71, 101, 146].

В экспериментах на искусственной подвижной системе с регулируемым тонким филаментом с использованием актин-связывающего белка α -актинина мы получили зависимости « pCa -[α -актинин]» для двух

концентраций загружаемых в проточную камеру изомиозинов V1 и V3 [4]. Кривые «pCa–[α-актинин]» для V1 и V3 при концентрациях миозина 200 и 300 мкг/мл, представлены на рисунке 13.

Из рисунка видно, что кривые «pCa–[α-актинин]» имеют форму сигмоиды. При насыщающей концентрации кальция в растворе количество α-актинина, полностью останавливающее движение всех тонких нитей, в 6 раз выше для концентрации 300 мкг/мл, чем для концентрации 200 мкг/мл для обоих типов изомиозинов. Примечательно и то, что количество α-актинина, полностью останавливающее движение филаментов, для обеих концентраций в 2 раза выше для изомиозина V3 по отношению к изомиозину V1.

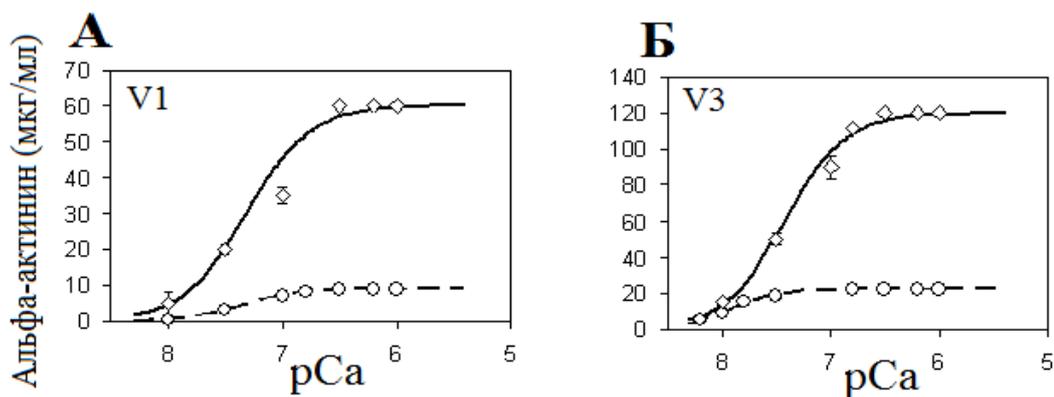


Рисунок 13 – Кривые зависимости концентрации α-актинина, останавливающей движение филаментов, от концентрации свободного кальция, полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе для изоформ V1 и V3.

Примечание: (А) – кривые для V1 при концентрациях миозина на поверхности проточной камеры 300 мкг/мл (сплошная линия) и 200 мкг/мл (пунктирная линия). (Б) – такие же кривые для изомиозина V3. Кружками обозначена концентрация α-актинина, требуемая для остановки движения филаментов, при концентрации изомиозинов 200 мкг/мл, ромбами – при концентрации изомиозинов 300 мкг/мл. Концентрация α-актинина представлена как среднее значение ± стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

Нормированные кривые «pCa-сила» представлены на рисунке 14. Коэффициенты кооперативности Хилла кривых «pCa-сила» для изомиозина V1 (рисунок 14.А) при концентрациях 200 и 300 мкг/мл, составили $1,76 \pm 0,01$ и $1,56 \pm 0,01$, соответственно. Для изомиозина V3 (рисунок 14.Б) при этих же концентрациях – $2,00 \pm 0,01$ и $1,54 \pm 0,01$, соответственно. Видно, что с понижением концентрации белка коэффициент кооперативности возрастает. Увеличение значений коэффициента Хилла кривой «pCa-сила» при уменьшении концентрации *скелетного* миозина на поверхности проточной камеры получили Gordon с соавторами [46].

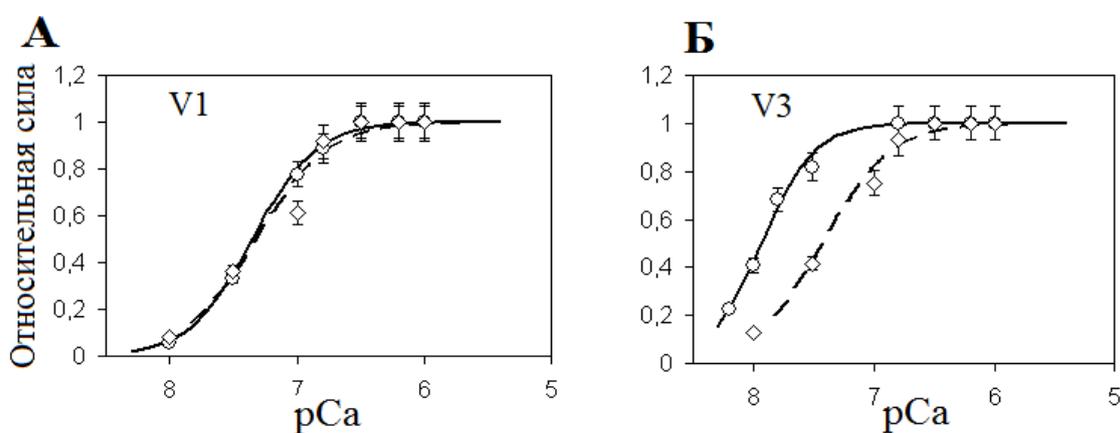


Рисунок 14 – Зависимости относительной силы, развиваемой поперечными мостиками изоформ V1 и V3, от концентрации свободного кальция в экспериментах на искусственной подвижной системе.

Примечание: (А) – кривые для V1 при концентрациях миозина на поверхности проточной камеры 200 мкг/мл (сплошная линия) и 300 мкг/мл (пунктирная линия). (Б) – те же кривые для изомиозина V3. Кругами обозначена относительная сила при концентрации изомиозинов 200 мкг/мл, ромбами – при концентрации изомиозинов 300 мкг/мл. Относительная сила представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

На рисунке 15 сравниваются те же самые данные, перегруппированные для сопоставления кривых «pCa-сила» для разных изомиозинов при одинаковых их концентрациях на поверхности проточной камеры. Коэффициенты кооперативности Хилла кривых «pCa-сила» (рисунок 15.А)

при концентрации миозина 300 мкг/мл составили $1,56 \pm 0,01$ и $1,54 \pm 0,01$ для изомиозинов V1 и V3 соответственно. При концентрации миозина 200 мкг/мл (рисунок 15.Б) коэффициент Хилла равен $1,76 \pm 0,01$ для V1 и $2,0 \pm 0,01$ для V3. Таким образом, значения коэффициента не отличались для обеих изоформ при концентрации каждой из них 300 мкг/мл. Однако, при более низкой концентрации каждой из изоформ (200 мкг/мл) он был больше для V3, чем для V1.

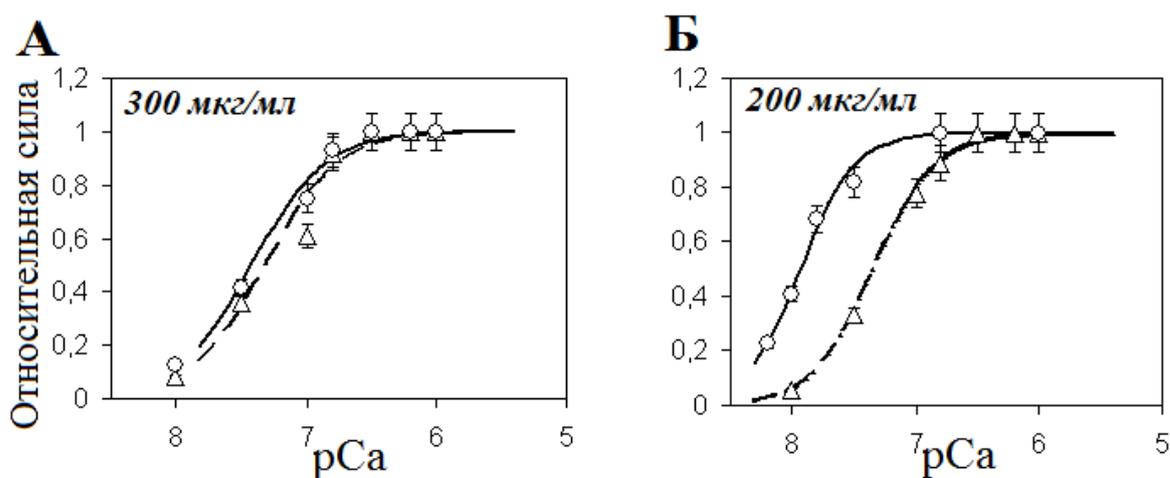


Рисунок 15 – Кривые зависимости относительной силы от концентрации свободного кальция для V1 (пунктирная линия) и V3 (сплошная линия) при одинаковых концентрациях миозина на поверхности проточной камеры.

Примечание: (А) - при концентрации миозина 300 мкг/мл, (Б) - 200 мкг/мл. Треугольниками обозначены значения относительной силы для изомиозина V1, кружками – для изомиозина V3. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

Кальциевая чувствительность, оцененная по величине pCa_{50} (значение pCa , при котором достигается полумаксимальная сила), незначительно, но достоверно различалась у обеих изоформ миозина при концентрации 300 мкг/мл и равнялась $7,32 \pm 0,01$ и $7,42 \pm 0,01$ для V1 и V3, соответственно; однако, при концентрации 200 мкг/мл это различие в кальциевой чувствительности было более выраженным: pCa_{50} $7,34 \pm 0,01$ для V1 и pCa_{50} $7,93 \pm 0,01$ для V3.

Noguchi с соавторами [217] в экспериментах на искусственной подвижной системе получили зависимость « pCa -сила» для изоформ сердечного миозина кролика. Авторы не определяли значения коэффициента кооперативности Хилла, хотя из рисунка 5 в их статье видно, что углы наклона кривых « pCa -сила» отличаются, а значит должны различаться и коэффициенты кооперативности. Угол наклона кривой « pCa -сила» выше для изоформы V1, а значит и коэффициент кооперативности для этой изоформы должен быть больше. Поскольку авторы не приводят значения коэффициента Хилла, неизвестно, является ли это отличие статистически достоверным.

Результаты наших экспериментов показали, что коэффициенты Хилла отличаются для разных изомиозинов при меньшей концентрации моторного белка на поверхности. Кроме того, для каждого изофермента с понижением концентрации белка коэффициент кооперативности возрастает. В единственной опубликованной ранее работе, где сравнивались зависимости « pCa -сила» для изомиозинов V1 и V3 [217], эти зависимости регистрировались только при одной концентрации изоформ. В опубликованном протоколе эксперимента не указывается, какая это концентрация, что говорит о том, что авторы не рассматривают концентрацию миозина в качестве фактора, способного влиять на характеристики связи « pCa -сила». В то же время известны работы на искусственной подвижной системе, в которых исследовались зависимости связей « pCa -скорость» и « pCa -сила» от концентрации миозина, загружаемого в проточную камеру.

Так, в экспериментах на нативном миозине [137] и скелетно-мышечном ТММ [45] обнаружено увеличение коэффициента кооперативности и уменьшение кальциевой чувствительности связи « pCa -скорость» при уменьшении концентрации миозина в проточной камере. Homsher с соавторами [47] нашли, что уменьшение концентрации миозина приводит к снижению коэффициента кооперативности и кальциевой чувствительности. Последние эксперименты проводились при температуре 25° С, а в других

работах [45, 137] при температуре 30 °С, что может быть причиной отличий величин коэффициента кооперативности.

Сравнивая полученные в наших экспериментах сигмиды « pCa -сила» для V1 и V3 при концентрациях загружаемого в проточную камеру миозина 300 и 200 мкг/мл, мы видим, что с понижением концентрации миозина крутизна связи « pCa -сила» увеличилась для обеих изоформ, но в большей степени для V3.

Обнаруженное влияние концентраций изомиозинов на характеристики связи « pCa -сила» возможно объясняется двумя следующими противоположно направленными тенденциями, обусловленными понижением концентрации миозина.

1. С одной стороны, уменьшение концентрации миозина само по себе (без учета кооперативности) требовало бы меньшей концентрации кальция для прикрепления всех имеющихся миозиновых головок, т.е. уменьшало бы насыщающую концентрацию кальция, необходимую для обеспечения силы, максимально возможной при данном количестве миозина. Это способствовало бы повороту сигмиды « pCa -сила» против часовой стрелки;

2. С другой стороны, уменьшение концентрации миозина снижает кооперативное влияние поперечных мостиков на сродство Ca к TnC, а значит, в конечном итоге, и на сродство актина к миозину. Этот фактор способствует повороту сигмиды по часовой стрелке.

Если наблюдаемый суммарный эффект уменьшения концентрации миозина выражается в повороте кривой против часовой стрелки, значит преобладает первая тенденция. Если суммарный эффект состоит в повороте по часовой стрелке, значит преобладает вторая. Сохранение прежнего наклона кривой « pCa -сила» при уменьшении концентрации миозина свидетельствует о том, что эти тенденции уравнивают друг друга.

Сравнивая с этой точки зрения кривые « pCa -сила» для V1 и V3, полученные при концентрациях миозина 300 и 200 мкг/мл, мы видим, что с понижением концентрации миозина для обеих изоформ уменьшился наклон

кривой. Это означает, что первая тенденция преобладает как для V1, так и для V3, причём в большей степени для V3. Это дает основание предполагать, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов для V1 сильнее, чем для V3.

Что касается кальциевой чувствительности, то данные, полученные нами по кривым « pCa -сила» [4], показывают, что кальциевые чувствительности изоформ V1 и V3 отличаются. Кальциевые чувствительности, оцененные по pCa_{50} , незначительно различались у изоформ миозина при концентрации 300 мкг/мл: 7,32 и 7,42 для V1 и V3, соответственно; при концентрации 200 мкг/мл различие в кальциевой чувствительности было более выражено: pCa_{50} 7,34 для V1 и pCa_{50} 7,93 для V3. Таким образом, есть основание считать, что кальциевая чувствительность изоформы V3 выше, чем V1.

Результаты исследований влияния соотношения изоформ сердечного миозина на кальциевую зависимость силы, полученные на препаратах сердечной мышцы и кардиомиоцитах противоречивы.

Так экспериментах на скинированных полосках из папиллярных мышц трансгенных кроликов было показано [99], что наличие 40% V1 не оказывает влияния на характеристики зависимости « pCa -сила». В экспериментах на скинированных многоклеточных препаратах левых желудочков крыс, обработанных тиреоидным гормоном, и крыс после тиреоидэктомии показано отсутствие влияния изоформного состава на зависимость « pCa -сила» [246]. На скинированных многоклеточных препаратах желудочков кролика, содержащих V1 или V3 изоформы миозина также не было найдено отличий зависимости связи « pCa -сила» от изоформ миозина [229].

Авторы других работ [101, 131] получили противоположные результаты изменения кривой « pCa -сила» в зависимости от соотношения изоформ сердечного миозина: при увеличении экспрессии β -тяжелых цепей миозина было найдено уменьшение [101] или увеличение (на скинированных препаратах желудочка) [131] кальциевой чувствительности силы.

В экспериментах на скинированных кардиомиоцитах эутиреоидных крыс (изоформа V1) и крыс, обработанных пропилтиоурацилом (изоформа V3) [101] не было найдено различий в коэффициенте кооперативности Хилла, а кальциевая чувствительность была выше для кривой изоформы V1. Эксперименты на скинированных трабекулах взрослых крыс и крыс, обработанных пропилтиоурацилом [71] показали, что и коэффициент кооперативности, и кальциевая чувствительность зависимости « pCa -сила» трабекул с разным содержанием изоформ миозина отличаются и были выше в трабекулах, содержащих изоформу миозина V3.

Одна из возможных причин столь противоречивых результатов вышеописанных экспериментов – значительные отличия в экспериментальных методиках. К примеру, часть этих работ выполнена на многоклеточных препаратах, часть – на одиночных кардиомиоцитах. Эти два типа препаратов принципиально различаются, в частности, скоростью диффузии растворов.

Robbins с соавторами [99] показывают, что нет отличий в сократительном аппарате генетически модифицированных и экспериментальных животных контрольной группы. Но из-за особенностей работы с генетически модифицированными кроликами для экспериментов с разным содержанием изоформ миозина авторам приходилось использовать животных, отличающихся по возрасту, а как известно [76], с возрастом у кроликов меняется изоформный состав регуляторных белков, в частности, TnI, изоформы которого могут влиять на наклон кривой зависимости « pCa -сила». Это могло сказаться на оценках величины коэффициента кооперативности зависимости « pCa -сила» [99].

Кроме того, отличия в результатах можно объяснить в тех случаях, когда в исследованиях использовались препараты животных разных видов (крыса, кролик, человек).

Разница в результатах могла быть следствием изменения других белков сократительного аппарата кардиомиоцитов вне зависимости от

экспериментальной методики. В связи с тем, что сдвиг в соотношениях изоформ сердечного миозина в исследованиях достигался за счет гормональных воздействий, эти воздействия приводят к изменению сократительного аппарата кардиомиоцитов [83], и это могло влиять на сократительные и активационные характеристики препаратов, меняя коэффициент кооперативности и кальциевую чувствительность зависимости « pCa -сила». Было показано [101], что обработка пропилтиоурацилом не влияет на изоформный состав легких цепей как миозина, так и регуляторных белков, но авторы не исключают, что могут иметь место изменения в экспрессии изоформ, которые не обнаруживаются гель-электрофорезом или вестерн-блотом, но могут влиять на зависимость « pCa -сила».

По этой причине результаты исследований влияния изоферментного состава сердечного миозина, полученные в искусственной подвижной системе, на характеристики связи « pCa -сила» представляются нам более достоверными. В такой системе мы меняем только моторный белок, оставляя неизменными все остальные факторы, а значит, исследуем именно эффекты его взаимодействия с регуляторными белками и актином при данных условиях на активацию тонкого филамента.

Таким образом, наши эксперименты показали, что характеристики зависимостей « pCa -сила» изоформ сердечного миозина различны, а значит изоформы по-разному влияют на кальциевую активацию тонкого филамента, о чем говорит незначительное, но достоверное отличие кальциевой чувствительности кривой « pCa -сила» для разных изоформ. Сдвиг влево кривой зависимости « pCa -сила» для V3 изоформы относительно кривой для V1 можно объяснить различием кинетики мостиков этих двух изоформ. Время сильно-связанного состояния, t_{on} , для изоформы V3 больше, чем для V1 [60, 225]. Как полагают [96], увеличение времени сильно-связанного состояния ведёт к тому, что Ca^{2+} остается дольше связанным с TnC, что в свою очередь увеличивает кальциевую чувствительность отношения « pCa -сила».

Даже незначительное изменение кальциевой чувствительности (на $0,1 \text{ pCa}$ при концентрации 300 мкг/мл загружаемого в проточную камеру миозина) может иметь существенное физиологическое значение [14]. Исследования на препаратах сердечной мышцы, полученных от пациентов с гипертрофической кардиомиопатией, показали наличие изменений в pCa_{50} для напряжения на $0,05 \text{ pCa}$ [14]. Но даже столь малые отклонения в кальциевой регуляции со временем могут иметь значительные последствия для производительности сердца.

Сравнение соотношения «сила-скорость» изоформ сердечного миозина V1 и V3 при различных концентрациях кальция

Для более глубокого анализа кооперативного влияния различных изоформ сердечного миозина V1 и V3 на кальциевую активацию их сократительной активности предпочтительно одновременно регистрировать кальциевую активацию, нагрузку на нить и скорость движения нити под этой нагрузкой при данной кальциевой активации. Такую информацию можно получить из кривых «сила–скорость», регистрируемых в искусственных подвижных системах с регулируемой тонкой нитью при разных концентрациях кальция.

В наших предыдущих работах была изучена связь «сила–скорость» в экспериментах на препаратах миокарда и математических моделях в однородном и неоднородном миокарде [1, 161, 200].

Известно, что связь «сила-скорость» зависит от концентрации кальция [26, 73]. Уровень кальция и механические условия через механизмы кооперативности регуляторных и сократительных белков могут существенно модулировать зависимость «сила-скорость». Можно ожидать, что связь «сила-скорость», зарегистрированная при разных уровнях кальция, для изоформ миозина будет отличаться в случае, если вклад этих изоформ в кооперативность Xb-CaTnC различен.

В экспериментах на искусственной подвижной системе с использованием реконструированной тонкой нити и актин-связывающего белка α -актинина в качестве нагрузки были получены зависимости «сила-скорость» для изомиозинов V1 и V3 при двух концентрациях свободного кальция. Для экспериментов были выбраны следующие концентрации кальция в растворе: pCa 6,5 еще является насыщающей концентрацией, но находится близко к перегибу на плато зависимости « pCa -сила»; pCa 7,0 является ненасыщающей концентрацией, и при этом скорости скольжения регулируемых филаментов еще достаточно высоки, чтобы при увеличении нагрузки, вплоть до максимальной, можно было измерить скорости сильно замедливших свое движение филаментов.

На рисунках 16 и 17 представлены ненормированные кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента от концентрации α -актинина для V1 и V3 изоформ сердечного миозина при pCa 6,5 и pCa 7,0. Как видно из этих рисунков, полученные зависимости «сила-скорость» имеют форму, отличающуюся от классической гиперболы, полученной Хиллом на скелетной мышце [149], на кривой имеются гиперболическая и негиперболическая части.

Как видно из рисунка 16, максимальная относительная сила, оцененная по концентрации α -актинина, останавливающего движение филаментов, у изоформы V1 миозина меньше, чем у V3 и при насыщающей, и ненасыщающей концентрациях кальция в растворе. При pCa 6,5 изометрическая сила для V1 составила 60 мкг/мл α -актинина, для V3 – 120 мкг/мл; при pCa 7,0: 40 и 90 мкг/мл для V1 и V3 изоформ соответственно. Следует отметить, что при обеих концентрациях кальция изометрическая сила изоформы V3 в 2 раза больше, чем V1.

Максимальная скорость скольжения регулируемого филамента (без нагрузки) при pCa 6,5 составила $2,2 \pm 0,12$ мкм/с по изоформе V1, по V3 – $1,45 \pm 0,17$ мкм/с. При ненасыщающей концентрации кальция максимальная скорость скольжения равнялась $1,69 \pm 0,11$ и $0,94 \pm 0,18$ мкм/с для V1 и V3

соответственно. Таким образом, максимальная скорость движения филаментов была выше по изоформе V1, чем по V3 при pCa 6,5 в 1,5 раза и в 1,7 раза – при pCa 7,0.

Нормированные зависимости «сила-скорость» для изоформ V1 и V3 сердечного миозина при pCa 6,5 и pCa 7,0 представлены на рисунках 16 и 17. Для обеих изоформ сердечного миозина в области малых нагрузок (в диапазоне от 0 до 0,3 - 0,4 максимума силы) наблюдались отличия в скорости скольжения тонкого филамента в зависимости от концентрации свободного кальция в растворе. При дальнейшем увеличении нагрузки изменений в скорости при обоих значениях концентраций кальция для данной изоформы миозина не происходило. Причем при увеличении нагрузки от 0,3 - 0,4 до максимальной экспериментальные кривые для V1 и V3 отклоняются от соответствующих теоретических кривых.

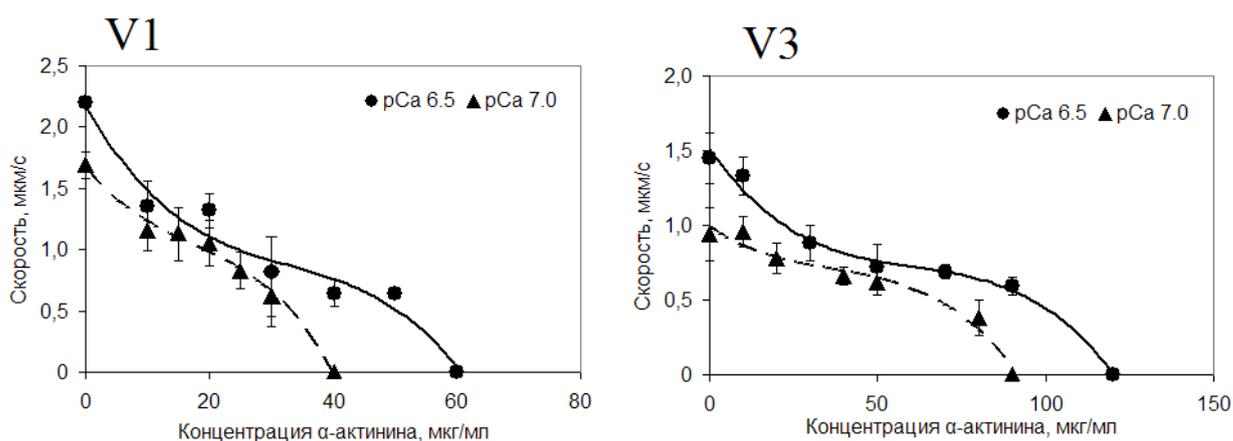


Рисунок 16 – Зависимость «сила-скорость», полученная в искусственной подвижной системе для изоформы V1 (левая панель) и изоформы V3 (правая панель) при насыщающем (pCa 6,5, кружки) и ненасыщающем (pCa 7,0, треугольники) значениях концентрации свободного кальция.

Примечание: кружками и треугольниками обозначены экспериментальные точки, аппроксимирующая кривая – полином третьей степени, проведённый методом наименьших квадратов. Значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

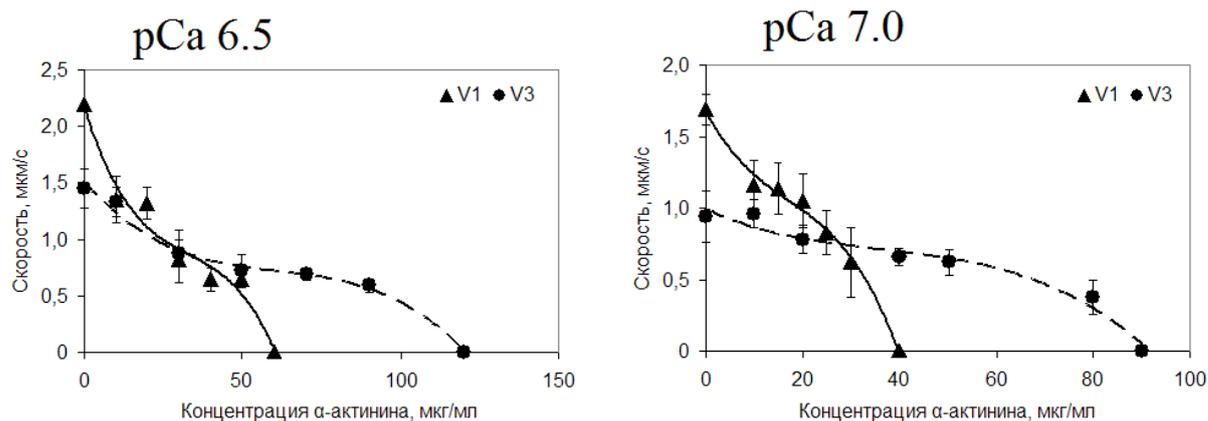


Рисунок 17 – Зависимость «сила-скорость», полученная методом искусственной подвижной системы для изоформ V1 (треугольники) и V3 (кружки) при насыщающей (pCa 6,5, левая панель) и ненасыщающей (pCa 7,0, правая панель) концентрациях свободного кальция.

Примечание: треугольниками и кружками обозначены экспериментальные точки, аппроксимирующая кривая – полином третьей степени, проведённый методом наименьших квадратов. Значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

То есть, для обеих изоформ миозина негиперболические части кривой «сила-скорость» совпадают при разных концентрациях кальция. Таким образом, для каждой изоформы миозина скорость скольжения тонкого филамента при больших нагрузках не зависит от концентрации кальция.

Падение скорости скольжения при уменьшении концентрации кальция от pCa 6,5 до pCa 7,0 при нулевой концентрации α -актинина, т.е., в отсутствие нагрузки более выражено для медленной изоформы V3 (на 36 %), чем для быстрой V1 (на 23 %).

Теоретические кривые зависимости «сила-скорость», полученные с помощью гиперболического уравнения Хилла для изоформ V1 и V3 (рисунок 18), построены для насыщающей концентрации кальция. Экспериментальные кривые, полученные для изоформ V1 и V3, совпадают с теоретической кривой, соответствующей каждой изоформе, только в диапазоне малых

нагрузок (от 0 до 0,3 от максимальной). Кривизна зависимости для изоформы V3 больше, чем для V1: коэффициент $a/F_{ov3} = 0,96$, $a/F_{ov1} = 1,62$.

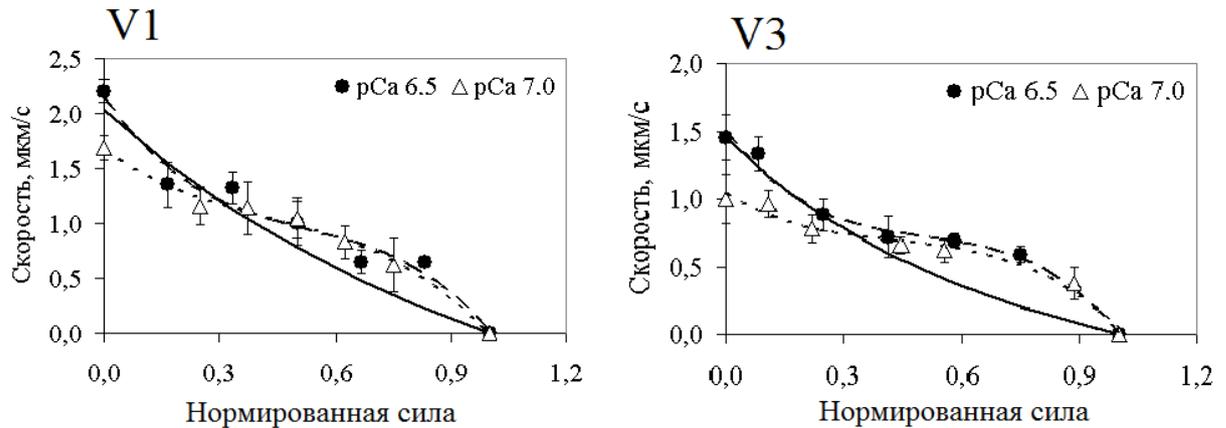


Рисунок 18 – Зависимость «сила-скорость» для изоформ сердечного миозина V1 (левая панель) и V3 (правая панель) при pCa 6,5 и pCa 7,0.

Примечание: нормированная сила представлена как концентрация α -актина, нормированная на «изометрическую» концентрацию α -актина для каждой изоформы при данном значении pCa . Кружками и треугольниками обозначены экспериментальные данные, полученные при pCa 6,5 и pCa 7,0, соответственно, аппроксимирующая кривая – полином третьей степени, проведённый методом наименьших квадратов. Значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Сплошная линия представляет собой кривую, соответствующую теоретической кривой, полученной с помощью гиперболического уравнения Хилла методом наименьших квадратов (см. Метод).

На рисунке 19 представлена зависимость «сила-скорость» при pCa 6,5 и pCa 7,0 для изоформ сердечного миозина V1 и V3, полученная путем нормирования концентраций α -актина (рисунок 15), на его концентрацию, останавливающую движение филаментов. В диапазоне нагрузок от 0 до 0,8 - 0,9 максимальной силы при данных значениях концентрации кальция изоформа V1 показывала более высокую скорость скольжения филаментов. При дальнейшем увеличении нагрузки (от 0,9 до максимальной) скорости скольжения тонкого филамента для обеих изоформ сердечного миозина

достоверно не отличались, т.е., в области больших нагрузок скорости V1 и V3 при одной и той же нагрузке при данном pCa достоверно не отличались.

Из рисунка 19 видно, что при уменьшении концентрации свободного кальция с pCa 6,5 до pCa 7,0 разница в скоростях скольжения филамента по изоформам V1 и V3 увеличивается. Это происходит за счет того, что скорость скольжения филаментов по изомиозину V3 падает в бóльшей степени.

В результате наших экспериментов с использованием искусственной подвижной системе мы установили, что:

1. Зависимость «сила-скорость» для изомиозинов V1 и V3 при насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0) концентрациях кальция, соответствует гиперболическому уравнению Хилла в области малых нагрузок (0-0.3) и отклоняется от него при средних и больших нагрузках.

2. Форма кривых зависимости «сила-скорость» для V1 и V3 различается при насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0) концентрациях кальция. Степень кривизны этой зависимости для изомиозина V3 выше, чем для V1.

3. В области малых и средних нагрузок при насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0) концентрациях свободного кальция более высокая скорость скольжения регулируемого тонкого по изомиозину V1 по сравнению с V3.

4. Для каждой изоформы миозина в области больших нагрузок скорость скольжения регулируемого тонкого филамента не зависит от концентрации кальция.

5. При насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0) концентрациях свободного кальция скорость скольжения тонкого филамента в области больших нагрузок совпадает для обеих изоформ.

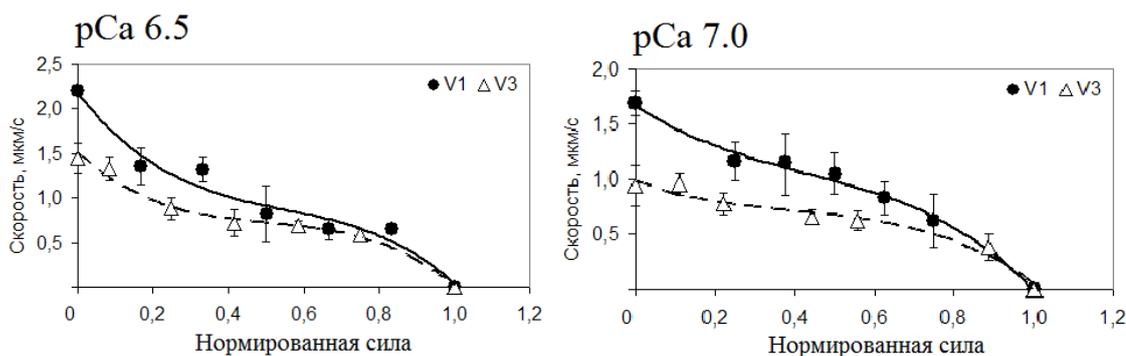


Рисунок 19 – Зависимость «сила-скорость» для изоформ сердечного миозина V1 и V3 при pCa 6,5 (правая панель) и pCa 7,0 (левая панель).

Примечание: нормированная сила вычислена как данная концентрация α -актинина, нормированная на «изометрическую» концентрацию α -актинина для каждой изоформы при данном значении pCa . Кружками и треугольниками обозначены экспериментальные данные, полученные для V1 и V3, соответственно, аппроксимирующая кривая – полином третьей степени, проведённый методом наименьших квадратов. Значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

6. При уменьшении концентрации свободного кальция в растворе с насыщающей (pCa 6,5) до ненасыщающей (pCa 7,0) разница в скоростях скольжения филаментов по изоформам V1 и V3 увеличивается. Это происходит из-за того, что скорость скольжения регулируемых тонких филаментов по изомиозину V3 падает в большей степени.

С помощью метода искусственной подвижной системы мы получили кривые зависимости «сила-скорость» для изоформ сердечного миозина при насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0) концентрациях кальция. Полученные кривые имеют форму гиперболы в области малых нагрузок и отличаются от гиперболической кривой в области больших нагрузок. Кроме того, формы кривых для изоформ миозина V1 и V3 различаются.

При рассмотрении зависимостей «сила-скорость», полученных нами с помощью метода искусственной подвижной системы для изоформ сердечного миозина, требуют обсуждения два вопроса: почему форма полученных нами зависимостей «сила-скорость» отличается от классической

гиперболы Хилла; каковы особенности этих связей для изоформ сердечного миозина.

В экспериментах на препаратах миокарда (папиллярных мышцах и трабекулах) в ходе изотонических постнагрузочных сокращений было обнаружено, что форма кривой зависимости «сила-скорость», получаемая как связь между постнагрузкой и максимальной скоростью укорочения мышцы под этой нагрузкой, отличается от гиперболы. В области больших нагрузок она имеет характерную выпуклость, направленную вверх [93, 95, 145, 229]. Наличие такого изгиба связывали с особенностями метода получения зависимости, а не с поведением поперечных мостиков, т.е. считалось, что связь «сила-скорость» для популяции поперечных мостиков в кардиомиоците должна иметь гиперболический вид в соответствии с уравнением Хилла.

Так, в исследованиях, выполненных на скинированных кардиомиоцитах крысы [113, 146, 147, 197, 235, 287], скинированных папиллярных мышцах трансгенных кроликов [99] и мышцей [86], как из интактных животных, так и из животных, гормонально обработанных для получения сдвига изоформного состава сердечного миозина, кривые зависимости «сила-скорость», имеют гиперболический вид. При этом на рисунке 5 статьи McDonald с соавторами [197] экспериментальные точки кривой зависимости «сила-скорость» отклоняются от гиперболической в области больших нагрузок, хотя авторы аппроксимируют экспериментальные данные гиперболой Хилла. С одной стороны, возможно, что, получив на кардиомиоцитах небольшое отклонение от гиперболической формы в области больших нагрузок, которую трудно исследовать с высокой степенью подробности, авторы не придали значения этому отклонению. С другой стороны, они [197] утверждают, что использовали в экспериментах препараты, обладающие низкой податливостью. Можно предположить, что форма кривых «сила-скорость», полученных в этой работе, является результатом особенностей используемой методики.

В экспериментах на папиллярных мышцах кролика [229], содержащих преимущественно либо изоформу V1, либо V3, были получены кривые зависимости «сила-скорость», с негиперболическим участком в области больших нагрузок.

При исследовании связи «сила-скорость» с помощью математической модели сократительной активности миокарда и ее регуляции было найдено, что характерный изгиб кривой «сила-скорость» в области больших нагрузок связан с механизмами кооперативности [26]. Также в рамках математической модели нами было показано, что на изгиб кривой «сила-скорость» влияет вязкость или, точнее, пороупругость, препаратов сердечной ткани [161].

Форма кривых «сила-скорость», полученных на центрифужном микроскопе для скелетного миозина [263] и изоформ сердечного миозина крысы [118], имеет сходство с кривыми, полученными нами: в области малых нагрузок кривые «сила-скорость» имеют вид гиперболы. Следует отметить, что кривые зависимости «сила-скорость», полученные с помощью центрифужного микроскопа для изоформ сердечного и скелетного миозина несколько отличаются по форме. Негиперболическая часть кривых «сила-скорость» изоформ сердечного миозина выражена сильнее, чем скелетного.

Негиперболический участок на наших кривых «сила-скорость» и кривых, полученных японскими учеными [118], является более выраженным, чем в экспериментах на мышечных волокнах. Это можно объяснить особенностями методики искусственной подвижной системы, считая, что в такой системе имеется постоянное дополнительное сопротивление движению не зависящее от скорости (типа сухого трения) не превышающее 0,5 от максимальной силы. Мы построили теоретические кривые зависимости «сила-скорость» по нашим данным для изоформы V1 при насыщающей концентрации кальция с учетом вклада такого рода сопротивления, то есть, сдвинув их вправо на $0,2 F_0$ и $0,5 F_0$ (рисунок 20). Видно, что полученные теоретические зависимости, негиперболическая часть которых становится менее выраженной, чем у экспериментальной зависимости, по форме

приближается к кривым, полученным в исследованиях на препаратах сердечной мышцы [93, 95, 145, 229].

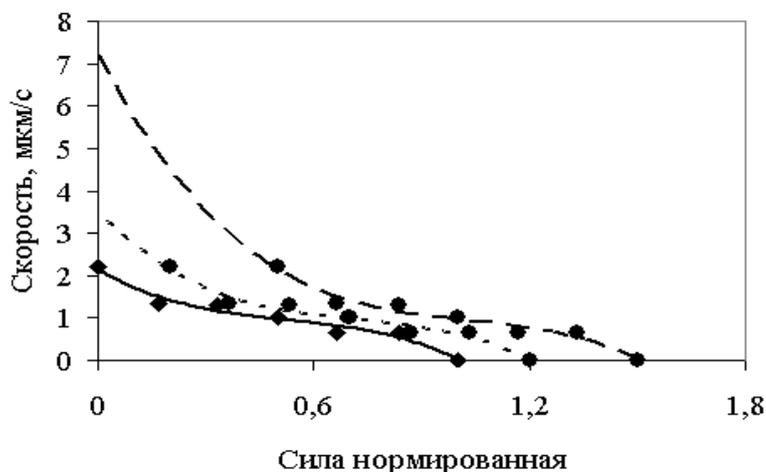


Рисунок 20 – Теоретические зависимости «сила-скорость» для изоформы V1 при pCa 6,5, построенные из предположения о существовании дополнительной постоянной нагрузки в искусственной подвижной системе.

Примечание: сплошная линия – экспериментальная кривая, мелкий пунктир – теоретическая кривая, сдвинутая на $0,2 F_0$, крупный пунктир – теоретическая кривая, сдвинутая на $0,5 F_0$. Кривые построены с помощью полинома третьей степени методом наименьших квадратов.

Vottinelli с соавторами [38] обнаружили, что для волокон, содержащих одни изоформы скелетного миозина, форма кривой зависимости «сила-скорость» отклоняется от гиперболической в области больших нагрузок, а содержащих другие – нет. Этот результат может свидетельствовать, что отклонение от гиперболичности представляет собой не артефакт, а является внутренним свойством волокна, зависящим от состава сократительных белков. Авторы подчеркивают, что простого объяснения найденным отличиям в форме кривых для препаратов, содержащих разные изоформы миозина нет.

Таким образом, наличие негиперболического участка кривой зависимости «сила-скорость», связано не столько с последовательной податливостью мышечного волокна, а является функциональным свойством самих поперечных мостиков. И, возможно, степень выраженности

негиперболической части, зависит от изоформ миозина. Для проверки последнего предположения представляется необходимым зарегистрировать кривые зависимости «сила-скорость» разных изолированных изоформ миозина в искусственной подвижной системе.

Особенности связей «сила-скорость» для изоформ сердечного миозина.

Результаты наших экспериментов показали, что максимальная скорость скольжения регулируемого тонкого филамента по изомиозину V1 больше максимальной скорости скольжения по изомиозину V3, как при насыщающей, так и при ненасыщающей концентрациях кальция, что соответствует скорости укорочения папиллярных мышц и кардиомиоцитов с преимущественным содержанием быстрой изоформы миозина [113, 146, 147, 197, 235].

В экспериментах на папиллярных мышцах кролика [229] были получены зависимости «сила-скорость» и было обнаружено, что скорость укорочения препаратов коррелирует с содержанием V1 в мышце. Эксперименты, выполненные на скинированных папиллярных мышцах трансгенных кроликов [99] и мышей [86], на скинированных кардиомиоцитах крысы [146, 147, 235], содержащих разные изоформы сердечного миозина, показывают, что при всех нагрузках скорость укорочения выше для препаратов, содержащих большее количество изоформы V1. С помощью центрифужного микроскопа японские исследователи Sugiura с соавторами [118] зарегистрировали связь «сила-скорость» на изолированных изоформах сердечного миозина крысы и установили, что скорость движения шариков, покрытых изоформой V1, была выше при всех нагрузках. Наши экспериментальные данные соответствуют результатам всех этих исследований. Мы нашли, что в области малых и средних нагрузок при двух концентрациях кальция (насыщающей (pCa 6,5) и ненасыщающей (pCa 7,0)) изоформа V1 перемещает регулируемый тонкий филамент быстрее, чем изоформа V3.

В экспериментах на кардиомиоцитах с преобладанием V1 или V3 изоформы [146, 235] было показано, что с увеличением нагрузки скорость укорочения кардиомиоцитов, содержащих V3 изоформу, падает значительно быстрее, чем содержащих V1. Так, в отсутствие нагрузки скорость укорочения, V_{\max} , была на 45% выше у кардиомиоцитов с быстрой изоформой, чем с медленной, а при нагрузке 90% максимальной эта разница составила 225%.

Нами было обнаружено, что разница в скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по разным изоформам уменьшается с ростом нагрузки (таблица 3).

Таблица 3 – Разница скоростей скольжения тонкого филамента между изомиозинами V1 и V3 при разных нагрузках и концентрациях кальция

	0	0,5 F_0	0,7 F_0	0,8-0,9 F_0
<i>pCa</i> 6,5	45 %	25 %	5 %	-
<i>pCa</i> 7,0	60 %	50 %	30 %	-

Примечание: pCa - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция в растворе. F_0 - максимальная сила, развиваемая изоформами миозина.

Таким образом, с уменьшением концентрации кальция при одних и тех же нагрузках разница в скоростях быстрой и медленной изоформ миозина увеличивалась. Причем это происходило за счет того, что скорость изоформы V3 уменьшилась в большей степени, чем изоформы V1. Зависимость «сила-скорость» для V3 изоформы является более чувствительной по отношению к концентрации кальция по сравнению с V1.

Нами было установлено, что для изоформ миозина в области больших нагрузок скорость скольжения регулируемого тонкого филамента не зависит

от концентрации свободного кальция в растворе, от количества поперечных мостиков. Можно предположить, что это является следствием неточности измерения скорости перемещения филаментов при данных нагрузках. При высоких нагрузках, достигаемых в наших экспериментах увеличением концентрации загружаемого в проточную камеру α -актина, движение филаментов становится медленным, неравномерным, скачкообразным, и это может приводить к занижению или завышению значения скорости.

Одной из характеристик зависимости «сила-скорость» является степень её вогнутости, которая характеризуется отношением a/F_0 . Чем меньше эта величина, тем больше кривизна. Большее значение a/F_0 соответствует низкой эффективности преобразования энергии гидролиза АТФ в механическую работу [299].

При исследовании с помощью центрифужного микроскопа [118] движения шариков, покрытых сердечным миозином крысы, по актиновым нитям водорослей было получено большее значение отношения a/F_0 для V1 изоформы сердечного миозина, чем для V3, причем эти значения оказались близки к таковым, полученным на препаратах папиллярной мышцы [21].

В исследованиях на скинированных кардиомиоцитах крысы [235] было показано, что кривизна связи «сила-скорость» возрастает при увеличении доли V3 изоформы и при уменьшении концентрации кальция от pCa 4,5 до pCa 9,0 кривизна зависимости «сила-скорость» достоверно не меняется.

В наших исследованиях форма кривых «сила-скорость» для изомиозинов V1 и V3 различалась как при насыщающей, так и при ненасыщающей концентрации кальция. Степень кривизны для изоформы V3 была выше, чем для V1, что следует из значений a/F_0 : для изоформы V3 оно меньше, что говорит о большей эффективности преобразования энергии гидролиза АТФ в работу изоформой V3.

Таким образом, результаты наших экспериментов на искусственной подвижной системе подтверждают вывод, сделанный в исследованиях на

кардиомиоцитах [146, 147, 235] и с помощью центрифужного микроскопа [118]: состав тяжелых цепей миозина определяет форму кривой зависимости «сила-скорость». Мы обнаружили также, что при изменении концентрации кальция степень кривизны связи «сила-скорость» для изоформы V3 меняется в большей степени, что, вероятно, свидетельствует о её большей чувствительности к активации тонкой нити.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДУЛЯТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИОКАРДА

Актин-миозиновое взаимодействие – основа мышечного сокращения. Однако в кардиомиоците присутствует сложная система различных структурных и регуляторных белков, которые могут существенно влиять и на сам сократительный акт и на его регуляцию. В частности, возникает вопрос, могут ли эти белки модулировать вклад различных сердечных изомиозинов в кальциевую регуляцию сокращений через кооперативность $Xb-CaTnC$. В нашей работе мы уделили внимание двум таким белкам – тропомиозину и сердечному миозин-связывающему белку С.

5.1. Тропомиозин

Тропомиозин – белок тонкого филамента саркомера, которому принадлежит важная роль в регуляции взаимодействия миозина с актином. В сердечной мышечной ткани содержатся α - и β - изоформы тропомиозина. В исследованиях с использованием искусственных подвижных систем нами было оценено влияние разных изоформ тропомиозина как на актин-миозиновое взаимодействие, так и на его регуляцию в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3.

Гель-электрофорез изоформ сердечного миозина и изоформ тропомиозина

Содержание изоформ тропомиозина (рисунок 21), соотношение тяжелых цепей изоформ сердечного миозина (рисунок 22), тяжелых и легких цепей предсердного (A1) и желудочкового (V1) миозинов (рисунок 23) было исследовано с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза.

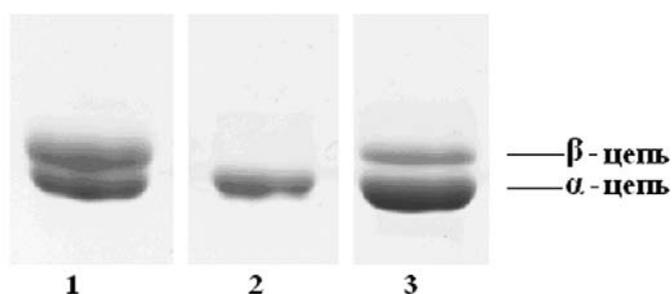


Рисунок 21 – Денатурирующий полиакриламидный гель–электрофорез препаратов тропомиозина.

Примечание: 1 – тропомиозин из *m. psoas* кролика ($\alpha\beta$ (60 : 40%) Tm); 2 – тропомиозин, экстрагированный из миокарда кролика ($\alpha\alpha$ Tm); 3 – тропомиозин, экстрагированный из сердца быка ($\alpha\beta$ (90 : 10%) Tm).

Видно, что тропомиозин, выделенный из миокарда кролика, является гомодимером α -цепей. Сердечный бычий тропомиозин содержит, наряду с α -цепью, от 6 до 10% β -цепи тропомиозина. У тропомиозина, выделенного из спинной мышцы кролика (*m. psoas*), содержание β -цепи составляет около 40%.

В качестве моторных белков были использованы изоформы сердечного миозина V1 и V3, которые содержат различные тяжелые α - и β -цепи, и предсердный миозин A1, содержащий α -цепь, аналогичную изомиозину V1 (кодируются одним геном) (рисунок 22). Миозины A1 и V1 различаются существенными и регуляторными легкими цепями (рисунок 23).

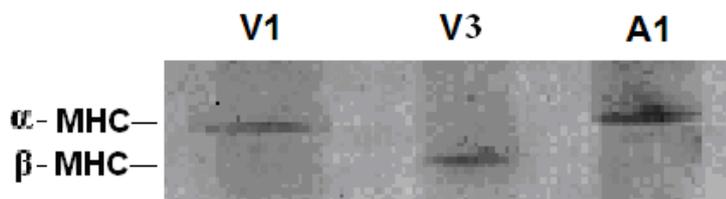


Рисунок 22 – Денатурирующий полиакриламидный гель–электрофорез изоформ тяжелых цепей миозина из левых желудочков кроликов, обработанных L-тироксидом (V1) и пропилтиоурацилом (V3), и предсердного миозина A1 здоровых кроликов.

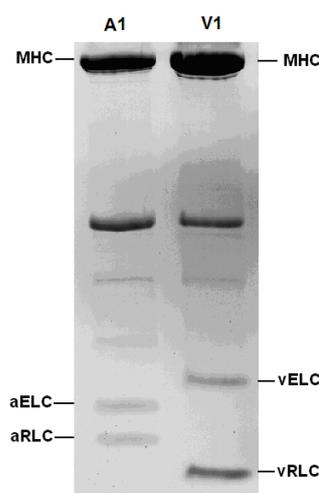


Рисунок 23 - Денатурирующий полиакриламидный гель–электрофорез предсердного (A1) и желудочкового (V1) миозина.

Примечание: MHC, тяжелые цепи миозина; aELC, предсердная существенная легкая цепь; aRLC, предсердная регуляторная легкая цепь; vELC, желудочковая существенная легкая цепь; vRLC, желудочковая регуляторная легкая цепь.

Влияние изоформ тропомиозина на скорость движения актинового филамента по изоформам сердечного миозина

Для исследования влияния изоформ тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие в экспериментах на *in vitro* подвижных системах была проведено сравнение скоростей движения актинового и актин-тропомиозинового филамента по изоформам сердечного миозина.

Мы использовали изоформы тропомиозина из мышц, содержащих различное соотношение α - и β - цепей.

На рисунке 24 показаны скорости движения актиновых (F-актин) и актин-тропомиозиновых филаментов, содержащих $\alpha\alpha$ -тропомиозин из левого желудочка сердца кролика, в *in vitro* подвижных системах по изоформам сердечного миозина кролика. Добавление сердечного тропомиозина кролика ($\alpha\alpha$ Tm) к актину не влияло на скорость движения филаментов по V1 ($2,84 \pm 0,32$ мкм/с vs $2,91 \pm 0,24$ мкм/с), но снижало скорость движения

филаментов по предсердному миозину A1 ($3,3 \pm 0,28$ мкм/с vs $2,63 \pm 0,36$ мкм/с). Однако в случае миозина, содержащего β -МНС, добавление тропомиозина приводило к существенному увеличению скорости движения филаментов. В частности, скорость актинового филамента по сердечному изомиозину V3 составила $1,45 \pm 0,16$ мкм/с, в то время как актин-тропомиозиновый филамент двигался со скоростью $2,23 \pm 0,13$ мкм/с.

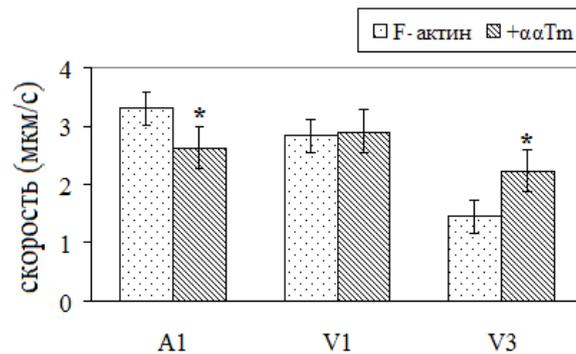


Рисунок 24 – Скорость движения актиновых (F-актин) и актин-тропомиозиновых филаментов ($\alpha\alpha$ Tm), содержащих $\alpha\alpha$ -тропомиозин из левого желудочка сердца кролика, в *in vitro* подвижных системах по изоформам сердечного миозина кролика.

Примечание: значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значений скоростей, $p < 0,05$

Скорость движения как актинового, так и актин-тропомиозинового филамента, содержащего тропомиозин из сердца быка ($\alpha\beta$ (90 : 10 %) Tm) по тем же миозином, что и на рисунке 24, показана на рисунке 25. Добавление $\alpha\beta$ Tm к актиновому филаменту оказывает противоположный эффект на скорость движения по V1 и A1 изомиозином. Так, скорость скольжения актин-тропомиозинового филамента ($5,27 \pm 0,14$ мкм/с) по V1 была существенно выше скорости F-актина ($2,84 \pm 0,32$ мкм/с). В то же время скорость актин-тропомиозинового филамента ($1,37 \pm 0,15$ мкм/с) по A1 была ниже скорости F-актина ($3,3 \pm 0,28$ мкм/с). Добавление сердечного $\alpha\beta$ Tm быка к актину приводило к падению скорости скольжения актин-

тропомиозинового филамента по изомиозину V3 от $1,45 \pm 0,16$ мкм/с до $0,9 \pm 0,17$ мкм/с.

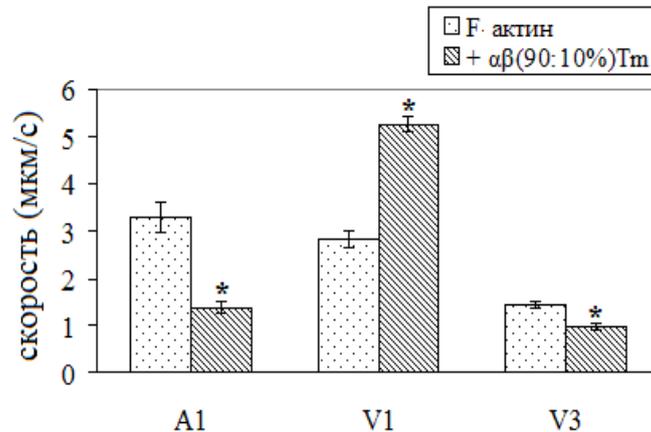


Рисунок 25 - Скорость движения актиновых (F-актин) и актин-тропомиозиновых филаментов ($\alpha\beta$ (90 : 10%) Tm), содержащих тропомиозин из левого желудочка сердца быка, в *in vitro* подвижных системах по изоформам сердечного миозина кролика.

Примечание: значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значений скоростей, $p < 0,05$

На рисунке 26 показаны скорости движения актинового и актин-тропомиозинового филамента, содержащего скелетный тропомиозин кролика (60 : 40 %) Tm) по тем же изомиозинам, что и на рисунках 24 и 25. Добавление скелетного тропомиозина к актину приводило к уменьшению скорости актин-тропомиозинового филамента по V1 с $2,84 \pm 0,32$ мкм/с до $1,72 \pm 0,08$ мкм/с и по A1 с $3,3 \pm 0,28$ мкм/с до $2,03 \pm 0,35$ мкм/с. Добавление скелетного тропомиозина к актину приводило также к уменьшению скорости актин-тропомиозинового филамента и по изомиозину V3 с $1,45 \pm 0,16$ мкм/с до $1,0 \pm 0,18$ мкм/с.

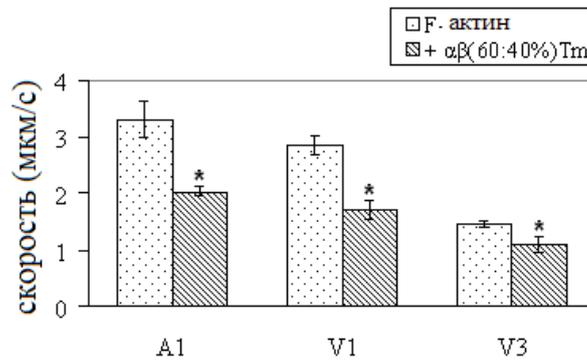


Рисунок 26 - Скорость движения актиновых (F-актин) и актин-тропомиозиновых филаментов ($\alpha\beta$ (60 : 40%) Tm), содержащих тропомиозин из *m. psoas* кролика, в *in vitro* подвижных системах по изоформам сердечного миозина кролика.

Примечание: значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значений скоростей, $p < 0,05$

Следует подчеркнуть, что добавление изоформы тропомиозина, состоящей из 60% α -цепи и 40% β -цепи имитирует патологическое состояние миокарда (в частности гипертрофию левого желудочка), при котором растет содержание β -цепи тропомиозина [165]. Результаты наших экспериментов показали, что в этом случае падает скорость актин-тропомиозиновых филаментов на всех изоформах сердечного миозина.

Таким образом, из полученных экспериментальных данных следует, что на взаимодействие миозина с F-актином влияют как изоформы сердечного миозина, так и изоформы тропомиозина с разным соотношением α - и β -цепей. Точный механизм такого эффекта неизвестен, но можно предложить ряд гипотез на основании данных литературы. В работах с дрожжевым [81] и скелетным [78] актином было обнаружено, что разные изоформы тропомиозина связываются с различными участками F-актина и что для связывания с актином имеет значения не длина молекулы тропомиозина, а её аминокислотная последовательность.

Кроме аминокислотной последовательности тропомиозина, которая играет роль в регуляции актин-тропомиозинового филамента, на регуляцию влияет аминокислотная последовательность актин-связывающего домена миозина. Согласно работе Ajtai с соавторами [278] важную роль во взаимодействии миозина с актином играет С-петля миозина. Причём, меняя нативную последовательность С-петли в гладкомышечном миозине на последовательность сердечного и скелетного миозина, авторы показали, что такие химерные миозины по-разному взаимодействуют с актин-тропомиозиновым филаментом. Так, на нативном миозине добавление тропомиозина приводило к увеличению скорости движения актинового филамента, тогда как на химерных миозинах такого увеличения скорости при добавлении сердечного тропомиозина не происходило.

Известно, что присоединение головок миозина к тонкой нити приводит к конформационным изменениям в молекуле актина [115, 216], и можно предположить, что характер этих изменений зависит от изоформ миозина. Таким образом, на основании наших экспериментальных данных можно заключить, что на взаимодействие сердечного миозина с актин-тропомиозиновым филаментом влияет изоформный состав как миозина (аминокислотная последовательность тяжёлых и лёгких цепей миозина), так и тропомиозина. Иными словами, в сердечной мышце существует взаимное влияние миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие. Наличие такого обоюдного влияния изоформ миозина и тропомиозина в сердечной мышце может играть значительную роль в поддержании ее эффективной работы в процессе онтогенеза и при патологических состояниях.

***Влияние изоформ тропомиозина на соотношение «pCa-скорость» для
изоформ сердечного миозина***

Поскольку тропомиозин является конформационным посредником в реализации Xb-CaTnC кооперативности, то его изоформы могут влиять на

эту кооперативность, и это влияние может оказаться различным для изомиозинов V1 и V3.

Для исследования влияния изоформ тропомиозина на кальциевую активацию тонкого филамента в экспериментах на искусственных подвижных системах были определены зависимости скорости скольжения реконструированных тонких филаментов, содержащих разные изоформы тропомиозина, от концентрации кальция в растворе (pCa 4-10).

На рисунке 27 представлены ненормированные кривые « pCa -скорость» для изомиозинов V1 (панель А) и V3 (панель Б). Для изомиозина V1 скорость движения реконструированного тонкого филамента, содержащего скелетный тропомиозин кролика ($\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm) была ниже, чем скорость движения филамента с сердечным тропомиозином ($\alpha\alpha$ Tm) – $4,24 \pm 0,6$ мкм/с и $5,27 \pm 0,31$ мкм/с.

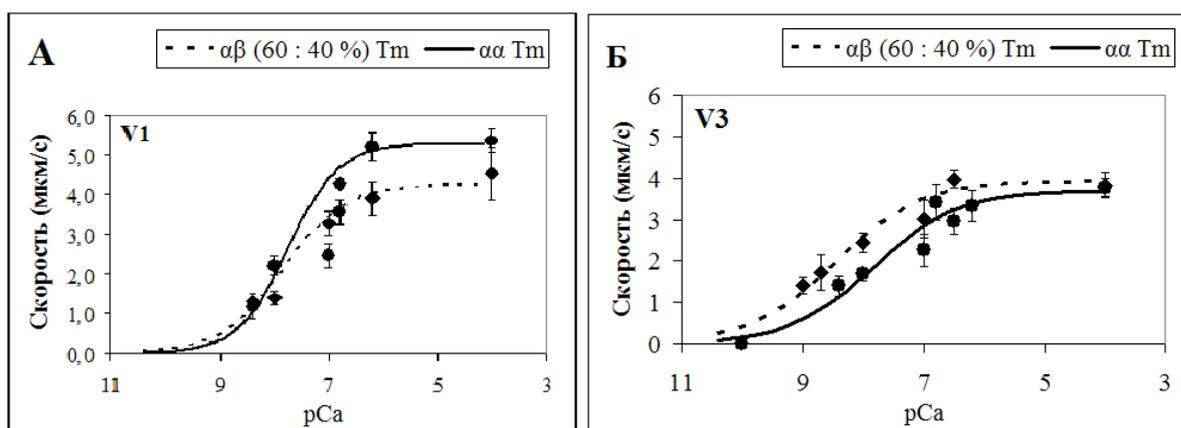


Рисунок 27 – Ненормированные зависимости скорости движения тонкой нити, содержащей скелетный тропомиозин - $\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm (пунктирная линия) и сердечный тропомиозин – $\alpha\alpha$ Tm (сплошная линия) от концентрации свободного кальция для изомиозинов V1(А) и V3 (Б).

Примечание: кружками и ромбами обозначены значения скоростей, полученных в экспериментах на искусственной подвижной системе для сердечного и скелетного тропомиозина, соответственно. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла (см. текст). Скорости представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам.

Для V3 скорости движения реконструированных тонких филаментов, содержащих как сердечный тропомиозин кролика ($\alpha\alpha$ Tm), так и скелетный тропомиозин ($\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm) были одинаковыми.

Коэффициенты кооперативности Хилла нормированной кривой «pCa-скорость» (рисунок 28) достоверно не отличаются для изоформы сердечного миозина V1 со скелетным тропомиозином кролика ($\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm) и с сердечным тропомиозином ($\alpha\alpha$ Tm): $0,77 \pm 0,12$ и $0,93 \pm 0,2$, соответственно. Для изомиозина V3 коэффициенты Хилла нормированной кривой «pCa-скорость» (рисунок 28) также достоверно не отличаются с обеими изоформами тропомиозина: со скелетным тропомиозином кролика ($\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm) - $0,62 \pm 0,12$ мкм/с и с сердечным ($\alpha\alpha$ Tm) - $0,63 \pm 0,11$ мкм/с, соответственно.

Кальциевая чувствительность, определяемая величиной pCa_{50} , достоверно не различается для изоформы V1: 7,75 в случае сердечного тропомиозина и 7,84 – в случае скелетного. Для изоформы миозина V3 величина pCa_{50} связи «pCa-скорость» различается со скелетным тропомиозином кролика ($\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm) и с сердечным тропомиозином ($\alpha\alpha$ Tm) и равна 8,4 и 7,8, соответственно.

Таким образом, результаты наших экспериментов показывают, что тропомиозин модулирует влияние каждой из изоформ сердечного миозина на кинетику кальций-тропонинных комплексов.

Наши результаты дают основание обсудить возможный вклад изменений изоферментного состава тропомиозина и миозина при гипертрофии сердца, при которых происходит сдвиг экспрессии изоформ миозина преимущественно в сторону V3 и изоформ тропомиозина в сторону β -цепи. Мы выяснили, что кальциевая чувствительность связи «pCa-скорость» растет в сочетании изомиозин V3 + изоформа тропомиозина состава $\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm. Поскольку в такой мышце преобладает медленный изомиозин V3, то укорачивается она медленнее. Но на этом фоне активация скорости происходит при более низком кальции, т.е. мышца способна при

меньших концентрациях кальция достичь своей максимальной скорости. И в этом проявляется компенсаторная роль увеличения β -цепи тропомиозина.

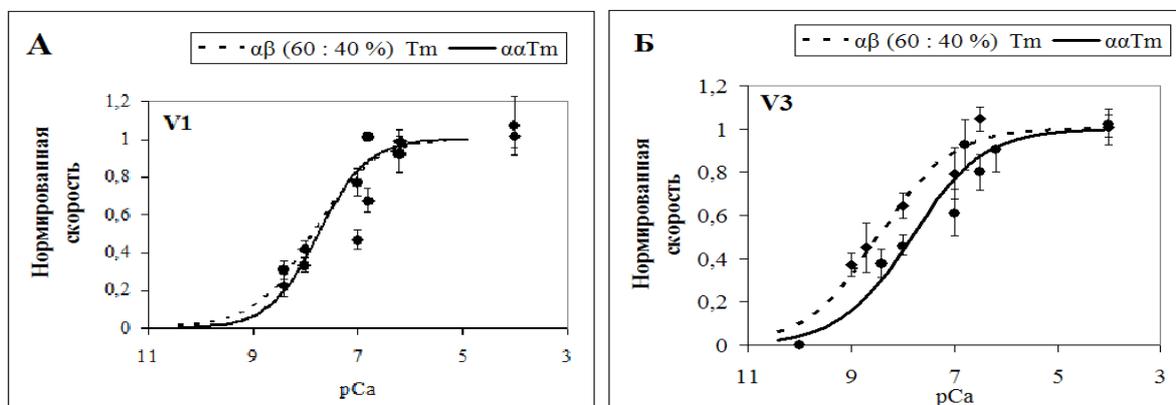


Рисунок 28 – Нормированные зависимости скорости движения тонкой нити, содержащей скелетный тропомиозин - $\alpha\beta$ (60 : 40 %) Tm (пунктирная линия) и сердечный тропомиозин – $\alpha\alpha$ Tm (сплошная линия) от концентрации свободного кальция для изомиозинов V1(A) и V3 (Б).

Примечание: кружками и ромбами обозначены значения скоростей, полученных в экспериментах на искусственной подвижной системе для сердечного и скелетного тропомиозина соответственно. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла (см. текст). Скорости представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам.

Несмотря на то, что наши результаты получены в системе *in vitro* при постоянном уровне кальция, можно допустить, что и в сократительном цикле интактного кардиомиоцита увеличение количества β -цепи тропомиозина может давать компенсаторный эффект. Т.е., это может служить механизмом, компенсирующим замедленное укорочение кардиомиоцитов с преобладающей изоформой V3.

5.2. Сердечный миозин-связывающий белок С

В исследованиях последних лет установлено, что сердечный миозин-связывающий белок С (сMyBP-C, С-белок) является не только структурным элементом саркомера, но и принимает участие в регуляции сокращений сердечной мышцы.

Группа профессора Lecarpentier [58] изучала влияние сердечного С-белка на взаимодействие сердечного миозина с актиновым филаментом в искусственных подвижных системах. Они нашли, что как скорость скольжения актина, так и относительная изометрическая сила, оцененная по концентрации α -актинина, останавливающего движение филаментов, были ниже в отсутствие С-белка, чем при его наличии. Эти результаты, полученные с нерегулируемым филаментом на сердечном миозине, существенно отличались от аналогичных результатов, полученных другими авторами [52, 102] на скелетном миозине. Это наводит на мысль о том, что и в экспериментах с регулируемым филаментом данные, полученные на сердечном миозине, также могут отличаться от таковых на скелетном миозине. Учитывая то, что функциональные характеристики сердечного миозина отличаются от характеристик скелетного миозина, так и, принимая во внимание тот факт, что миозин через механизмы кооперативности вносит вклад в регуляцию сокращений сердечной мышцы, можно полагать, что изучение влияния сердечного С-белка на регуляцию сократительной функции сердечной мышцы, важно проводить с использованием именно сердечного миозина. Это послужило мотивацией для проведения данного исследования.

Гель-электрофорез сердечного миозин-связывающего белка С

Проверка чистоты экстрагированного из миокарда цыпленка и очищенного с помощью хроматографической колонки С-белка была проведена с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза.

Препарат С-белка получился достаточно чистым и, согласно литературным данным, дефосфорилированным [35]. Изучение дефосфорилированной формы С-белка в нашем исследовании позволяет нам исключить влияние протеинкиназ на регуляторное влияние сМуВР-С на взаимодействие миозина с филаментарным актином в искусственной подвижной системе.

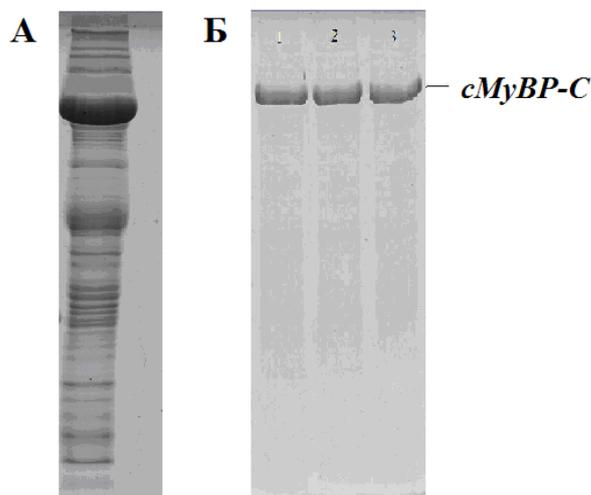


Рисунок 29 – Гель электрофорез cMyBP-C в 10% ДСН-ПААГ.

Примечание: панель А - экстракт cMyBP-C из миокарда цыпленка. Панель Б- С-белок, очищенный на колонке, содержащей Q-сефарозу. Загрузка белка составила: линия 1 – 12 мкг, линия 2 – 8 мкг и линия 3 – 5 мкг.

Оценка влияния сердечной изоформы миозин связывающего белка С на актин-активируемую и на регулируемую Mg^{2+} -АТФазную активность сердечного миозина

На рисунке 30 показана зависимость актин-активированной Mg^{2+} -АТФазной активности сердечного миозина от концентрации С-белка. Видно, что с увеличением концентрации С-белка АТФазная активность миозиновых филаментов увеличивается. Чтобы оценить влияние С-белка на кинетические параметры актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазной активности филаментов сердечного миозина, мы измерили её активность как функцию концентрации актина в присутствии и в отсутствие С-белка. Как видно из рисунка 31, С-белок в физиологической концентрации (молярное отношение С-белка к миозину 1:5) статистически достоверно не влияет на максимальную скорость гидролиза АТФ, V_{max} и константу Михаэлиса, K_m .

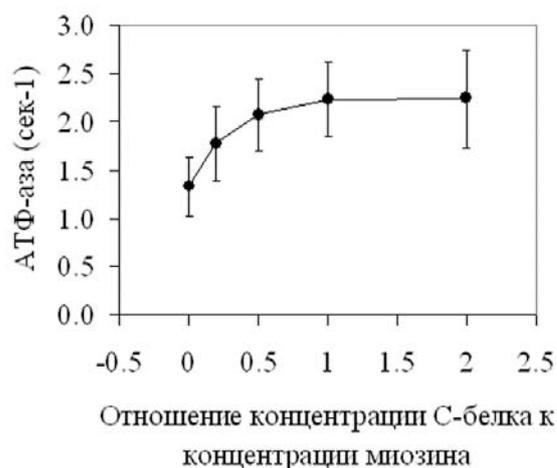


Рисунок 30 – Зависимость актин-активируемой АТФазной активности сердечного миозина от концентрации С-белка.

Примечание: при определении актин-активируемой АТФазной активности миозина реакционная смесь содержала белки в следующих концентрациях: 0,05 мкМ миозиновых филаментов (по миозину), 10 мкМ актина, от 0,01 до 0,1 мкМ сМуВР-С. АТФазная активность представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по шести экспериментам.

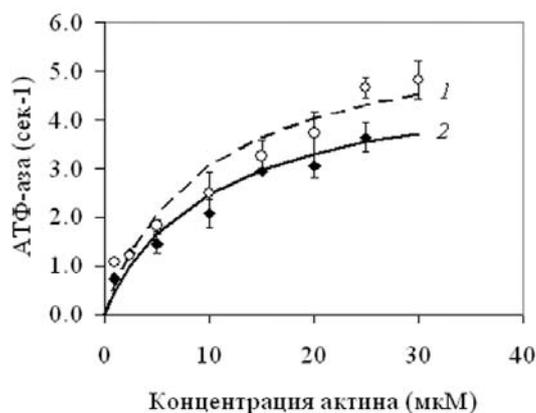


Рисунок 31 – Актин-активируемая АТФазная активность сердечного миозина с С-белком С (1) и без него (2).

Примечание: линия регрессии соответствует уравнению кинетики Михаэлиса-Ментен. Ромбами обозначены значения актин-активируемой АТФазной активности миозина, полученные без С-белка, кружками – в его присутствии. Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Отношение молярных концентраций С-белка к миозину составляло 1:5 (0,01 мкМ С-белка, 0,05 мкМ миозина). $V_{max} = 4,95 \pm 0,76 \text{ с}^{-1}$ без С-белка и $5,94 \pm 1,52 \text{ с}^{-1}$ с С-белком; $K_m = 9,96 \pm 4,65 \text{ мкМ}$ без С-белка, $9,42 \pm 2,04 \text{ мкМ}$ с С-белком.

Влияние различных концентраций С-белка на регулируемую Mg^{2+} -АТФазную активность филаментов сердечного миозина на насыщающей (pCa 4) и ненасыщающей (pCa 7) концентрациях кальция показано на рисунке 32. На насыщающей концентрации кальция С-белок не оказывал статистически достоверного увеличения АТФазной активности с ростом концентрации С-белка (панель А). Напротив, при ненасыщающей концентрации кальция С-белок в концентрациях, близких к физиологическим (молярное отношение С-белка/миозин 1:5, 1:2) увеличивал АТФазную активность миозина в полтора раза (панель Б). При дальнейшем увеличении концентрации С-белка (молярное отношение сМуВР-С/миозин 1:1, 2:1) стимулирующий эффект исчезал.

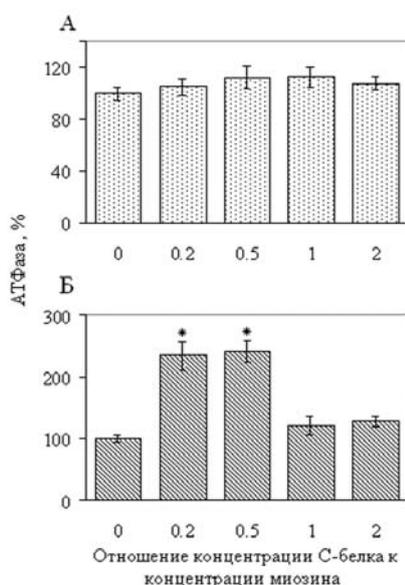


Рисунок 32 - Влияние С-белка на Ca^{2+} -регулируемую АТФазную активность филаментов сердечного миозина при насыщающей (pCa 4, панель А) и ненасыщающей (pCa 7, панель Б) концентрациях кальция.

Примечание: реакционная смесь при определении Ca^{2+} -регулируемой АТФазной активности миозиновых филаментов содержала следующие концентрации белков: 0,05 мкМ миозиновых филаментов (по миозину), от 0,01 мкМ до 0,1 мкМ С-белка; 10 мкМ актина, 2 мкМ тропомиозина и 2 мкМ тропонина. Значения Ca^{2+} -регулируемой АТФазной активности миозина представлены как среднее \pm стандартное отклонение по пяти экспериментам. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значений Ca^{2+} -регулируемой АТФазной активности от контроля (без С-белка), $p < 0,05$.

Оценка влияния сердечной изоформы миозин-связывающего белка С на скорость движения филаментарного актина и реконструированного тонкого филамента по сердечному миозину

На рисунке 33 показано влияние разных концентраций С-белка на скорость движения актина по сердечному миозину (панель А). При соотношении сМуВР-С/миозин 1:5, С-белок не влиял на скорость F-актина, тогда как при отношении 1:2 С-белок замедлял скорость движения филаментов. При увеличении концентрации С-белка, загружаемого в камеру, скорость регулируемого тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция ($pCa\ 4$) падает (панель Б). Так, добавление С-белка в молярном отношении к миозину 1:5 понижает скорость тонкого филамента на 24%, а в отношении 1:2 – на 33%.

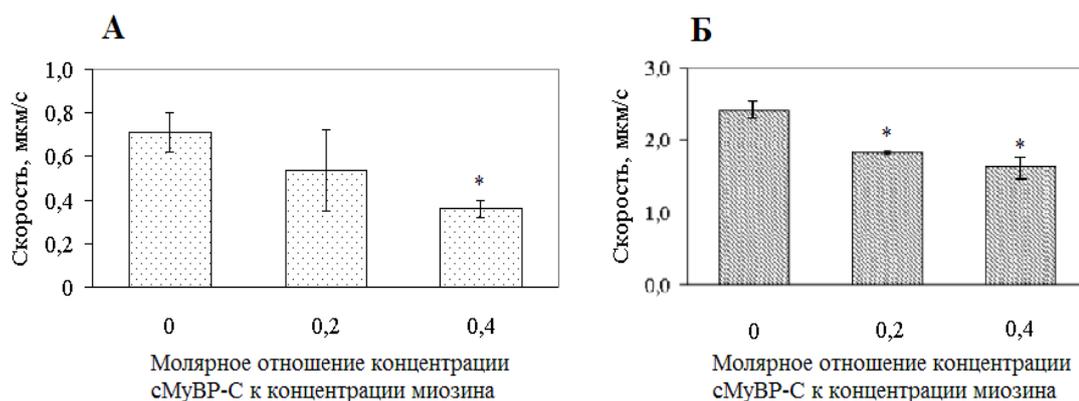


Рисунок 33 - Зависимость скорости скольжения филаментарного актина (А) и регулируемого тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция (Б) по сердечному миозину от концентрации С-белка.

Примечание: скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значения скоростей от контроля (без С-белка), $p < 0,05$.

Результаты наших экспериментов полностью совпадают с данными на искусственных подвижных системах, приведенными в литературе, согласно которым добавление как целого С-белка, так и фрагментов его N-терминальных доменов концентрационно-зависимо уменьшает скорость

движения актиновых филаментов как по скелетному миозину, так и по его протеолитическим субфрагментам [52, 102].

Влияние сердечной изоформы миозин связывающего белка С на связь «pCa-скорость» сердечного миозина

Мы выполнили серию экспериментов на искусственных подвижных системах для исследования зависимости скорости движения реконструированного тонкого филамента от концентрации кальция в диапазоне от pCa 5 до pCa 8). При этом оценивались параметры кривой « pCa -скорость»: коэффициент Хилла и кальциевая чувствительность, определяемая как pCa_{50} .

Добавление С-белка в физиологической концентрации (молярное отношение С-белок/миозин 1:5) снижало скорость движения тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция (рисунок 34). Так, скорость тонкого филамента падает с $2,10 \pm 0,2$ мкм/с до $1,70 \pm 0,09$ мкм/с. Наоборот, добавление С-белка при ненасыщающей концентрации кальция приводило к увеличению скорости движения тонкого филамента до $0,67 \pm 0,1$ мкм/с с С-белком против отсутствия движения без С-белка. Добавление С-белка также меняло кальциевую чувствительность. Наиболее чувствительным к наличию С-белка оказался коэффициент Хилла: $3,7 \pm 0,5$ без С-белка против $0,7 \pm 0,08$ с С-белком.

Razumova и др. [102] наблюдали сходные изменения в форме кривой « pCa -скорость» для скелетного миозина при добавлении N-терминальных доменов С-белка. Кроме того, добавление целого С-белка в концентрации 1:2 (молярное отношение С-белок/миозин) приводило к 25% падению скорости скольжения тонкого филамента по скелетному миозину при насыщающем кальции и ускорению движения филаментов при ненасыщающем кальции.

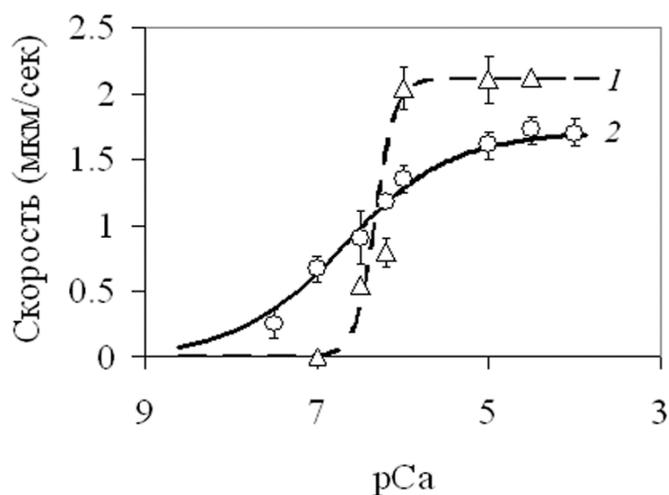


Рисунок 34 - Кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по сердечному миозину от концентрации свободного кальция без С-белка (1) и в его присутствии (2).

Примечание: pCa – отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция. Треугольниками обозначены значения скоростей без С-белка, полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе, кружками – в присутствии С-белка. Концентрации миозина и С-белка, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, что выражается в молярном отношении С-белок/миозин как 1:5. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

Существует ряд гипотез о влиянии С-белка на сократительный акт. Нам с точки зрения интерпретации наших результатов наиболее близкими кажутся гипотезы, в которых предполагается, что С-белок замедляет кинетику поперечных мостиков, когда связывается с актином. Согласно результатам нашего исследования С-белок активирует АТФ-азную активность миозина (рисунок 32), но тормозит скорость движения актина по сердечному миозину в искусственных подвижных системах. Этот наблюдаемый эффект можно объяснить тем, что С-белок может усиливать контакт между миозином и актином, но в то же время сам обладать

тормозящим эффектом, поскольку, связываясь как с актином, так и с миозином, препятствует скольжению актиновых нитей.

В свою очередь С-белок незначительно стимулирует регулирующую АТФазную активность миозиновых филаментов на насыщающей концентрации кальция (pCa 5) и при молярном отношении С-белок/миозин 1:2 на 30% тормозит движение регулируемого тонкого филамента. Принимая во внимание тот факт, что в данном случае тропомиозин-тропониновый комплекс сам активирует АТФазную активность миозина [185], влияние С-белка на АТФазную активность становится несущественно, но также как и в случае с актином С-белок препятствует движению тонких филаментов.

В зависимости от концентрации кальция С-белок оказывает разнонаправленное влияние на скорость движения тонкого филамента (рисунок 34). При насыщающей концентрации кальция (pCa 5) добавление С-белка снижает, а при ненасыщающей кальции (pCa 7) увеличивает скорость движения тонких филаментов. В результате коэффициент Хилла связи « pCa -скорость» значительно снижается, а кальциевая чувствительность увеличивается при добавлении С-белка. Результаты, полученные в экспериментах на искусственных подвижных системах, подтверждаются результатами измерения АТФазной активности. Так, добавление С-белка при ненасыщающей концентрации кальция значительно увеличивает регулирующую АТФазную активность, а при насыщающей кальции присутствие С-белка не оказывает влияния на АТФазную активность сердечного миозина.

Таким образом, при ненасыщающей кальции С-белок стимулирует АТФазную активность миозина, а также активирует движение регулируемого тонкого филамента. Данный эффект можно объяснить, предполагая, что в связи с тем, что поперечные мостики большее время находятся в присоединенном к актину состоянии, возрастает их возможность увеличивать образование новых поперечных мостиков вдоль тонкой нити через кооперативные механизмы. Можно предположить, что в данном случае

играют роль следующие кооперативные механизмы взаимодействия сократительных и регуляторных белков в миокарде: (1) присоединение головки миозина в одной регуляторной группе (семь мономеров актина, тропомиозин и тропониновый комплекс) способно вызвать смещение молекулы тропомиозина в этой и близлежащей регуляторной группе, что облегчает присоединение головки миозина в этой и близлежащих регуляторных группах, (2) механизм Xb-CaTnC: сильное связывание поперечных мостиков в одной регуляторной группе увеличивает сродство тропонина С к кальцию в этой и близлежащих регуляторных группах [67, 135]. В данном случае, с нашей точки зрения, механизм Xb-CaTnC хорошо объясняет активирующий эффект С-белка на ненасыщающем кальции, обнаруженный нами в экспериментах. Действительно, увеличение времени присоединения миозина к актину, обусловленное влиянием С-белка, увеличивает концентрацию поперечных мостиков в единицу времени и согласно указанному механизму кооперативности усиливает сродство тропонина С к кальцию. Иными словами, при той же ненасыщающей концентрации кальция в присутствии С-белка тонкая нить оказывается более активированной.

Наша интерпретация полученных результатов подтверждается результатами недавних исследований, которые показали, что аминокислотная пролин-аланиновая последовательность между доменами C0 и C1 С-белка идентична N-терминальной последовательности существенной легкой цепи миозина [262]. Пролин-аланиновая последовательности и С-белка, и существенной легкой цепи способны связываться с актином. Согласно последним данным, пролин-аланиновая последовательность существенной легкой цепи модулирует актин-миозиновое взаимодействие. А именно, она либо замедляет кинетику открепления поперечных мостиков, когда связывается с актином [279], либо действует как «привязь» [206, 272]. По аналогии с существенной легкой цепью, возможно, что пролин-аланиновая последовательность С-белка выполняет аналогичную функцию и, замедляя

кинетику открепления поперечных мостиков [16, 222], увеличивает время, в течение которого миозин присоединен к актину [264].

Различие данных в искусственных подвижных системах, в частности, группы Lecarpentier [58] и наших, можно объяснить тем, что существует видоспецифичность аминокислотной последовательности первичной структуры сердечных миозинов. Такие важные структуры миозина, как АТФазный карман и актин-связывающий сайт, имеют разные аминокислотные последовательности у разных видов животных, что отражается в функциональных различиях этих белков [207]. Что касается С-белка, как стало известно совсем недавно, первичная аминокислотная последовательность С-белка идентична у всех исследованных видов животных на 83%, но различается по содержанию пролин-аланина в линкерном участке, соединяющим домены С0 и С1. Так, в процентном отношении содержание пролин-аланина у крыс и мышей значительно меньше, чем у кролика, курицы и человека. Shaffer с соавторами [222] пришли к выводу, что возможно, от содержания пролин-аланина зависят функциональные свойства С-белка.

Сравнение кальций-чувствительной актин-миозиновой Mg-АТФазной активности изоформ сердечного миозина V1 и V3, оценка влияния сердечной изоформы миозин-связывающего белка С

Эксперименты по определению Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФазной активности миозина проводились для исследования влияния сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина с тонким регулируемым филаментом, так как в экспериментах на изолированных полосках миокарда было выявлено влияние сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина с актином [150, 159].

В экспериментах мы оценивали влияние различных концентраций сМуВР-С (молярное отношение сМуВР-С к миозину от 0.2 до 2) на регулируемую Mg^{2+} -АТФазную активность филаментов изоформ сердечного

миозина на насыщающей (pCa 4) и ненасыщающей (pCa 7) концентрациях кальция. Как видно из рисунка 35, как при насыщающей, так и при ненасыщающей концентрациях кальция изоформа миозина V1 обладает более высокой Mg^{2+} -АТФазной активностью, чем изоформа V3. Из рисунка также видно, что при любой концентрации кальция сМуВР-С не оказывает статистически достоверного влияния на Mg^{2+} -АТФазную активность обеих изоформ (панели А и Б).

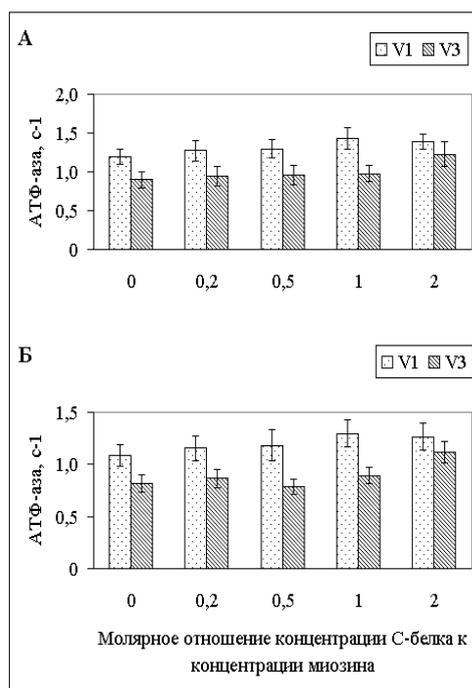


Рисунок 35 - Влияние С-белка на Ca^{2+} -регулируемую АТФазную активность миозиновых филаментов изоформ сердечного миозина V1 и V3 при насыщающей (pCa 4, панель А) и ненасыщающей (pCa 7, панель Б) концентрациях кальция.

Примечание: реакционная смесь при определении Ca^{2+} -регулируемой АТФазной активности миозиновых филаментов содержала следующие концентрации белков: 0,05 мкМ миозиновых филаментов (по миозину), от 0,01 мкМ до 0,1 мкМ С-белка; 10 мкМ F-актина, 2 мкМ тропомиозина и 2 мкМ тропонина. Значения Ca^{2+} -регулируемой АТФазной активности миозина представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение по пяти экспериментам.

Сравнение влияния сердечной изоформы миозин-связывающего белка С на соотношения «pCa-скорость» изомиозинов V1 и V3 в экспериментах на искусственной подвижной системе

Данные о влиянии сМуВР-С на регуляцию сократительной активности, с одной стороны, и на кинетику популяций сильносвязанных поперечных мостиков [264], с другой стороны, наводят на мысль, что влияние сМуВР-С на регуляцию связано с механизмом мостиково-тропониновой кооперативности (Хb-СаТnС) и это влияние может быть различно при доминировании той или иной изоформы сердечного миозина (V1 и V3) в кардиомиоците. В таком случае можно предположить, что сМуВР-С специфически влияет на регуляцию сократительной активности в зависимости от изоформ сердечного миозина.

Для проверки этой гипотезы в серии экспериментов на искусственной подвижной системе мы оценивали зависимость скорости движения реконструированного тонкого филамента по сердечным изомиозином V1 и V3 от концентрации кальция в диапазоне от pCa 5 до pCa 8. Для связи «pCa-скорость» оценивались коэффициент Хилла и кальциевая чувствительность, определяемая как pCa₅₀.

Было найдено, что добавление сМуВР-С в физиологической пропорции (молярное отношение сМуВР-С к миозину 1:5) тормозит скорость скольжения регулируемого тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция по обеим изоформам сердечного миозина. Для изоформы V1 скорость скольжения филамента на насыщающей концентрации кальция составила $3,2 \pm 0,08$ мкм/с, а при добавлении сМуВР-С скорость падала до $1,73 \pm 0,08$ мкм/с. Для изоформы V3 скорость скольжения филамента без сМуВР-С составила $2,1 \pm 0,02$ мкм/с, при добавлении сМуВР-С скорость снижалась до $1,66 \pm 0,1$ мкм/с (рисунок 36).

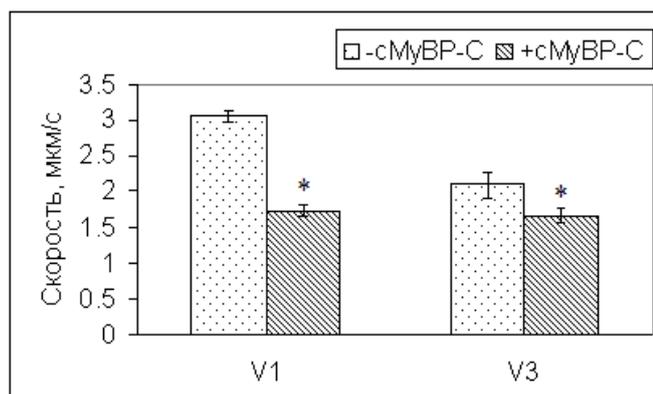


Рисунок 36 - Зависимость скорости скольжения регулируемого тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция от изоформ сердечного миозина V1 и V3 в присутствии и в отсутствие С-белка.

Примечание: концентрации миозина и С-белка, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, в молярном отношении С-белок/миозин, 1:5. Скорость скольжения представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значения скоростей от контроля (без С-белка), $p < 0,05$.

Добавление сМуВР-С к изомиозину V1 в физиологичном соотношении (молярное отношение сМуВР-С к миозину 1:5) не влияет на коэффициент Хилла и кальциевую чувствительность связи « pCa -скорость» (рисунок 37А). Так, коэффициент Хилла для связи « pCa -скорость» без сМуВР-С составил $2,28 \pm 0,78$, а с сМуВР-С – $1,56 \pm 1,11$. Кальциевая чувствительность (pCa_{50}) связи « pCa -скорость» без сМуВР-С – $6,97 \pm 0,28$, с сМуВР-С – $7,06 \pm 0,12$.

В то же время добавление сМуВР-С к изомиозину V3 (рисунок 37Б) приводило к уменьшению коэффициента Хилла ($1,4 \pm 0,18$ без С-белка и $0,7 \pm 0,14$ с С-белком), тогда как кальциевая чувствительность (pCa_{50}) связи « pCa -скорость» не изменялась ($7,2 \pm 0,2$ без С-белка и $7,06 \pm 0,1$ с С-белком).

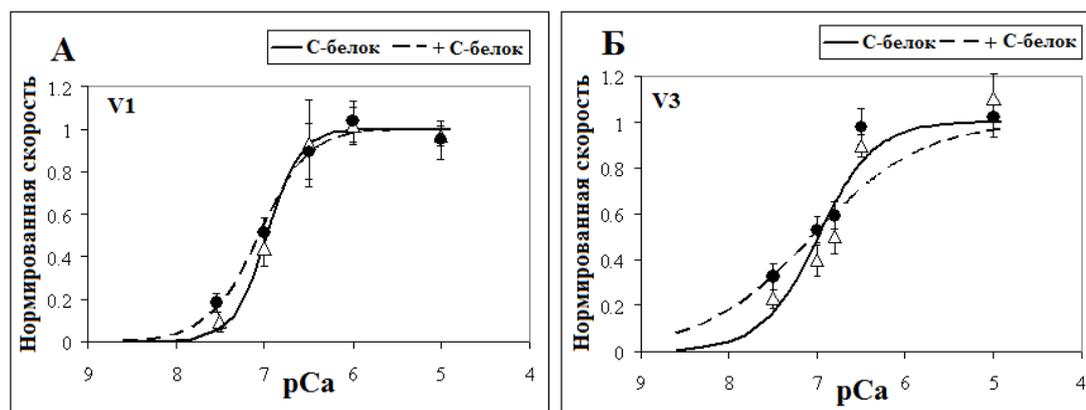


Рисунок 37 - Нормированные кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по изоформам V1 (панель А) и V3 (панель Б) сердечного миозина от концентрации свободного кальция.

Примечание: треугольниками обозначены полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе значения скоростей без С-белка (сплошная линия), кружками – в присутствии С-белка (пунктирная линия). Концентрации миозина и С-белка, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, или, в молярном отношении С-белок/миозин, 1:5. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла.

Результаты наших экспериментов показали, что сМуВР-С специфически влияет на коэффициент кооперативности Хилла связи «pCa-скорость» в зависимости от изоформ сердечного миозина. Можно предположить, что влияние сМуВР-С на связь «pCa-скорость» смеси изоформ, имеющей место в сердце, определяется именно изоформой V3. С-белок модулирует взаимодействие миозина с актином, но по-разному влияет, как показали наши исследования, на кинетические характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, а также на кооперативные эффекты поперечных мостиков этих изоформ на средство тропонина С к кальцию через механизм Хб-СаТнС кооперативности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди внутриклеточных механизмов, позволяющих сердечной мышце приспосабливаться к изменяющимся механическим условиям, в которых происходит ее сокращение, особое внимание в современных исследованиях уделяется механизмам, реализующим вклад механических факторов в кальциевую регуляцию тонких нитей саркомеров.

Эти механизмы являются предметом исследований данной работы. Наиболее важные среди них - механизмы кооперативности, модулирующие взаимодействие регуляторных и сократительных белков в кардиомиоцитах.

Ключевая роль, по мнению ряда исследователей, принадлежит двум механизмам кооперативности [67, 135, 241, 297]:

- сродство тропонина С к кальцию вдоль актиновых нитей саркомеров тем выше, чем больше миозиновых поперечных мостиков прикрепилось к этим тонким нитям (кооперативность $Xb-CaTnC$);

- сродство тропонина С к кальцию вдоль актиновых нитей саркомеров тем выше, чем больше образовалось самих кальций-тропониновых комплексов вдоль этих нитей (кооперативность $CaTnC-CaTnC$).

Как подчеркивают Gordon с соавторами [135], эти два механизма вносят значительный вклад в регуляцию сократительной активности сердечной мышцы.

В частности, предполагается, что эти механизмы лежат в основе влияния механических условий сокращений миокарда на активацию/инактивацию его сократительной функции [121, 123, 133, 198, 211, 259]. А именно, увеличение расстояния между актиновыми и миозиновыми нитями в ходе укорочения мышцы (саркомеров) уменьшает вероятность образования поперечных мостиков, что через кооперативность $Xb-CaTnC$ уменьшает концентрацию кальций-тропониновых комплексов, в то время как кооперативность $CaTnC-CaTnC$ усиливает этот эффект, т.е.

происходит инактивация сердечной мышцы. Наоборот, увеличение длины мышцы (саркомеров) способствует ее активации.

В рамках математической модели сократительной активности миокарда было установлено [17, 68], что именно эта цепочка внутриклеточных событий предопределяет широкий спектр экспериментально установленных механо-механических, механо-кальциевых и механо-электрических *обратных* связей в цикле «сокращение-расслабление» миокарда. Как показал анализ модели [17, 68], именно данная цепочка событий является причиной таких фундаментальных эффектов, характерных для сердечной мышцы, как ее грузозависимое расслабление и инактивация в ответ на кратковременные деформации в ходе изометрического цикла «сокращение-расслабление». В модели показано, что эта же цепочка событий ответственна за тесно связанные с данными эффектами механо-зависимые различия во временном ходе изменения концентрации кальция в цитозоле («кальциевых переходах») и длительностях потенциалов действия, обнаруженные в классических экспериментальных исследованиях на папиллярных мышцах и трабекулах около тридцати лет назад [19, 180, 181] и впоследствии многократно подтвержденных в других работах [70, 85, 163, 187, 266, 267, 275], в том числе и на изолированных клеточных препаратах [201, 290].

Таким образом, сформировалось и подкреплено большим количеством экспериментальных и теоретических работ представление о значительном вкладе указанных механизмов кооперативности в регуляцию сократительного цикла сердечной мышцы, и в ритмоинотропные явления в нормальных и патологических условиях. Причем, кооперативность выступает во всех этих случаях как ключевой механизм, обеспечивающий механозависимость кальциевой регуляции циклов «сокращение-расслабление» миокарда.

Поскольку кооперативность $Xb-CaTnC$, с одной стороны, связывает обратными связями сократительные и регуляторные белки миокарда в процессе активации тонкой нити, а с другой, существующие в сердце

млекопитающих две изоформы миозина обладают разными гидролитическими, кинетическими и механическими характеристиками, то встает закономерный вопрос о возможной модуляции разными изоформами миозина регуляторных механизмов активации тонкой нити через данный тип кооперативности.

Поскольку кооперативность Xb-CaTnC - это механизм, лежащий в основе ряда важнейших феноменов биомеханики сердечной мышцы, связанных с влиянием механических условий сокращений на ее активацию [1, 68], то возможные изменения этой кооперативности в различных механически взаимодействующих между собой кардиомиоцитах стенки желудочка должны существенно модулировать ход развития напряжения в каждом из них и в стенке в целом. Это могло бы пролить свет на определенные аспекты неоднородности миокарда на тканевом уровне, а именно, на механическое взаимодействие кардиомиоцитов из различных сегментов желудочка, расположенных в направлении распространения волны возбуждения в сердце. Поскольку соотношение V1 и V3 изоформ сердечных изомиозинов различается в таких кардиомиоцитах, то это через количественные различия в Xb-CaTnC кооперативности может привести к различиям в механокальциевых обратных связях в этих миоцитах и сложным механическим динамическим взаимодействиям между ними. Поэтому при взаимодействии кардиомиоциты будут перетягивать друг друга, сложным образом меняя длины друг друга. Изменения длины через изменение межфиламентарных расстояний (механизм «lattice spacing») могут влиять на концентрацию присоединившихся мостиков, что, в свою очередь, модулирует кальциевую регуляцию сокращений сердечной мышцы. Таким образом, кооперативность Xb-CaTnC может связывать между собой механическую неоднородность миокарда на молекулярном, межклеточном и органном уровнях.

Одна из центральных задач данной работы - проверка гипотезы о существенной модуляции разными изоформами сердечного миозина

обратных связей между кинетикой кальций-тропониновых комплексов и кинетикой поперечных мостиков через механизм кооперативности Хб-СаТnC.

Метод искусственной подвижной системы позволяет изучать непосредственное взаимодействие регуляторных и сократительных белков на уровне тонкого филамента, что дает возможность избежать артефактов, связанных с пассивными механическими свойствами целой мышцы, либо кардиомиоцита. В рамках этого метода можно, варьируя концентрации свободного кальция, регистрировать связи « pCa -скорость» и « pCa -сила» на уровне взаимодействующих белков, а также связь «сила-скорость», используя актин-связывающие белки, тормозящие движение филаментов. Метод позволяет оценивать такие характеристики кальциевой активации тонкого филамента, как коэффициент кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность связей « pCa -скорость» и « pCa -сила». Метод позволяют также, меняя соотношение изоформ сердечного миозина, судить о их роли через влияние на эти характеристики. Важно отметить, что поскольку метод даёт возможность менять (либо, как в данном случае, поддерживать постоянным) состав регуляторных белков, варьируя только соотношение изоформ моторного белка, это позволяет изолированно исследовать эффекты Хб-СаТnC кооперативности на изменения в коэффициенте Хилла и кальциевой чувствительности.

Мы сознаем ограничения метода искусственных подвижных систем. Создавая *in vitro* систему, состоящую только из ключевых взаимодействующих звеньев сократительного и кальций-регуляторного аппаратов мышцы, мы можем потерять существенные модуляторы связи между этими элементами, имеющиеся в сердечной клетке *in vivo*. Однако метод искусственных подвижных систем открыт для подключения к нему других белков саркомера и изучения их вклада в актин-миозиновое взаимодействие и его регуляцию. Причем, в такой системе этот вклад может изучаться сфокусировано, исключая иные факторы, существующие в

кардиомиоците. В частности, именно такое исследование было проведено нами с включением в искусственную подвижную систему миозин-связывающего белка С и изучением его модулирующей роли в регуляции сокращений. Аналогичные исследования могут быть проведены и с другими белками.

С помощью метода искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом мы исследовали вклад изоформ сердечного миозина в активацию тонкого филамента. При сравнении характеристик связей « pCa -сила» для изоформ сердечных миозинов V1 и V3 при разных концентрациях белков оказалось, что расхождения в коэффициентах Хилла и кальциевой чувствительности разных изомиозинов наблюдаются при снижении их концентрации. Также выяснилось, что для каждого изофермента с понижением его концентрации коэффициент кооперативности возрастает. Эти данные являются новыми. В единственной опубликованной ранее работе, где оценивалось отношение « pCa -сила» для изомиозинов V1 и V3 [217], авторы приводят данные только для одной концентрации миозинов. В опубликованном протоколе эксперимента они даже не указывают, какова именно эта концентрация, что свидетельствует о том, что они вообще не рассматривают концентрацию миозина в качестве фактора, способного влиять на наклон кривой « pCa -сила» и на кальциевую чувствительность. Изменения коэффициента Хилла при разных концентрациях изоформ миозина дают основание предполагать, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов для V1 сильнее, чем для V3 [5]. Что касается кальциевой чувствительности, то наши данные по кривым « pCa -сила» [5] и « pCa -скорость» [9] показывают, что изоформа V3 обладает большей чувствительностью к кальцию. Кальциевая чувствительность этих связей – характеристика, связанная с регуляторными процессами в мышце, поэтому влияние V3 на эту характеристику, видимо, является свидетельством компенсаторного вклада обратных связей между

миозином и кинетикой кальций-тропониновых комплексов в регуляцию сокращения.

Более детальную информацию о кооперативном влиянии изоформ V1 и V3 на кальциевую регуляцию сократительной активности даёт одновременная регистрация нагрузки на нить и скорости движения нити под этой нагрузкой при данной кальциевой активации. Такую информацию мы получаем из кривых «сила–скорость», регистрируемых в искусственных подвижных системах с регулируемой тонкой нитью при разных концентрациях кальция.

Результаты наших экспериментов на искусственной подвижной системе показали, что максимальная скорость скольжения тонкого филамента по изоформе V1 больше максимальной скорости скольжения по изоформе V3, а сила, развиваемая изомиозином V1 меньше силы V3 как при насыщающей, так и при ненасыщающей концентрациях кальция. Таким образом, связь «сила-скорость», зарегистрированная при разных уровнях кальция, отличается у изоформ миозина, и это отличие может быть связано с тем, что вклад этих изоформ в кооперативность Xb-CaTnC различен. Следует отметить, что при изменении концентрации кальция степень кривизны связи «сила-скорость» для изоформы V3 меняется в большей степени, что так же, как и зависимости « pCa -сила» [5] и « pCa -скорость» [9], свидетельствует о её большей чувствительности к изменению концентрации кальция.

В нашей работе мы также исследовали возможный вклад изоформ тропомиозина и сердечного миозин-связывающего белка С в регуляцию сократительной активности миокарда. Поскольку эти два белка принимают участие в регуляции актин-миозинового взаимодействия мы попытались ответить на вопрос: могут ли эти белки модулировать вклад различных сердечных изомиозинов в кальциевую регуляцию сокращений через кооперативность Xb-CaTnC.

В частности, в исследованиях с использованием искусственных подвижных систем мы оценили влияние разных изоформ тропомиозина как

на актин-миозиновое взаимодействие, так и на его регуляцию в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3. Для этого использовались изоформы тропомиозина, содержащие различное соотношение α - и β - цепей. Для моделирования ситуаций, характерных для ряда сердечных патологий, при которых в больших количествах экспрессируется β -цепь тропомиозина, использовался тропомиозин, выделенный из спинной мышцы кролика (*m. psoas*).

Результаты наших экспериментов изучению влияния изоформ тропомиозина на кальциевую активацию тонкого филамента (связь « pCa -скорость») показывают, что тропомиозин по-разному модулирует влияние каждой из изоформ сердечного миозина на кинетику кальций-тропониновых комплексов.

Часть экспериментов на искусственной подвижной системе была посвящена проверке гипотезы о специфическом влиянии сМуВР-С на регуляцию актин-миозинового взаимодействия в миокарде вообще, и о зависимости этого влияния от изоформ сердечного миозина, в частности.

В экспериментах на искусственной подвижной системе с сердечным миозином (*впервые!*) в качестве моторного белка мы определили, что добавление МуВР-С в физиологической пропорции (молярное отношение МуВР-С/миозин 1:5) оказывает разнонаправленное влияние на скорость движения тонкого филамента в зависимости от концентрации кальция [98]. В частности, добавление сМуВР-С понижает скорость движения тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция на 20% (pCa 5), но увеличивает скорость при ненасыщающей кальции (pCa 7). Установлено, что при добавлении сМуВР-С коэффициент Хилла связи « pCa -скорость» снижается, а кальциевая чувствительность увеличивается. Результаты, полученные в эксперименте на искусственных подвижных системах, подтверждаются результатами измерения регулируемой АТФазной активности (глава 5).

Существует целый ряд гипотез о влиянии сМуВР-С на сократительный акт. Нам с точки зрения интерпретации наших результатов, наиболее близкими кажутся гипотезы, в которых предполагается, что сМуВР-С замедляет кинетику поперечных мостиков, когда связывается с актином.

Итак, мы определили, что на ненасыщающем кальции сМуВР-С стимулирует АТФазную активность миозина и ускоряет движение регулируемого тонкого филамента. Это можно объяснить тем, что благодаря сМуВР-С поперечные мостики дольше находятся в присоединенном к актину состоянии, они способны увеличивать кооперативное образование новых поперечных мостиков вдоль тонкой нити. Можно предположить, что в данном случае играют роль следующие кооперативные механизмы взаимодействия сократительных и регуляторных белков в миокарде: 1) присоединение головки миозина в одной регуляторной группе (семь мономеров актина, тропомиозин и тропониновый комплекс) способно вызвать смещение молекулы тропомиозина в этой и близлежащей регуляторной группе, что облегчает присоединение головок миозина в этих регуляторных группах, 2) механизм мостико-тропомионовой кооперативности Хб-СаТnC: [67, 135]. С нашей точки зрения, последний механизм хорошо объясняет активирующий эффект сМуВР-С при ненасыщающем кальции, обнаруженный нами в экспериментах на искусственных подвижных системах (глава 5). Вслед за нами исследования влияния сМуВР-С на комплексе белков сердечной мышцы, включающем сердечный миозин и сердечные регуляторные белки, были проведены группой ведущих американских исследователей [224]. В этой работе с использованием метода искусственной подвижной системы, были получены результаты, повторяющие наши данные. Сопоставляя результаты электронной микроскопии с данными на искусственной подвижной системе, авторы делают вывод, что сМуВР-С может связываться на тонком филаменте не только с актином, но и с тропомиозином. При низкой концентрации кальция сМуВР-С сдвигает тропомиозин с «блокирующей» позиции и тем самым модулирует активацию

тонкого филамента. Падение скорости скольжения тонкого филамента при насыщающей концентрации кальция авторы приписывают «независимому молекулярному механизму» [224].

Поскольку модулирующее влияние сМуВР-С на регуляцию взаимодействия сердечного миозина с тонким филаментом оказывается существенным, было естественным исследовать этот феномен для каждой из изоформ сердечного миозина отдельно.

Результаты исследования влияния сМуВР-С на регуляцию сократительной активности миокарда в зависимости от изоформ сердечного миозина показали, что добавление сМуВР-С в физиологичном соотношении (молярное отношение сМуВР-С к миозину 1:5) к изомиозину V1 не влияет на коэффициент Хилла и кальциевую чувствительность кривой « pCa -скорость», тогда как добавление сМуВР-С к изомиозину V3 снижает коэффициент Хилла, не влияя на кальциевую чувствительность (pCa_{50}) кривой « pCa -скорость». Было определено, что влияние сМуВР-С на характеристики связи « pCa -скорость» для V3 выражено значительно сильнее, чем для V1. Можно полагать, что влияние сМуВР-С на связь « pCa -скорость» для смеси изоформ, имеющей место в сердце, определяется именно изоформой V3.

Таким образом, в результате проведенных исследований с использованием метода искусственных подвижных систем мы доказали существование обратных связей между кинетикой кальций-тропониновых комплексов и кинетикой поперечных мостиков. В экспериментах *in vitro* мы показали разный вклад изоформ сердечного миозина в процесс активации тонкой нити. Также было показано модулирующее влияние как изоформ тропомиозина, так и сердечного миозин-связывающего белка С на этот процесс и определена специфичность влияния изоформ сердечного миозина.

Коэффициент Хилла связей « pCa -сила» и « pCa -скорость» считается интегральным показателем всех типов кооперативности, модулирующих сократительные свойства миоцита. Результаты наших исследований показали, что коэффициент Хилла связи « pCa -сила» изоформ сердечного

миозина различается при низких концентрациях миозина на подложке, но при высоких концентрациях миозина коэффициент Хилла отличается слабо, в то время как кальциевая чувствительность, оцененная по величине pCa_{50} , при обеих концентрациях белков выше для изоформы миозина V3. Модулирующее влияние изоформ тропомиозина на активацию тонкого филамента проявляется в значительном изменении кальциевой чувствительности. Вопрос о неизменности коэффициента Хилла при вариабельности кальциевой чувствительности требует особого обсуждения.

В серии работ, выполненных на протяжении последних десяти лет рядом исследователей (de Tombe, Irving и др.) на скинированных мышечных препаратах, в т.ч. сердечных (трабекулах), было установлено, что изменение длины препарата и/или межфиламентарного расстояния в его саркомерах заметно влияет на кальциевую чувствительность стационарной кривой « pCa -сила» (т.е. на ее сдвиг вдоль оси pCa), однако очень слабо влияет на коэффициент кооперативности Хилла (т.е. на наклон этой кривой) [71, 74, 88, 176, 177, 261, 271]. Как уже отмечалось, коэффициент Хилла связи « pCa -сила» считается интегральным показателем всех типов кооперативности. Справедливо замечание, сделанное R. Moss с соавторами в одной из обзорных статей, посвященных исследованиям механизмов кооперативности: «Хотя изменения коэффициента Хилла означают, что кооперативность изменилась, однако из этого вовсе не следует с определенностью, что изменения кооперативности должны всегда вызывать изменения в наклоне кривой « pCa -сила»...» [211]. Тем не менее, следует признать, что отсутствие изменений наклона этой кривой - серьезное основание для постановки вопроса о том, произошли ли изменения в кооперативности. Поэтому не удивительно, что результаты, полученные de Tombe, Irving и др., заставили этих авторов и многих других исследователей усомниться в наличии существенно длинозависимой кооперативности, а значит, и во вкладе механизмов кооперативности в механозависимость кальциевой активации мышечных сокращений.

Таким образом, по данному вопросу имеются, на первый взгляд, весьма противоречивые воззрения. Причем позиции каждой из сторон достаточно сильно аргументированы.

Нам представляется, что это противоречие является мнимым, и что все перечисленные выше данные могут быть хорошо согласованы друг с другом, если допустить, что кооперативная зависимость кинетики комплексов CaTnC от концентрации поперечных мостиков и самих комплексов имеет разную степень выраженности в стационарном состоянии (при постоянном уровне кальция и, соответственно, при постоянной концентрации прикрепившихся Xb) и в переходном процессе в ответ на изменение концентрации Xb .

Это предположение можно сформулировать в виде следующей гипотезы: прикрепление поперечных мостиков увеличивает сродство тропонина C к кальцию, но в стационарных условиях константа этого сродства не может становиться больше некоего максимального значения. Назовем это предельное значение AL (т.е. Affinity Limit). Однако непосредственно в ответ на изменение (рост/падение) числа прикрепившихся мостиков могут происходить более сильные изменения сродства TnC к кальцию. В частности, непосредственно в ответ на прикрепление новых мостиков возникает переходной процесс, в начале которого константа этого сродства может значительно превосходить AL , но затем происходит ее постепенное снижение до уровня AL . Такое характер переходного процесса возможно связан с тем, что влияющие на сродство тропонина к кальцию конформационные изменения в функциональной группе A_7TmTn , вызванные образованием поперечного мостика, имеют динамическую и стабильную конформационные фазы.

Тогда в стационарном состоянии кооперативность оказывается менее выраженной, чем непосредственно в ответ на изменение концентрации поперечных мостиков и в начале переходного процесса после этого изменения. При этом, в циклах «сокращение-расслабление» кооперативность должна вести себя как в переходном процессе (т.е. быть выраженной

достаточно сильно), поскольку сокращение в этом случае происходит в ответ на короткий кальциевый переход, для которого характерна непрерывная резкая смена внутриклеточной концентрации кальция (и, соответственно, постоянно меняющаяся концентрация поперечных мостиков). С другой стороны, характеристики связи « pCa -сила» должны определяться стационарным состоянием этой кооперативности. Поэтому при малых концентрациях кальция (и, соответственно, очень низких концентрациях поперечных мостиков), пока сродство TnC к кальцию в переходных процессах не превышает AL , кооперативность в переходном процессе и в стационарном состоянии при одном и том же уровне кальция будет выражена одинаково. Однако, при больших концентрациях кальция в стационарном состоянии кооперативность будет выражена гораздо слабее, чем в переходном процессе. Поэтому можно ожидать, что кальциевая чувствительность стационарной кривой « pCa -сила» (т.е. ее сдвиг вдоль оси « pCa ») в большей степени будет зависеть от концентрации поперечных мостиков, чем коэффициент кооперативности Хилла этой кривой (т.е. ее наклон). А это будет соответствовать данным de Tombe, Irving и др. [71, 74, 88, 176, 177, 261, 271]. В настоящее время гипотеза проверяется как в эксперименте, так и в математической модели. В частности, полученные нами в искусственной подвижной системе данные о влиянии разных концентраций изоформ сердечного на характеристики связи « pCa -сила» хорошо согласуются с этой гипотезой.

Результаты нашего исследования дают основание обсудить возможный вклад изменения изоферментного состава белков сократительного аппарата сердечной мышцы в регуляцию ее сокращений при патологии.

Известно, что экспрессия изоформ сердечного миозина зависит от вида животного, его возраста и гормонального статуса [192, 220]. Так, при гипертиреозе происходит сдвиг экспрессии к изоформе V1. При гипотиреозе, а также при патологиях сердца, вызванных перегрузкой давлением, возникающим при искусственном или естественном стенозе аорты или

митрального клапана, происходит сдвиг в сторону изоформы V3 [171]. Преимущественная экспрессия гена, кодирующего медленную β -цепь миозина, ведёт к уменьшению максимальной скорости сокращения сердечной мышцы и оказывает отрицательный инотропный эффект. Этот сдвиг также влияет на энергетическую экономию мышцы, т.к. мышца, содержащая медленные β -тяжелые цепи миозина, генерирует напряжение более эффективно, чем мышца с более быстрыми изоформами. Из этих соображений сдвиги в содержании изоформ, происходящие в описанных выше случаях, вероятно, играют важную роль в адаптации сердечной деятельности к меняющимся условиям функционирования миокарда. Хотя замещение быстрых изоформ медленными снижает сократительную способность миокарда, замедляя среднее время цикла поперечных мостиков, оно повышает эффективность за счёт увеличения доли работы в цикле гидролиза АТФ. Таким образом, преимущественная экспрессия низко-АТФазного миозина V3 при хронической перегрузке сердца является механизмом экономии энергии, способствующим адаптации сердечной мышцы к изменению условий её функционирования [22, 171]. Наши исследования связей « pCa -сила» и «сила-скорость» показали, что изомиозин V3 обладает более высокой кальциевой чувствительностью по сравнению с изомиозином V1. Т.е. активация тонкого филамента в случае изоформы миозина V3 происходит при более низкой концентрации кальция. В условиях сердечной недостаточности это может являться еще одним способом тонкой адаптации сердечной деятельности.

Известно, что при гипертрофии сердца происходит сдвиг в экспрессии не только изоформ миозина преимущественно в сторону V3, но и изоформ тропомиозина преимущественно к β -цепи. Результаты наших исследований показали, что кальциевая чувствительность связи « pCa -скорость» значительно увеличивается в сочетании изоформы миозина V3 с изоформой тропомиозина состава $\alpha\beta$ (60 : 40%). Поскольку в такой мышце увеличена

доля медленного изомиозина V3, то укорачивается она медленнее. Но на этом фоне максимальная скорость укорочения достигается при меньших концентрациях кальция. В этом проявляется компенсаторная роль увеличения доли β -цепи тропомиозина. Несмотря на то, что наши результаты были получены в системе *in vitro* при постоянном уровне кальция, можно допустить, что и в сократительных циклах интактного кардиомиоцита увеличение доли β -цепи тропомиозина может давать компенсаторные эффекты. Т.е. может запускаться механизм, компенсирующий замедление укорочения кардиомиоцитов с преобладающей в них изоформой V3.

Наличие изоформ сердечного миозина – существенный фактор, определяющий механическую неоднородность сердца. Трансмуральные различия в экспрессии изоформ миозина определяют региональную неоднородность механической функции левого желудочка, регулируют генерацию силы в толще стенки желудочка и работу во время систолы [287]. Было показано, что различия в трансмуральной экспрессии изоформ миозина в желудочке свиньи способствуют синхронизации развития напряжения в стенке желудочка, оптимизируя насосную функцию сердца. Сердечный миозин-связывающий белок C, выступая как регулятор взаимодействия миозина с актином, по-разному влияет как на кинетические характеристики изоформ сердечного миозина V1 и V3, так и на кооперативное влияние поперечных мостиков, образованных этими изоформами на активацию тонкой нити. Таким образом, сердечный миозин-связывающий белок C специфически влияет на механическую и регуляторную функции изоформ сердечного миозина и может модулировать как их адаптивный вклад в сократительную функцию сердца, так и их роль в механической неоднородности миокарда.

Недавно было выявлено [248], что во время повреждения миокарда у мышей, крыс и человека в циркулирующей крови были обнаружены N-терминальные фрагменты C-белка, и это четко коррелировало с

сократительной дисфункцией сердца. Кроме того, недавние исследования показывают, что уровень сМуВР-С в плазме крови значительно увеличивается при инфаркте миокарда как у крыс в эксперименте, так и у пациентов, указывая, что уровень сМуВР-С в плазме крови может быть потенциальным диагностическим биомаркером инфаркта миокарда [248].

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании связей « pCa -скорость», « pCa -сила», «сила-скорость» изоформ сердечного миозина методом искусственной подвижной системы обнаружено, что кооперативная зависимость кинетики кальций-тропониновых комплексов различна для изоформ сердечного миозина V1 и V3.
2. В экспериментах на искусственной подвижной системе выявлено, что взаимодействие сердечного миозина с актин-тропомиозиновым филаментом зависит от состава как тяжёлых, так и лёгких цепей миозина; показано наличие обоюдного влияния изоформ миозина и тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие, что может играть роль в поддержании эффективной работы сердечной мышцы в процессе онтогенеза и при патологических состояниях.
3. В экспериментах на искусственной подвижной системе обнаружено существенное влияние изоформ тропомиозина на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия и рост кальциевой чувствительности связи « pCa -скорость» при увеличении β изоформы тропомиозина, что может являться способом тонкой адаптивной настройки сердечной деятельности в онтогенезе и при патологии.
4. Полученные на подвижных системах *in vitro* результаты подтверждают регуляторную роль сердечного миозин-связывающего белка С, которая

может проявляться в замедлении С-белком кинетики поперечных мостиков сердечного миозина при связи С-белка с актином.

5. В экспериментах на искусственной подвижной системе выявлено, что С-белок специфически влияет на коэффициент кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность связи « pCa -скорость» в зависимости от изоформ сердечного миозина V1 и V3, т.е. модулирует кооперативное влияние сильносвязанных поперечных мостиков на кальциевую активацию тонких нитей кардиомиоцитов.
6. Обоснована ключевая роль кооперативного влияния миозиновых поперечных мостиков на сродство кальций-тропониновых комплексов в качестве механизма, реализующего различный вклад изоформ сердечного миозина V1 и V3 в кальциевую регуляцию сокращений миокарда.

Практические рекомендации

1. Результаты диссертации следует использовать при разработке учебных курсов физиологии, биофизики, биомеханики в университетах.

2. Выводы диссертации могут быть использованы в кардиологии для оценки и прогноза состояний сократительной функции сердечной мышцы при гипер- и гипотиреозе, гипертрофической кардиомиопатии, вызванной перегрузкой давлением или объемом, и других патологиях сердца, сопровождающихся изменением изоформного состава сократительных и регуляторных белков.

Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДТТ – дитийотрейтол

ЛММ – легкий меромиозин

ПААГ – полиакриламидный гель

ТМРФ – тетраметилродамин-фаллоидин

ТММ – тяжелый меромиозин

ТЦМ – тяжелые цепи миозина

ЭДТА – этилендиамин тетрауксусная кислота

ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота

A_7TmTn – регуляторная группа тонкого филамента, состоящая из актина, тропомиозина и тропонинового комплекса

F-актин – филаментарный актин

G-актин – глобулярный актин

SDS – додецил сульфат натрия

TnC – тропонин C

TnI – тропонин I

TnT – тропонин T

Xb – поперечный мостик

Xb-TnC – мостико-тропониновая кооперативность

CaTnC- CaTnC – тропонин-тропониновая кооперативность

S1 – субфрагмент 1 миозина

S2 – субфрагмент 2 миозина

LC – легкие цепи миозина

NEM – N-этилмалеимид

*p*PDМ – N,N'-*p*-фенилендималеимид

*p*Ca – отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция

*p*Ca₅₀ – концентрация кальция, при которой достигается половина максимальной скорости/силы (кальциевая чувствительность).

Таблица названий и обозначений аминокислот

A	Ala	Alanine	Аланин
R	Arg	Arginine	Аргинин
N	Asn	Asparagine	Аспарагин
D	Asp	Aspartic Acid	Аспарагиновая кислота
C	Cys	Cysteine	Цистеин
Q	Gln	Glutamine	Глутамин
E	Glu	Glutamic Acid	Глутаминовая кислота
G	Gly	Glycine	Глицин
H	His	Histidine	Гистидин
I	Ile	Isoleucine	Изолейцин
L	Leu	Leucine	Лейцин
K	Lys	Lysine	Лизин
M	Met	Methionine	Метионин
F	Phe	Phenylalanine	Фенилаланин
P	Pro	Proline	Пролин
S	Ser	Serine	Серин
T	Thr	Threonine	Треонин
W	Trp	Tryptophan	Триптофан
Y	Tyr	Tyrosine	Тирозин
V	Val	Valine	Валин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биомеханика неоднородного миокарда / В.С. Мархасин, Л.Б. Кацнельсон, Л.В. Никитина, Ю.Л. Проценко, С.М. Руткевич, О.Э. Соловьева, Г.П. Ясников. – Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 253 с.
2. Бэгшоу К. Мышечное сокращение: пер. с англ. / К. Бэгшоу. – М.: Мир, 1985. – 128 с.
3. Изаков В.Я. Биомеханика сердечной мышцы / В.Я. Изаков, Г.П. Иткин, В.С. Мархасин. – М.: Наука, 1981. – 326 с.
4. Исследование взаимодействия сократительных и регуляторных белков миокарда кролика методом искусственных подвижных систем / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Кацнельсон // Биохимия. – 2008. – Т. 73, №2. – С. 219-227.
5. Копылова Г.В. Исследование регуляторного влияния тропомиозина на актин-миозиновое взаимодействие в скелетной мышце методом *in vitro* подвижных систем / Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.В. Никитина // Биохимия. – 2013. – Т. 78(3). – С. 348-356.
6. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики / Э. Корниш-Боуден. – М.: Мир, 1979. – 280 с.
7. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты / Б.И. Курганов. – М.: Наука, 1978. – 248 с.
8. Метод оценки механических характеристик контрактильного элемента в изолированных препаратах миокарда / В.С. Мархасин, С.М. Руткевич, Л.В. Никитина, Ю.Л. Проценко // Рос. физиол. журнал им. И.М.Сеченова. – 1997. – Т. 83(7). – С. 136-139.
9. Оценка механической активности сердечных изомиозинов V1 и V3 методом искусственных подвижных систем с регулируемой тонкой нитью / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Кацнельсон // Биофизика. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 956-962.
10. Поглазов Б.Ф., Левицкий Д.И. Миозин и биологическая подвижность / Б.Ф. Поглазов, Д. И. Левицкий. – М.: Наука, 1982. - 160 с.

11. Применение метода *in vitro* подвижных систем для исследования кальций-механической связи в скелетной и сердечной мышцах / Г.В. Копылова, Л.Б. Кацнельсон, Д.А. Овсянников, С.Ю. Бершицкий, Л.В. Никитина // Биофизика. – 2006. – Т. 51, №5. – С. 781-785.
12. Проблема неоднородности миокарда / В.С. Мархасин, О.Э. Соловьева, Т.В. Чумарная, С.В. Сухарева // Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2009. – Т.95(9). – С. 919-943.
13. Экспериментальная модель механически неоднородного миокарда (метод дуплетов) / С.М. Руткевич, В.С. Мархасин, Л.В. Никитина, Ю.Л. Проценко // Росс. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 1997. – Т. 83(4) – С. 131-134.
14. A mutant tropomyosin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed *in vivo* and associated with an increased calcium sensitivity / R. Bottinelli, D.A. Coviello, C.S. Redwood, M.A. Pellegrino, B.J. Maron, P. Spirito, H. Watkins, C. Reggiani // *Circ Res.* – 1998. – Vol. 82(1). – P. 106-115.
15. A new *in vitro* motility assay technique to evaluate calcium sensitivity of the cardiac contractile proteins / M. Sata, H. Yamashita, S. Sugiura, H. Fujita, S. Momomura, T. Serizawa // *Pflugers Arch.* – 1995. – Vol. 429(3). – P. 443-445.
16. Activation of myocardial contraction by the N-terminal domains of myosin binding protein-C / T.J. Herron, E. Rostkova, G. Kunst, R. Chaturvedi, M. Gautel, J. C. Kentish // *Circ. Res.*, 2006. – Vol. 98. – P. 1290-1298.
17. Activation sequence as a key factor in spatio-temporal optimization of myocardial function / O. Solovyova, LB Katsnelson, P Konovalov, O. Lookin, AS Moskvin, YuL Protsenko, N Vikulova, P Kohl, VS Markhasin // *Phil Transact R Soc Lond, Ser A (Math Phys Eng Sci.)*. – 2006. – Vol. 364(1843). – P. 1367-83.

18. Ali L.F. Push and pull of tropomyosin's opposite effects on myosin attachment to actin. A chimeric tropomyosin host-guest study / L.F. Ali, J.M. Cohen, L.S. Tobacman // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49(51). – P. 10873-10880.
19. Allen D.G. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle / D.G. Allen, S. Kurihara // *J Physiol*. – 1982. – Vol. 327. – P. 79-94.
20. Allen T.S. Ca(2+)-dependence of structural changes in troponin-C in demembranated fibers of rabbit psoas muscle / T.S. Allen, L.D. Yates, A.M. Gordon // *Biophys J*. – 1992. – Vol. 61(2). P. – 399-409.
21. Alpert N.R. in *Perspectives in cardiovascular reseach* (Alpert N.R. ed.) / N.R. Alpert, L.A. Mulieri. – New York: Raven press, 1983. – Vol. 7. – P. 619-630.
22. Alpert N.R. Myocardial chemo-energy transduction / N.R. Alpert, L.A. Mulieri, G. Hasenfuss // *The heart and cardiovascular system*. – 2nd ed. – New York: Raven Press. 1991. – P. 111-128.
23. Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts / R.Z. Litten, B.J. Martin, R.B. Low, N.R. Alpert // *Circ Res*. – 1982. – Vol. 50(6). – P. 856-864.
24. Altringham J.D. The pCa-tension and force-velocity characteristics of skinned fibres isolated from fish fast and slow muscles / J.D. Altringham, I.A. Johnston // *J Physiol*. – 1982. – Vol. 333. – P. 421-449.
25. An Atomic Model of the Thin Filament in the Relaxed and Ca²⁺ -Activated States / A. Pirani, M. V. Vinogradova, P. M. G. Curmi, W. A. King, R.J. Fletterick, R. Craig, L. S. Tobacman, C. Xu, V. Hatch and W. Lehman // *J Mol Biol*. – 2006. – Vol. 357. – P. 707-717.
26. Analysis of force-velocity relationship in cardiac muscle by means of mathematical modeling / L.B. Katsnelson, V.S. Markhasin, L.V. Nikitina, M.V. Ryvkin // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1997. – V.18, – P. 228.

27. Analysis of Myosin Heavy Chain Functionality in the Heart / M. Krenz, A. Sanbe, F. Bouyer-Dalloz, J. Gulick, R. Klevitsky, T. E. Hewett, H. E. Osinska, J. N. Lorenz, C. Brosseau, Federico, N. R. Alpert, D. M. Warshaw, M. B. Perryman, S. M. Helmke, J. Robbins // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 17466-17474.
28. Antzelevitch, C. Electrical heterogeneity within the ventricular wall / C. Antzelevitch, Fish // *Basic Res. Cardiol.* – 2001. – Vol. 96(6). – P. 517–527.
29. Ashkin A. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria / A. Ashkin, J.M. Dziedzic // *Science.* – 1987. – Vol. 235. – P. 1517-1520.
30. Assessment of the effect of cardiac myosin binding protein-C on «pCa-velocity» relationship obtained in an in vitro motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, B.Y. Bershitsky, L.V. Nikitina // *J Gen Phys.* – 2009. – Vol. 134 – 1a-2a.
31. Awan M.Z. Energetics of the development and maintenance of isometric tension by mammalian fast and slow muscles / M.Z. Awan, G.J. Goldspink // *Mechanochem Cell Motil.* – 1972. – Vol. 1. – P. 97-108.
32. Banerjee S.K. Actin-activated adenosine triphosphatase activity of native and N-ethylmaleimide-modified cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits / S.K Banerjee, E. Morkin // *Circ Res.* – 1977. –Vol. 41. – P. 630-634. 26.
33. Banerjee S.K. Enzymatic properties of the heavy meromyosin subfragment of cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbits / S.K. Banerjee, E.G. Kabbas, E. Morkin // *J Biol Chem.* – 1977. – Vol. 252(19). – P. 6925-6929.
34. Barany M: ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening / M Barany // *J Gen Physiol.* – 1967. – Vol. 50. – P. 197.
35. Barefield D. Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease / D. Barefield, S. Sadayappan // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010. – Vol.48. – P. 866 – 875.

36. Beta-tropomyosin overexpression induces severe cardiac abnormalities / M. Muthuchamy, G.P. Boivin, I.L. Grupp, D.F. Wieczorek // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1998. – Vol. 30. – P. 1545–1557.
37. Bing W. A simple method for measuring the relative force exerted by myosin on actin filaments in the in vitro motility assay: evidence that tropomyosin and troponin increase force in single thin filaments / W. Bing, A. Knott, S. Marston // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 350. – P. 693-699.
38. Bottinelli R Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle / R. Bottinelli, S. Schiaffino, C. Reggiani // *J Physiol.* – 1991. – Vol. 437. – P. 655-672.
39. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 7(72). – P. 248-254.
40. Brandt P.W. The thin filament of vertebrate skeletal muscle co-operatively activates as a unit / P.W. Brandt, M.S. Diamond, F.H. Schachat // *J Mol Biol.* – 1984. – 180(2). – P. 379-384.
41. Bremel R.D. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle / R.D. Bremel, A. Weber // *Nat New Biol.* – 1972. – Vol. 238(82). – P. 97-101.
42. Bryant S.M. Regional differences in electrical and mechanical properties of myocytes from guinea-pig hearts with mild left ventricular hypertrophy / S.M. Bryant, S.J. Shipsey, G. Hart // *Cardiovasc. Res.* – 1997. – Vol. 35 – P. 315–323.
43. Butters C.A. Cooperative effect of calcium binding to adjacent troponin molecules on the thin filament-myosin subfragment 1 MgATPase rate / C.A. Butters, J.B. Tobacman, L.S. Tobacman // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272(20). – P. 13196-13202.
44. Ca²⁺-regulated structural changes in troponin / M.V. Vinogradova, D.B. Stone, G.G. Malanina, C. Karatzaferi, R. Cooke, R. A. Mendelson,

- R.J. Fletterick // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – Vol. 102. – P. 5038-5043.
45. Ca²⁺ regulation of rabbit skeletal muscle thin filament sliding: role of cross-bridge number / B. Liang, Y. Chen, C.K Wang., Z. Luo., M. Regnier, A.M. Gordon, P.B. Chase // Biophys J. – 2003. – Vol. 85. – P. 1775-1786.
 46. Calcium regulation of skeletal muscle thin filament motility in vitro / A.M. Gordon, M.A. LaMadrid, Y. Chen, Z. Luo, P.B.Chase // Biophys J. – 1997. – Vol. 72, 3. – P. 1295-1307.
 47. Calcium regulation of thin filament movement in an in vitro motility assay / E. Homsher, B. Kim, A. Bobkova, L.S. Tobacman // Biophys J. – 1996. – Vol. 70, 4. – P. 1881-1892.
 48. Calcium-activated muscle from hypertrophied rabbit hearts. Mechanical and correlated biochemical changes / D. Maughan, E. Low, R. Litten, J. Brayden, N. Alpert // Circ Res. – 1979. –Vol. 44. – P. 279-287. 29
 49. Cantino M.E. Subsarcomeric distribution of calcium in demembranated fibers of rabbit psoas muscle / M.E. Cantino, T.S. Allen, A.M. Gordon // Biophys J. – 1993. – Vol. 64(1). – P. 211-222.
 50. Cardiac myosin binding protein c phosphorylation is cardioprotective / S. Sadayappan, H. Osinska, R. Klevitsky, J. N. Lorenz, M. Sargent, J.D. Molkenin, C.E. Seidman, J.G. Seidman, and J. Robbins // PNAS. - 2006. - Vol. 103. – P. - 16918 –16923.
 51. Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction / S. Govindan , A. McElligott S. Muthusamy, N. Nair, D. Barefield, J.L. Martin, E. Gongora, K.D. Greis, P.K. Luther, S. Winegrad, K.K. Henderson, S.J Sadayappan // Mol Cell Cardiol. – 2012. – Vol. 52(1). – P. 154-64.
 52. Cardiac myosin binding protein-C modulates actomyosin binding and kinetics in the in vitro motility assay / W. Saber, K.J. Begin, D.M. Warshaw, P. VanBuren // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2008. – Vol. 44. – P. 1053-1061.

53. Cardiac Myosin Binding Protein-C Phosphorylation in a β -Myosin Heavy Chain Background / S. Sadayappan, J. Gulick, R. Klevitsky, J.N. Lorenz, M. Sargent, J.D. Molkenin, J. Robbins // *Circulation*. – 2009. – Vol. 119. – P. 1253-1262.
54. Cardiac myosin missense mutations cause dilated cardiomyopathy in mouse models and depress molecular motor function / J.P. Schmitt, E.P. Debold, F. Ahmad, A. Armstrong, A. Frederico, D.A. Conner, U. Mende, M. J. Lohse, D. Warshaw, C. E. Seidman, J. G. Seidman // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 14525-14530.
55. Cardiac myosin-binding protein C decorates F-actin: implications for cardiac function / A.E. Whitten, C.M. Jeffries, S.P. Harris, J. Trehwella // *PNAS*. – 2008. - Vol. 105. – P. 18360–18365.
56. Cardiac myosin binding protein-c unique single molecule binding to actin and phosphorylationdependent inhibition of actomyosin motility requires 17 amino acids of the motif domain / A.Weith, S. Sadayappan, J. Gulick, M.J. Previs, P.VanBuren, J. Robbins, D.M. Warshaw // *J Mol Cell Cardiol*. – 2012. - Vol. 52(1). – P. 219–227.
57. Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes / L. Pohlmann, I. Kroger, N. Vignier, S. Schlossarek, E. Kramer, C. Coirault, K.R. Sultan, A. El-Armouche, S. Winegrad, T. Eschenhagen, L. Carrier // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101 – P. 928-938.
58. Cardiac myosin-binding protein C modulates the tuning of the molecular motor in the heart / Y.Lecarpentier, N. Vignier, P. Oliviero, A. Guellich, L. Carrier, C. Coirault // *J. Biophys*, 2008. – Vol. 77. – P. 720-728.
59. Cardiac troponin T isoforms demonstrate similar effects on mechanical performance in a regulated contractile system / P. VanBuren, S.L. Alix, J.A. Gorga, K.J. Begin, M.M. LeWinter, N.R. Alpert // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2002. – Vol. 282(5). – P. 1665-1671.

60. Cardiac V1 and V3 myosins differ in their hydrolytic and mechanical activities in vitro / P. VanBuren, D.E. Harris, R.A. Norman, D.M. Warshaw // *Circ Res.* – 1995. – Vol. 77. – P. 439-444.
61. Carnes C. A. Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats / C.A. Carnes, T.P. Geisbuhler, P.J. Reiser // *J Appl Physiol.* – 2004. – Vol. 97. – P. 446-453.
62. Cazorla O. Length-tension relationships of sub-epicardial and sub-endocardial single ventricular myocytes from rat and ferret hearts / O. Cazorla, J.Y. Le Guennec, E. White // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2000. – Vol. 32(5) – P. 735–744
63. Chandy I.K. Differential mobility of skeletal and cardiac tropomyosin on the surface of F-actin / I.K.Chandy, J.C. Lo, R.D. Ludescher // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 9286–9294.
64. Comparison of myosin heavy chains in atria and ventricles from hyperthyroid, hypothyroid, and euthyroid rabbits / R.A. Chizzonite, A.W. Everett, G. Prior R. Zak // *J Biol Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 15564-15571.
65. Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation / S. Sugiura, N. Kobayakawa, H. Fujita, H. Yamashita, S. Momomura, S. Chaen, M. Omata, H. Sugi // *Circ Res.* – 1998. – Vol. 82. – P. 1029-1034
66. Cooke R. The effects of ADP and phosphate on the contraction of muscle fibers / R. Cooke, E. Pate // *Biophys J.* – 1985. – Vol. 48(5). – P. 789-798.
67. Cooperative binding to the Ca²⁺-specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin / Z. Grabarek, J. Grabarek, P.C. Leavis, J. Gergely // *J Biol Chem.* – 1983. – Vol. 258, №23. – P. 14098-14102.
68. Cooperative effects due to calcium binding by troponin and their consequences for contraction and relaxation of cardiac muscle under various

- conditions of mechanical loading / V. Izakov, L.B. Katsnelson, F.A. Blyakhman, V.S. Markhasin, T.F. Shklyar // *Circ Res.* – 1991. – Vol. 69, №5. – P. 1171-1184.
69. Cooperative interactions between troponin-tropomyosin units extend the length of the thin filament in skeletal muscle / P.W. Brandt, M.S. Diamond, J.S. Rutchik, F.H. Schachat // *J Mol Biol.* – 1987. – Vol. 195(4). – P. 885-896.
70. Coronary perfusion and muscle lengthening increase cardiac contraction: different stretch-triggered mechanisms / R.R.Lamberts, M.H.P. van Rijen, P. Sipkema, P. Fransen, S.U. Sys, N. Westerhof // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. H1515–H1522.
71. Cross-bridge versus thin filament contributions to the level and rate of force development in cardiac muscle / M. Regnier, H. Martin, R.J. Barsotti, A.J. Rivera, D.A. Martyn, E. Clemmens // *Biophys J.* – 2004. – Vol. 87(3). – P. 1815-1824.
72. Danzi S. Posttranscriptional regulation of myosin heavy chain expression in the heart by triiodothyronine / S. Danzi and I. Klein // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 455-460.
73. De Clerck N.M. Force velocity relations of single cardiac muscle cells: calcium dependency / N.M. De Clerck, V.A. Claes, D.L. Brutsaert // *J Gen Physiol.* – 1977. – Vol. 69(2). – P. 221-241.
74. De Tombe P.P. Cardiac myofilaments: mechanics and regulation / P.P De Tombe. // *J Biomechanics.* – 2003. – Vol. 36. – P. 721–730.
75. Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats / K.M. Choi, Y. Zhong, B.D. Hoit, I.L. Grupp, H. Hahn, K.W. Dilly, S. Guatimosim, W.J. Lederer, and M.A. Matlib // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2002. – Vol. 283. – P. 1398-1408.
76. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart / S. Siedner, M. Kruger, M. Schroeter, D. Metzler, W. Roell, B.K. Fleischmann,

- J. Hescheler, G. Pfitzer, R. Stehle // *J Physiol.* – 2003. – Vol. 548. – P. 493-505.
77. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation / R.J. Clark, P.M. McDonough, E. Swanson, S.U. Trost, M. Suzuki, M. Fukuda, W.H. Dillmann // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 44230-44237.
78. Different positions of tropomyosin isoforms on actin filament are determined by specific sequences of end-to-end overlaps / M. Sliwinska, M. Zukowska, D. Borys, J. Moraczewska // *Cytoskeleton (Hoboken)* . – 2011. – Vol. 68. – P. 300–312.
79. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes / A.J. Natali, L.A. Wilson, M. Peckham, D.L. Turner, S.M. Harrison, E. White // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 541. – P. 863–875.
80. Differential cross-bridge kinetics of FHC myosin mutations R403Q and R453C in heterozygous mouse myocardium / B.M. Palmer, D.E. Fishbaugher, J.P. Schmitt, Y. Wang, N.R. Alpert, C.E. Seidman, J.G. Seidman, P. VanBuren, D.W. Maughan // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. 91-99.
81. Differential interaction of cardiac, skeletal muscle, and yeast tropomyosins with fluorescent (pyrene235) yeast actin / W. Chen, K.K. Wen, A.E. Sens, P.A. Rubenstein // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – P. 1308–1318.
82. Dilated cardiomyopathy mutant tropomyosin mice develop cardiac dysfunction with significantly decreased fractional shortening and myofilament calcium sensitivity / S. Rajan, R.P. Ahmed, G. Jagatheesan, N. Petrashevskaya, G.P. Boivin, D. Urboniene, G.M. Arteaga, B.M. Wolska, R.J. Solaro, S.B. Liggett, D.F. Wieczorek // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101. – P. 205–214.
83. Dillman W.H. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling rat / W.H. Dillman // *Heart Fail Rev.* – 2010. – Vol. 15. – P. 125-132.

84. Dillman W.H. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat / W.H. Dillman // *Diabetes*. – 1980. – Vol. 29. – P. 579-582.
85. Dissociation of force decline from calcium decline by preload in isolated rabbit myocardium / M.M. Monasky, K.D. Varian, J.P. Davis, P.M.L. Janssen // *Pflug Arch*. – 2008. – Vol. 456. – P. 267–276.
86. Distribution and Structure-Function Relationship of Myosin Heavy Chain Isoforms in the Adult Mouse Heart / M. Krenz, S. Sadayappan, H.E. Osinska, J. A. Henry, S. Beck, D.M. Warshaw, J. Robbins // *J Biol Chem*. – 2007. – Vol. 282. – P. 24057-24064.
87. Distribution of myosin isozymes within single cardiac cells. An immunohistochemical study / J.L. Samuel, L. Rappoport, J.J. Mercadier, A.M. Lompre, S. Sartore, C. Triban, S. Schiaffino, K. Schwartz // *Circ Res*. – 1983. – Vol. 52. – P. 200-209.
88. Dobesh D.P. Cooperative activation in cardiac muscle: impact of sarcomere length / D.P. Dobesh, J.P. Konhilas, P.P. de Tombe // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2002. – Vol. 282. – P. H1055–H1062.
89. Donaldson S.K. Characterization of the effects of Mg²⁺ on Ca²⁺ and Sr²⁺-activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers / S.K. Donaldson, W.G. Kerrick // *J. Gen. Physiol*. – 1975. – Vol. 66. – P. 427-444.
90. Dual role of tropomyosin on chemically modified actin filaments from skeletal muscle / H. Honda, Y. Kitano, K.Hatori, Matsuno // *FEBS Lett*. – 1996. – Vol. 383. – P. 55–58.
91. Dynamic interaction between cardiac myosin isoforms modifies velocity of actomyosin sliding in vitro / M. Sata, S. Sugiura, H. Yamashita, S. Momomura, T. Serizawa // *Circ Res*. – 1993. – Vol. 73. – P. 696-704.
92. E93K charge reversal on actin perturbs steric regulation of thin filaments / A. Cammarato, R. Craig, J.C. Sparrow, W Lehman // *J Mol Biol*. – 2005. – Vol. 47(5). – P. 89-94.

93. Edman K.A. Non-hyperbolic force-velocity relationship in single muscle fibres / K.A. Edman, L.A. Mulieri, B. Scubon-Mulieri // *Acta Physiol Scand.* – 1976. – Vol. 98(2). – P. 143-156.
94. Edman KA. The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres / K.A. Edman // *J Physiol.* – 1979. – Vol. 291. – P. 143-59.
95. Edman, K.A.P. Relationships between force and velocity of shortening in rabbit papillary muscle / K.A. Edman, E. Nilsson // *Acta Physiol. Scand.* – 1972. – Vol. 85. – P. 488-500.
96. Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca²⁺ sensitivity / P.W. Brandt, R.N. Cox, M. Kawai, T. Robinson // *J Gen Physiol.* – 1982. – Vol. 79(6). – P. 997-1016.
97. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the mechanical interaction of cardiac isomyosins V1 and V3 with actin filament in an in vitro motility assay and optical tweezers / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, S.R. Nabiev, L.V. Nikitina // *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* – 2014. – 35(1). – P. 143.
98. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an in vitro motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina, L.B. Katsnelson, S.Y. Bershitsky // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2010. – Vol. 401. – P. 159-163.
99. Effects of cardiac myosin isoform variation on myofilament function and crossbridge kinetics in transgenic rabbits / T. Suzuki, B.M. Palmer, J. James, Y. Wang, Z. Chen, P. VanBuren, D.W. Maughan, J. Robbins, M.M. LeWinter // *Circ Heart Fail.* – 2009. – Vol. 2(4). – P. 334-41.
100. Effects of mechanical interaction between two rabbit cardiac muscles connected in parallel / V.S. Markhasin, L.V. Nikitina, S.M. Routkevich, L.B. Katsnelson, B.A. Schroder, B.B. Keller // *General Physiology & Biophysics* – 2002. – Vol. 21. – P. 277-301.

101. Effects of myosin heavy chain isoform switching on Ca²⁺-activated tension development in single adult cardiac myocytes / J.M. Metzger, P.A. Wahr, D.E. Michele, F. Albayya, M.V. Westfall // *Circ Res.* – 1999. – Vol. 11. – P. 1310-1317.
102. Effects of the N-terminal domains of myosin binding protein-C in an in vitro motility assay: evidence for long-lived cross-bridges / M.V. Razumova, J.F. Shaffer, A.Y. Tu, G.V. Flint, M. Regnier, S.P. Harris // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol.281. – P. 35846-35854.
103. Effects of tropomyosin internal deletions on thin filament function / C. Landis, N. Back, E. Homsher, L.S. Tobacman // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol.274. – P. 31279–31285
104. Eichhorn E.J. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure / E.J. Eichhorn, M.R. Bristow // *Circulation.* – 1996. – Vol. 94(9). – P. 2285-2296.
105. Eisenberg B.R. Transmural distribution of isomyosin in rabbit ventricle during maturation examined by immunofluorescence and staining for calcium-activated adenosine triphosphatase / B.R. Eisenberg, J.A. Edwards, R. Zak // *Circ Res.* – 1985. – Vol. 56(4). – P. 548-555.
106. Eisenberg E. A cross-bridge model of muscle contraction / E. Eisenberg, T.L. Hill // *Prog Biophys Mol Biol.* – 1978. – Vol. 33(1). – P.55-82.
107. Eisenberg E. The adenosine triphosphatase activity of acto-heavy meromyosin. A kinetic analysis of actin activation / E. Eisenberg, C. Moos // *Biochemistry.* – 1968. – Vol. 7(4). – P.1486-1489.
108. Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium. Comparison with animal species / G. Hasenfuss, L.A. Mulieri, E.M. Blanchard, C. Holubarsch, B.J. Leavitt, F. Ittleman, N.R. Alpert // *Circ. Res.* – 1991. – Vol. 68. – P. 836-846.
109. EUROGENE Heart Failure Project. Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications

- for amolecular diagnosis strategy / P. Richard, P. Charron, L. Carrier, C. Ledeuil, T. Cheav, C. Pichereau, A. Benaiche, R. Isnard, O. Dubourg, M. Burban, J.P. Gueffet, A. Millaire, M. Desnos, K. Schwartz, B. Hainque, M. Komajda // *Circulation*. – 2003. – Vol.107. – P. 2227-2232.
110. Expression of the beta (slow)-isoform of MHC in the adult mouse heart causes dominant-negative functional effects / J.C. Tardiff, T.E. Hewett, S.M. Factor, K.L. Vikstrom, J. Robbins, L.A. Leinwand // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2000. – Vol. 278(2). – P. 412-419.
111. Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole / D.D. Streeter, H.M. Spotnitz, D.P. Patel, J. Ross, E.H. Sonnenblick // *Circ Res*. – 1969. – Vol. 24(3). – P. 339-347.
112. Finer J.T. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps / J.T. Finer, R.M. Simmons, J.A. Spudich // *Nature*. – 1994. – Vol. 368. – P. 113-118.
113. Fitzsimons D.P. Role of myosin heavy chain composition in kinetics of force development and relaxation in rat myocardium / D.P. Fitzsimons, J. R. Patel, R. L. Moss // *J Physiol*. – 1998. – Vol.513. - P. 171-183.
114. Fitzsimons, D.P. Aging dependent depression in the kinetics of force development in rat skinned myocardium / D.P. Fitzsimons, J.R. Patel, R.L. Moss // *Am. J. Physiol*. – 1999. – Vol. 276. – P. 1511-1519.
115. Fluorescence depolarization of actin filaments in reconstructed myofibers: the effect of S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin / Y.S. Borovikov, I.V. Dedova, C.G. dos Remedios, N.N. Vikhoreva, P.G. Vikhorev, S.V. Avrova, T.L. Hazlett, B.W. Van Der Meer // *Biophys. J*. – 2004. – Vol. 86. – P. 3020–3029.
116. Fluorescence probing of yeast actin subdomain 3/4 hydrophobic loop 262-274. Actin-actin and actin-myosin interactions in actin filaments. / L. Feng, E. Kim, W.L. Lee, C.J. Miller, B. Kuang, E. Reisler, P.A. Rubenstein. // *J Biol Chem*. – 1997. – Vol. 272(27). – P. 16829-16837.

117. Force regulation by Ca^{2+} in skinned single cardiac myocytes of frog / P.W. Brandt, F. Colomo, N. Piroddi, C. Poggesi, C. Tesi // *Biophys J.* – 1998. – Vol. 74(4). – P. 1994-2004.
118. Force-velocity relations of rat cardiac myosin isozymes sliding on algal cell actin cables in vitro / S. Sugiura, H. Yamashita, M. Sata, S. Momomura, T. Serizawa, K. Oiwa, S. Chaen, T. Shimmen, H. Sugi // *Biochim Biophys Acta.* – 1995. – Vol. 1231(1). – P. 69-75.
119. Foth B.J. New insights into myosin evolution and classification / B.J. Foth, M.C. Goedecke, D. Soldati // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol. 103(10). – P. 3681-3686.
120. Fraser I.D. In vitro motility analysis of actin-tropomyosin regulation by troponin and calcium / I.D. Fraser, S.B. Marston // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 7836-7841.
121. Fuchs F. D. Length-dependent Ca^{2+} activation in cardiac muscle: some remaining questions / F. Fuchs, D. Martyn // *J of Mus Res and Cell Motil.* – 2005. – Vol. 26(4-5). – P. 199-212.
122. Fuchs F. Force, length, and Ca^{2+} -troponin C affinity in skeletal muscle / F. Fuchs, Y.P. Wang // *Am J Physiol.* – 1991. – Vol. 261(5 Pt 1). – P. 787-792.
123. Fuchs F. Sarcomere length versus interfilament spacing as determinants of cardiac myofilament Ca^{2+} sensitivity and Ca^{2+} binding / F. Fuchs, Y.P. Wang // *J of Mol and Cell Cardiology.* – 1996. – Vol. 28. – 1375–1383.
124. Fuchs F. The binding of calcium to glycerinated muscle fibers in rigor. The effect of filament overlap / F. Fuchs // *Biochim Biophys Acta*, 1977. – Vol. 491(2). – P. 523-531.
125. Funatsu T. Structural and functional reconstitution of thin filaments in skeletal muscle / T. Funatsu, T. Anazawa, S. Ishiwata // *J Muscle Research and Cell Motility.* – 1994. – Vol.15. – P. 158-171.
126. Functional analysis of a unique troponin c mutation, GLY159ASP, that causes familial dilated cardiomyopathy, studied in explanted heart muscle /

- E.C. Dyer, A.M. Jacques, A.C. Hoskins, D.G. Ward, C.E. Gallon, A.E. Messer, J.P. Kaski, M. Burch, J.C. Kentish, S.B. Marston // *Circ Heart Fail.* – 2009. – Vol. 2(5). – P. 456-64.
127. Functional differences between the N-terminal domains of mouse and human myosin binding protein-C / J.F. Shaffer, P. Wong, K.L. Bezold, S.P. Harris // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. – Vol.5. – P. 789–798.
128. Functional effects of a tropomyosin mutation linked to FHC contribute to maladaptation during acidosis / K.A. Sheehan, G.M. Arteaga, A.C. Hinken, F.A. Dias, C. Ribeiro, D.F. Wieczorek, R.J. Solaro, B.M. Wolska // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2011. – Vol. 50. – P. 442–450.
129. Functional, structural, and dynamic basis of electrical heterogeneity in healthy and diseased cardiac muscle: implications for arrhythmogenesis and anti-arrhythmic drug therapy / R. Wolk, S.M. Cobbe, M.N. Hicks, K.A. Kane // *Pharmacol. Ther.* – 1999. – Vol. 84(2). – P. 207–231.
130. Geeves M.A. Structural mechanism of muscle contraction / M.A. Geeves and K.C. Holmes // *Annu. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68. – P. 687–728.
131. Gibson L.M. Contractile activation properties of ventricular myocardium from hypothyroid, euthyroid and juvenile rats / L.M. Gibson, I.R. Wendt, D.G. Stephenson // *Pflugers Arch.* – 1992. – Vol. 422(1). – P. 16-23.
132. Giulian G.G. Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels / G.G. Giulian, R.L. Moss, M. Greaser // *Anal Biochem.* – 1983. – Vol. 129, № 2. – P. 277-287.
133. Godt R.E. Influence of osmotic compression on calcium activation and tension in skinned muscle fibers of the rabbit / R.E. Godt, W.M. Maughan // *Pflug Arch.* – 1995. – Vol. 391. – P. 334-337.
134. Gordon A.M. Regulation of contraction in striated muscle / A.M. Gordon, E. Homsher, M. Regnier // *Physiol Rev.* – 2000. – Vol. 80. – P. 853-924.

135. Gordon A.M. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls" / A.M. Gordon, M. Regnier, E. Homsher // *News Physiol Sci.* – 2001. – Vol. 16. – P. 49-55.
136. Gordon A.M. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres / A.M. Gordon, A.F. Huxley, F.J. Julian // *J Physiol.* – 1966. – Vol. 184(1). – P. 170-192.
137. Gorga J.A. Activation of the calcium-regulated thin filament by myosin strong binding // J.A. Gorga, D.E. Fishbaugher, P. VanBuren // *Biophys J.* – 2003. – Vol. 85(4). – P. 2484-2491.
138. Greenberg M.J. The molecular basis of frictional loads in the in vitro motility assay with applications to the study of the loaded mechanochemistry of molecular motors / M.J. Greenberg, J.R. Moore // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2010. – Vol. 67(5). – P. 273-285.
139. Gruen M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C / M. Gruen, M. Gautel // *J. Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 286. – P. 933-949.
140. Güth K. Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca²⁺ affinity of the Ca²⁺-specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers / K. Güth, J.D. Potter // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol. 262(28). – P. 13627-13635.
141. Haeberle J.R. Are actin filaments moving under unloaded conditions in the in vitro motility assay? / J.R. Haeberle, M.E. Hemric // *Biophys J.* – 1995. – Vol. 68(4 Suppl). – P. 306-310.
142. Harris D.E. Smooth and skeletal muscle myosin both exhibit low duty cycles at zero load in vitro / D.E. Harris, D.M. Warshaw // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268(20). – P. 14764-14768.
143. Hartzell H.C. Effects of Phosphorylated and Unphosphorylated C-protein on Cardiac Actomyosin ATPase / H.C. Hartzell // *J. Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 186. – P. 185-95.

144. Hartzell H.C. Phosphorylation of purified cardiac muscle Cprotein by purified cAMP-dependent and endogenous Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinases / H.C. Hartzell, D.B. Glass // *J. Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 15587–15596.
145. Hennekes R. Why does the cardiac force-velocity relationship not follow a Hill hyperbola? Possible implications of feedback loops involved in cardiac excitation-contraction coupling / R. Hennekes, R. Kaufmann, R. Steiner // *Basic Res Cardiol.* – 1978. – Vol. 73(1). – P. 47-67.
146. Herron T.J. Loaded shortening and power output in cardiac myocytes are dependent on myosin heavy chain isoform expression / T.J. Herron, F.S. Korte, K.S. McDonald // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2001. – Vol. 281(3). – P. 1217-1222.
147. Herron T.J. Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments / T.J. Herron, K.S. McDonald // *Circ Res.* – 2002. – Vol. 90(11). – P. 1150-1152.
148. Heterogeneity of myosin isozyme content of rabbit heart / R.Z. Litten, B.J. Martin, R.H. Buchthal, R. Nagai, R.B. Low, N.R. Alpert // *Circ Res.* – 1985. – Vol. 57. – P. 406-414.
149. Hill A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle / A.V. Hill // *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* – 1938. – V. 126. – P. 136-195.
150. Hofmann P.A. Alterations in Ca²⁺ sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers / P.A. Hofmann, H.C Hartzell, R.L Moss // *J. Gen. Physiol.* – 1991. – Vol. 97. – P. 1141-1163.
151. Hofmann P.A. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C / P.A. Hofmann, F. Fuchs // *Am J Physiol.* – 1987. – Vol. 253(4 Pt 1). – P. 541-546.
152. Hoh J.F.Y. Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effect of hypophysectomy and thyroxine replacement / J.F.Y. Hoh,

- P.A. McGrath, P. Hale // *J of Mol and Cell Cardiol.* – 1977. – Vol. 10. – P. 1053-1076.
153. Homsher E. Factors affecting movement of F-actin filaments propelled by skeletal muscle heavy meromyosin / E. Homsher, F. Wang, J.R. Sellers // *Am J Physiol.* – 1992. – Vol. 262. – P. 714-723.
154. Honda H. Calcium-triggered movement of regulated actin in vitro. A fluorescence microscopy study / H. Honda, S. Asakura // *J Mol Biol.* – 1989. – Vol. 205(4). – P. 677-683.
155. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles / P.J. Reiser, M.A. Portman, X.H. Ning, C. Schomisch Moravec // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2001. – Vol. 280(4). – P. 1814-1820.
156. Huxley A.F. Muscle structure and theories of contraction / A.F. Huxley // *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry.* – 1957. – Vol. 7. – P. 255-318.
157. Huxley A.F. Proposed mechanism of force generation in striated muscle / A.F. Huxley, R.M. Simmons // *Nature.* – 1971. – Vol. 233(5321). – P. 533-538.
158. Hypercontractile properties of cardiac muscle fibers in a knock-in mouse model of cardiac myosin-binding protein-C / C.C. Witt, B. Gerull, M.J. Davies, T. Centner, W.A. Linke, L. Thierfelder // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 5353-5359.
159. Hypertrophic cardiomyopathy in cardiac myosin binding protein-C knockout mice / S.P. Harris, C.R. Bartley, T.A. Hacker, K.S. McDonald, P.S. Douglas, M.L. Greaser, P.A. Powers, R.L. Moss // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 594-601.
160. Impact of beta-myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics / V.L. Rundell, V. Manaves, A.F. Martin, P.P. de Tombe // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – Vol. 288(2). – P. 896-903.

161. Influence of viscosity on myocardium mechanical activity: A mathematical model / L.B. Katsnelson, L.V. Nikitina, D. Chemla, O.E. Solovyova, C. Coirault, Y. Lecarpentier, V.S. Markhasin // *Journal of Theoretical Biology*. – 2004 – Vol. 230(3). – P 385-405.
162. Investigation of a transgenic mouse model of familial dilated cardiomyopathy / W. Song, E. Dyer, D. Stuckey, M.C. Leung, M. Memo, C. Mansfield, M. Ferenczi, K. Liu, C. Redwood, K. Nowak, S. Harding, K. Clarke, D. Wells, S. Marston // *J Mol Cell Cardiol*. – 2010. – Vol. 49(3). – P. 380-389.
163. Ishikava T. Modulation of Ca^{2+} transient decay by tension and Ca^{2+} removal in hyperthyroid myocardium / T. Ishikava, H. Kajiwara, S. Kurihara // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 1999. – Vol. 276. – P. H289-H299.
164. Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mouse, guinea pig, and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level / Stehle, M. Kruger, P. Scherer, K. Brixius, R.H. Schwinger, G. Pfitzer // *Basic Res. Cardiol*. – 2002. – Vol. 97, Suppl. 1. – P. 127-135.
165. Izumo S. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload / S. Izumo, B. Nadal-Ginard, V. Mahdavi // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1988. – Vol. 85. – P. 339–343.
166. Janson L.W. Actin-binding proteins regulate the work performed by myosin II motors on single actin filament / L.W. Janson, J.R. Sellers, D.L. Taylor // *Cell Motil Cytoskel*. – 1992. – Vol. 22. – P. 274-280.
167. Josephson R.K. Contraction dynamics and power output of skeletal muscle / R.K. Josephson // *Annu Rev Physiol*. – 1993. – Vol. 55. – P. 527-546.
168. Julian F.J. The effect of calcium on the force-velocity relation of briefly glycerinated frog muscle fibres / F.J. Julian // *J Physiol*. – 1971. – Vol. 218(1). – P. 117-145.
169. Katz A.M. Homogeneity out of heterogeneity / A.M. Katz, P.B. Katz // *Circulation*. – 1989. – Vol. 79 (3). – P. 712–717.

170. Katz A.M. Molecular biology in cardiology, a paradigmatic shift / A.M.Katz // *J Mol Cell Cardiol.* – 1988. – Vol. 20(4). – P. 355-66.
171. Katz A.M. Physiology of the heart / A.M. Katz. – Lippincott: Williams & Wilkins, 2001. – 718 p.
172. Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms / K.A. Palmiter, M.J. Tyska, D.E. Dupius, N.R. Alpert, D.M. Warshaw // *J Physiol.* – 1999. – Vol. 519. – P. 669-678.
173. Kinetics of Cardiac Thin-Filament Activation Probed by Fluorescence Polarization of Rhodamine-Labeled Troponin C in Skinned Guinea Pig Trabeculae / M.G. Bell, E.B. Lankford, G.E. Gonye, G.C.R. Ellis-Davies, D.A. Martyn, M. Regnier, and R.J. Barsotti // *J Biophysic.* – 2006. – Vol. 90. – P. 531-543.
174. Kishino A. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles / A. Kishino, T.Yanagida // *Nature.* – 1998. – Vol. 334. – P. 74-76.
175. Kodama T. The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate / T. Kodama, K. Fukui, K. Kometani // *J Biochem (Tokyo).* – 1986. – Vol. 99, № 5. – P. 1465-1472.
176. Konhilas J.P. Length-dependent activation in three striated muscle types of the rat / J.P. Konhilas, T.C. Irving, P.P. de Tombe // *J Physiol.* – 2002. – Vol. 544(1). – P. 225–236.
177. Konhilas J.P. Myofilament calcium sensitivity in skinned rat cardiac trabeculae Role of interfilament spacing / J.P. Konhilas, T.C. Irving, P.P. de Tombe // *Circ Res.* – 2002. – Vol. 90. – P. 59-65.
178. Kron S.J. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface / S.J. Kron, J.A. Spudich // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 6272-6276.

179. Krueger J.W. Myocardial sarcomere dynamics during isometric contraction / J.W. Krueger, G.H. Pollack // *J Physiol.* – 1975. – Vol. 251(3). – P.627-643.
180. Lab M.J. Contraction-excitation feedback in myocardium. Physiological basis and clinical relevance / M.J. Lab // *Circ Res.* – 1982. – Vol. 50. – P. 757-766.
181. Lab M.J. The effects of shortening on myoplasmic calcium concentration and on the action potential in mammalian ventricular muscle / M.J. Lab, D.G. Allen, C. Orchard // *Circ Res.* – 1984. – Vol. 55. – P. 825-829.
182. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680-685.
183. Lännergren J. The force-velocity relation of isolated twitch and slow muscle fibres of *Xenopus laevis* / J. Lännergren // *J Physiol.* – 1978. – Vol. 283. – P. 501-521.
184. Left ventricular structure and function: basic science for cardiac imaging / P.P. Sengupta, J. Korinek, M. Belohlavek, J. Narula, M.A. Vannan, A. Jahangir, B.K. Khandheria // *J Am Coll Cardiol.* – 2006. – Vol. 48(10). – P. 1988-2001.
185. Lehrer S.S. Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase / S.S. Lehrer, E.P. Morris // *J Biol Chem.* – 1982. – Vol. 257(14). – P. 8073-8080.
186. Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice / O. Cazorla, S. Szilagyi, N. Vignier, G. Salazar, E. Kramer, G. Vassort, L. Carrier, A. Lacampagne // *Cardiovasc. Res.* – 2006. – Vol.69. – P. 370-380.
187. Length dependence of calcium- and force-transients in normal and failing human myocardium / C.F. Vahl, T. Timek, A. Bonz, H. Fuchs, R. Dillman, S. Hagl // *J Mol Cell .* – 998. – Vol. 30. – P. 957–966.
188. Lew W.Y.W. Functional consequences of regional heterogeneity in the left ventricle. In: *Theory of Heart: Biomechanics, Biophysics and Nonlinear*

- Dynamics of Cardiac Function. New York: Springer-Verlag, 1991 - P. H209–H237.
189. Loaded shortening, power output, and rate of force redevelopment are increased with knockout of cardiac myosin binding protein-C / F.S. Korte, K.S. McDonald, S.P. Harris, R.L. Moss // *Circ.Res.* – 2003. – Vol. 93. – P. 752-758.
190. Lu X. Temperature-dependence of isometric tension and cross-bridge kinetics of cardiac muscle fibers reconstituted with a tropomyosin internal deletion mutant / X. Lu, L.S. Tobacman, M. Kawai // *Biophys J.* – 2006. – Vol. 91(11). – P. 4230-4240.
191. Machackova J. Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes / J. Machackova, J. Barta, N.S. Dhalla // *Can j Physiol Pharmacol.* – 2005. – Vol. 83. – P. 1071-1091.
192. Malmqvist Ulf.P. Cardiac myosin isoforms from different species have unique enzymatic and mechanical properties / Ulf.P. Malmqvist, A. Aronsham, S. Lowey // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43. – P. 15058-15065.
193. Margossian S.S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle / S.S. Margossian, S. Lowey // *Methods Enzymol.* – 1982. – Vol. 85. – P. 55-71.
194. Martyn D.A. Influence of Length on Force and Activation-Dependent Changes in Troponin C Structure in Skinned Cardiac and Fast Skeletal Muscle / D.A. Martyn and A.M. Gordon // *J Biophys.* – 2001. – Vol. 80. – P. 2798–2808.
195. Mashanov G.I. Automatic detection of single fluorophores in live cells / G.I. Mashanov, J.E. Molloy // *Biophys J.* – 2007. – Vol. 92(6). – P. 2199-2211.
196. Mathematical modelling of contribution of myocardium mechanical inhomogeneity in its contractile function / V.S. Markhasin, L.B. Katsnelson,

- L.V. Nikitina, Yu.L. Protsenko // *General Physiology & Biophysics*. – 1997. – Vol. 16(2) – P. 101-137.
197. McDonald K.S. Force-velocity and power-load curves in rat skinned cardiac myocytes / K.S. McDonald, M.R. Wolff, R.L. Moss // *J Physiol*. – 1998. – Vol. 511 (Pt 2). – P. 519-531.
198. McDonald K.S. Osmotic Compression of Single Cardiac Myocytes Eliminates the Reduction in Ca^{2+} Sensitivity of Tension at Short Sarcomere Length / K.S. McDonald, R.L. Moss // *Circ Res*. – 1995. – Vol. 77. – P. 199-205.
199. McKillop, D. F. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament / D.F. McKillop, and M. A. Geeves // *J Biophys*. – 1993. – Vol. 65. – P. 693-701.
200. Mechanical inhomogeneity of myocardium studied in parallel and serial cardiac muscle duplexes: experiments and models / O. Solovyova, L. Katsnelson, S. Guryev, L. Nikitina, Yu. Protsenko, S. Routkevitch, V. Markhasin. // *Chaos, Solitons & Fractals*. – 2002. – Vol. 13(8). – P. 1685-1711.
201. Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes / C. Ruwhof, J.T. van Wamel, L.A. Noordzij, S. Aydin, J.C. Harper, A. van der Laarse // *Cell Calcium*. – 2001. – Vol. 29(2). – P. 73-83.
202. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay / Y. Harada, K. Sakurada, T. Aoki, D.D. Thomas, T. Yanagida // *J Mol Biol*. – 1990. – Vol. 216(1). – P. 49-68.
203. Mechano-electric interactions in heterogeneous myocardium: development of fundamental experimental and theoretical models / V.S. Markhasin, O. Solovyova, L.B. Katsnelson, Y. Protsenko, P. Kohl, D. Noble // *Prog Biophys Mol Biol*. – 2003. – Vol. 82, №1-3. – P. 207-220.

204. Metzger J.M. Effects of troponin C isoforms on pH sensitivity of contraction in mammalian fast and slow skeletal muscle fibres / J.M. Metzger // *J Physiol.* – 1996. – Vol. 492 (Pt 1). – P. 163-172.
205. Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart / M. Muthuchamy, I.L. Grupp, G. Grupp, B.A. O’Toole, A.B. Kier, G.P. Boivin, J. Neumann, D.F. Wieczorek // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 30593–30603.
206. Molecular mechanics of cardiac myosin-binding protein C in native thick filaments / M.J. Previs, B.S. Previs, J. Gulick, J. Robbins, D.M. Warshaw // *Science.* – 2012. – Vol. 337(6099). – P. 1215–1218
207. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms / N. R. Alpert, C. Brosseau, A. Federico, M. Krenz, J. Robbins, and D. M. Warshaw // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol.283. – P. 1446-1454.
208. Morris C.A. Modulation of thin filament activation using an inactivated cardiac troponin C in skinned skeletal muscle fibers / C.A. Morris, L.S. Tobacman, E. Homsher // *Biophys J.* – 1998. – Vol. 74. – P. 173.
209. Moss R.L. Effects of partial extraction of troponin complex upon the tension-pCa relation in rabbit skeletal muscle. Further evidence that tension development involves cooperative effects within the thin filament / R.L. Moss, J.D. Allen, M.L. Greaser // *J Gen Physiol.* – 1986. – Vol. 87(5). – P. 761-774.
210. Moss R.L. Effects on shortening velocity of rabbit skeletal muscle due to variations in the level of thin-filament activation / R.L. Moss // *J Physiol.* – 1986. – Vol. 377. – P. 487-505.
211. Moss R.L. Myosin Crossbridge activation of cardiac thin filaments: Implications for myocardial function in health and disease / R.L. Moss, M. Razumova, D.P. Fitzsimons // *Circ Res.* – 2004. – Vol. 94. – P. 1290-1300.
212. Moss R.L. The effects of partial extraction of TnC upon the tension-pCa relationship in rabbit skinned skeletal muscle fibers / R.L. Moss,

- G.G. Giulian, M.L. Greaser // *J Gen Physiol.* – 1985. – Vol. 86(4). – P. 585-600.
213. Movement and force produced by a single myosin head / J.E. Molloy, J.E. Burns, J. Kendrick-Jones, R.T. Tregear, D.C.S. White // *Nature.* – 1995. – Vol. 378. – P. 209-212.
214. MRI myocardial motion and fiber tracking: a confirmation of knowledge from different imaging modalities / G.D. Buckberg, A. Mahajan, B. Jung, M. Markl, J. Hennig, M. Ballester-Rodes // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2006. – Vol. 29 Suppl 1. – P. 165-177.
215. Myosin adenosine triphosphatase activity in the volume-overloaded hypertrophied feline right ventricle / R.A. Carey, G. Natarajan, A.A. Bove, R.L. Coulson, J.F. Spann // *Circ. Res.* – 1979. – Vol. 45(1) – P. 81–87.
216. Myosin binding surface on actin probed by hydroxyl radical footprinting and site-directed labels / Z.A. Oztug Durer, J.K. Kamal, S. Benchaar, M.R. Chance, E. Reisler // *J. Mol. Biol.* – 2011. – 414. – P. 204–216.
217. Myosin from failing and non-failing human ventricles exhibit similar contractile properties / T. Noguchi, P. Jr. Camp, S.L. Alix, J.A. Gorga, K.J. Begin, B.J. Leavitt, F.P. Ittleman, N.R. Alpert, M.M. LeWinter, P. Van'Buren // *J Mol and Cell Cardiol.* – 2003. – Vol. 35. – P. 91-97.
218. Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium / N.A. Narolska, S. Eiras, R.B. van Loon, N.M. Boontje, R.S. Zaremba, S.R. Berg, W. Stoker, M.A. Huybregts, F.C. Visser, J. van der Velden, G.J. Stienen // *J Muscle Res Cell Motil.* – 2005. – Vol. 26. – P.39-48.
219. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart / S. Miyata, W. Minobe, M.R. Bristow, L.A. Leinwand // *Circ Res.* – 2000. – Vol. 86. – P. 386-390.
220. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload / A.M. Lompre, K. Schwartz, A. d'Albis, G. Lacombe, N. van Thiem, B. Swynghedauw // *Nature.* – 1979. – Vol. 282. – P. 105–107.

221. Myosin isozymic distribution correlates with speed of myocardial contraction / K. Schwartz, Y. Lecarpentier, J.L. Martin, A.M. Lompre, J.J. Mercadier, B. Swynghedauw // *J Mol Cell Cardiol.* – 1981. – Vol. 13. – P. 1071-1075.
222. Myosin S2 is not required for effects of myosin binding protein-C on motility / J.F. Shaffer, M.V. Razumova, An-Yue Tu, M. Regnier, S.P. Harris // *FEBS Let.* – 2007. – Vol. 581. – P. 1501–1504.
223. Myosin types and fiber types in cardiac muscle. I. Ventricular myocardium / S. Sartore, L. Gorza, S. Pierobon Bormioli, L. Dalla Libera, S. Schiaffino // *J Cell Biol.* – 1981. – Vol. 88. – P. 226-233.
224. Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism / J.Y. Mun, M.J. Previs, Y. Yu. Hope, J. Gulick, L.S. Tobacman, S.B. Previs, J. Robbins, D. M. Warshaw, R. Craiga // *PNAS.* – 2014. – Vol. 111(6). – P. 2170-2175.
225. Nikitina L. Mechanical and kinetic properties of rabbit cardiac isomyosins V1 and V3 compared in an *in vitro* motility assay and optical tweezers / L. Nikitina, G. Kopylova and J.E. Molloy // *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* – 2005. – Vol. 26(1). – P. 74.
226. Noble M.I. Force-velocity relationship of cat cardiac muscle, studied by isotonic and quick-release techniques / M.I. Noble, T.E. Bowen, L.L. Hefner // *Circulat. Res.* – 1969. – Vol. 20. – P. 112-123.
227. Offer G. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification and characterization / G. Offer, C. Moos, R. Starr // *J. Mol. Biol.* – 1973. – Vol. 74. – P. 653 – 676.
228. Optimization of myocardial function / N.R. Alpert, L.A. Mulieri, G. Hasenfuss, Ch. Holubarsch // *Myocardial optimization and efficiency, evolutionary aspects and philosophy of science consideration.* – Steinkopff Verlag Darmstadt Springer-Verlag New York, 1994. – P. 30-40.

229. Pagani E.D. Rabbit papillary muscle myosin isozymes and the velocity of muscle shortening / E.D. Pagani, F.J. Julian // *Circ Res.* – 1984. – Vol. 54(5). – P. 586-594.
230. Pardee J.D. Purification of muscle actin / J.D. Pardee, J.A. Spudich // *Methods Enzymol.* – 1982. – Vol. 85. – P. 164-179. 148.
231. Perry S.V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function / S.V. Perry // *J Muscle Res Cell Motil.* – 2001. – Vol. 22. – P.45-49.
232. Podolsky R.J. The relation between calcium and contraction kinetics in skinned muscle fibres / R.J. Podolsky, L.E. Teichholz // *J Physiol.* – 1970. – Vol. 211(1). – P. 19-35.
233. Pope B. The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes / B. Pope, J.F.Y. Hoh, A. Weeds // *FEBS Lett.* – 1980. – Vol. 118. – P. 205-208.
234. Potter J.D. Preparation of troponin and its subunits / J.D. Potter // *Methods Enzymol.* – 1982. – Vol. 85. – P. 241-263.
235. Power output is linearly related to MyHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts / F.S. Korte, T.J. Herron, M.J. Rovetto, K.S. McDonald // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2005. – Vol. 289(2). – P. 801-812.
236. Previs M.J. Molecular modulation of actomyosin function by cardiac myosin-binding protein C / M.J. Previs, A.J. Michalek, D.M. Warshaw // *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* – 2014. – Vol. 466. – P. 439–444
237. Pringle J.W. The Croonian Lecture, 1977. Stretch activation of muscle: function and mechanism / J.W. Pringle // *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* – 1978. – Vol. 201(1143). – P. 107-130.
238. Purcell I.F. Functional analysis of human cardiac troponin by the in vitro motility assay: comparison of adult, foetal and failing hearts / I.F. Purcell, W. Bing, S.B. Marston // *Cardiovasc Res.* – 1999. – Vol. 43. – P. 884–891.
239. Rao V.S. Phosphorylation of tropomyosin extends cooperative binding of myosin beyond a single regulatory unit / V.S. Rao, E.N. Marongelli, W.H. Guilford // *Cell Motil Cytoskeleton.* – 2009. – Vol. 66(1). – P 10-23.

240. Razumova M.V. Different myofilament nearest-neighbor interactions have distinctive effects on contractile behavior / M.V. Razumova, A.E. Bukatina, K.B. Campbell // *Biophysical Journal*. – 2000. – Vol. 78(6). – P. 3120–3137.
241. Reducing thin filament Ca^{2+} affinity with a cTnC variant (L57Q) reduces force but enhances cross-bridge dependence of cooperative activation in demembranated rat trabeculae / C.W. Turtle, F.S. Korte, M.V. Razumova, M. Regnier // *Biophys J*. – 2011. – Vol. 100 (3). – P. 453a-453a.
242. Regulated crosslinked actin filaments and the decoupling between their ATPase activity and sliding motility / H. Honda, N. Tagami, K. Hatori, K. Matsuno // *J Biochem*. – 1997. – Vol. 121(1). – P. 47-49.
243. Regulation of force and unloaded sliding speed in single thin filaments: effects of regulatory proteins and calcium / E. Homsher, D.M. Lee, C. Morris, D. Pavlov, L.S. Tobacman // *J Physiol*. – 2000. – Vol. 524 Pt 1. – P. 233-243.
244. Rescue of tropomyosin induced familial hypertrophic cardiomyopathy mice by transgenesis / G. Jagatheesan, S. Rajan, N. Petrashevskaya, A. Schwartz, G. Boivin, G.M. Arteaga, R.J. Solaro, S.B. Liggett, D.F. Wiczorek // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2007. – Vol. 293. – P. H949–H958.
245. Role of cardiac myosin binding protein C in sustaining left ventricular systolic stiffening / B.M. Palmer, D. Georgakopoulos, P.M. Janssen, Y. Wang, N.R. Alpert, D.F. Belardi, S. P. Harris, R.L. Moss, P.G. Burgon, C.E. Seidman, J.G. Seidman, D.W. Maughan, D.A. Kass // *Circ. Res*. – 2004. – Vol. 94. – P. 1249-1255.
246. Role of myosin heavy chain composition in the stretch activation response of rat myocardium / J.E. Stelzer, S.L. Brickson, M.R. Locher, R.L. Moss // *J Physiol*. – 2007. – Vol. 15 (579). – P. 161-73.
247. Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments / S.E. Boussouf, R. Maytum, K. Jaquet, M.A. Geeves // *J. Muscle Res. Cell. Motil*. – 2007. – Vol. 28. – P. 49–58.

248. Sadayappan S Cardiac myosin binding protein-C as a central target of cardiac sarcomere signaling: a special mini review series / S. Sadayappan, P.P. de Tombe // *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* – 2014. – Vol. 466. – P. 195–200
249. Saeki Y. Crossbridge dynamics under various inotropic states in cardiac muscle: evaluation by perturbation analysis / Y. Saeki // *Jpn J Physiol.* – 1995. – Vol. 45. – P. 687-705. 32.
250. Schoenberg M. Effect of ionic strength on skinned rabbit psoas fibers in the presence of magnesium pyrophosphate / M. Schoenberg // *Biophys J.* – 1991. – Vol. 60(3). – P. 690-696.
251. Shchepkin D.V. Study of reciprocal effects of cardiac myosin and tropomyosin isoforms on actin-myosin interaction with *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2011. – V. 415. – P. 104-108.
252. Shifts in the myosin heavy chain isozymes in the mouse heart result in increased energy efficiency / K. Hoyer, M. Krenz, J. Robbins, J.S. Ingwall // *J Mol Cell Cardiol.* – 2007. – Vol. 42(1). – P. 214-221.
253. Siemankowski R.F. ADP dissociation from actomyosin subfragment 1 is sufficiently slow to limit the unloaded shortening velocity in vertebrate muscle / R.F. Siemankowski, M.O. Wiseman, H.D. White // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1985. – Vol. 82(3). – P. 658-662.
254. Single-Molecule Mechanics of R403Q Cardiac Myosin Isolated From the Mouse Model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy / M.J. Tyska, E. Hayes, M. Giewat, C.E. Seidman, J.G. Seidman, D.M. Warshaw // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 86. – P. 737-744.
255. Single-myosin crossbridge interactions with actin filaments regulated by troponin-tropomyosin / N.M. Kad, S.Kim, D.M. Warshaw, P. VanBuren, J.E.Baker // *PNAS.* – 2005. – Vol. 102, №47. – P. 16990-16995.

256. Skeletal muscle regulatory proteins enhance F-actin in vitro motility / A.M. Gordon, Y. Chen, B. Liang, M. LaMadrid, Z. Luo, P.B. Chase // *Adv Exp Med Biol.* – 1998. – Vol. 453. – P. 187-196.
257. Sliding velocity of isolated rabbit cardiac myosin correlates with isozyme distribution / H. Yamashita, S. Sugiura, T. Serizawa, T. Sugimoto, M. Iizuka, E. Katayama, T. Shimmen // *Am J Physiol.* – 1992. – Vol. 263. – P. 464-472.
258. Smillie L.B. Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins / L.B. Smillie // *Methods Enzymol.* – 1982. – Vol. 85, №2. – P. 234-241.
259. Smith S.H. Length dependence of cardiac myofilament Ca^{2+} sensitivity in the presence of substitute nucleoside triphosphates / S.H. Smith, F. Fuchs // *J Mol Cell Cardiol.* – 2002. – Vol. 34. – P. 547–554.
260. Smooth, cardiac and skeletal muscle myosin force and motion generation assessed by cross-bridge mechanical interactions in vitro / D.E. Harris, S.S. Work, R.K. Wright, N.R. Alpert, D.M. Warshaw // *J Muscle Res Cell Motil.* – 1994. – Vol. 15(1). – P. 11-19.
261. Solaro R. J. Maintaining cooperation among cardiac myofilament proteins through thick and thin / R. J. Solaro // *J Physiol.* – 2009. – Vol. 587(1). – P. 3.
262. Squire J.M. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBPC) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain / J.M. Squire, P.K. Luther, C. Knupp // *J. Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 331. – P. 713-724.
263. Steady-state force-velocity relation in the ATP-dependent sliding movement of myosin-coated beads on actin cables in vitro studied with a centrifuge microscope / K. Oiwa, S. Chaen, E. Kamitsubo, T. Shimmen, H. Sugi // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1990. – Vol. 87(20). – P. 7893-7897.
264. Stelzer J.E. Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium / J.E. Stelzer, D.P. Fitzsimons, R.L. Moss // *J. Biophys.* – 2006. – Vol. 90. – P. 4119 – 4127.

265. Stiffness of skinned rabbit psoas fibers in MgATP and MgPPi solution / B. Brenner, J.M. Chalovich, L.E. Greene, E. Eisenberg, M. Schoenberg // *Biophys J.* – 1986. – Vol. 50(4). – P. 685-691.
266. Stretch and quick release of rat cardiac trabeculae accelerates Ca^{2+} waves and triggered propagated contractions / Y. Wakayama, M. Miura, Y. Sugai, Y. Kagaya, J. Watanabe, H.E.D.J. ter Keurs, K. Shirato // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2001. – Vol. 281. – P. H2133–H2142.
267. Stretch-dependent modulation of $[\text{Na}^+]_i$, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and pH_i in rabbit myocardium — a mechanism for the slow force response / C. Luers, F. Fialka, Elgner A., D. Zhu, J. Kockskamper, D. von Lewinski, B. Pieske // *Cardiovasc Res.* – 2005. – Vol. 68. – P. 454 – 463.
268. Structural and functional reconstitution of thin filaments in the contractile apparatus of cardiac muscle / H. Fujita, K. Yasuda, S. Niitsu, T. Funatsu, and S. Ishiwata // *J Biophys.* – 1996. – Vol. 71. – P. 2307- 2318.
269. Structural studies of myosin : nucleotide complexes: A revised model for the molecular basis of muscle contraction / A.J. Fisher, C.A. Smith, J. Thoden, R. Smith, K. Sutoh, H.M. Holden, I. Rayment // *Biophys. J.* – 1995. – V. 68. – P. 19-28.
270. Sugiura S. Functional characterization of cardiac myosin isoforms / S. Sugiura H. Yamashita // *J Physiol (Japanese).* – 1998. – Vol. 48. – P. 173-179.
271. Sun Y.-B. The molecular basis of the steep force–calcium relation in heart muscle / Y.-B. Sun, M. Irving // *J Mol Cell Cardiol.* – 2010. – Vol. 48(5). – P. 859–865.
272. Sweeney H.L. Function of the N-terminus of the myosin essential light chain of vertebrate striated muscle, H.L Sweeney *Biophys. J.* 68 (1995) 112–119.
273. Systolic ventricular filling / F. Torrent-Guasp, M.J. Kocica, A. Corno, M. Komeda, J. Cox, A. Flotats, M. Ballester-Rodes, F. Carreras-Costa // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2004. – Vol. 25(3). – P. 376-386.
274. Tahiliani A.G. Diabetes-induced abnormalities in the myocardium /

- A.G. Tahiliani, J.H. McNeill // *Life Sci.* – 1986. – Vol. 38(11). –P. 959-974.
275. Ter Keurs H.E.D.G. Electromechanical coupling in the cardiac myocyte; stretch-arrhythmia feedback / H.E.D.G. Ter Keurs // *Pflug Arch.* – 2011. – Vol. 462. – P. 165–175.
276. The active state of the thin filament is destabilized by an internal deletion in tropomyosin / C.A. Landis, A. Bobkova, E. Homsher, L.S. Tobacman // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol.272. – P. 14051–14056.
277. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif / T. Okagaki, F.E. Weber, D.A. Fischman, K.T. Vaughan, T. Mikawa, F.C. Reinach // *J. Cell. Biol.* – 1993. – Vol. 123. – P. 619 - 626.
278. The myosin C-loop is an allosteric actin contact sensor in actomyosin / K.K. Ajtai, M.F. Halstead, M. Nyitrai, A.R. Penheiter, Y. Zheng, T.P. Burghardt // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48. – P. 5263–5275.
279. The Role of the N-Terminus of the Myosin Essential Light Chain in Cardiac Muscle Contraction / K. Kazmierczak, Y. Xu, M. Jones, G. Guzman, O.M. Hernandez, G.L.W. Kerrick, D. Szczesna-Cordary // *J. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 387. – P. 706 - 725.
280. The role of tropomyosin domains in cooperative activation of the actin-myosin interaction / Y. Oguchi, J. Ishizuka, Hitchcock DeGregori, S. Ishiwata, M.Kawai // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 414. – P. 667–680.
281. The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer / C. Veigel, M.L. Bartoo, D.C. White, J.C. Sparrow, J.E.Molloy // *Biophys J.* – 1998. – Vol. 75(3). – P. 1424-38.
282. The ultrastructural location of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle / P. Bennett, R. Craig, R. Starr, G. Offer // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* – 1986. – Vol. 7. – P. 550 - 567.
283. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor / I. Rayment, W.R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D.R. Tomchick,

- M.M. Benning, D.A. Winkelmann, G Wesenberg and H.M. Holden // Science. – 1993. – Vol. 261. – P. 50-58.
284. Tobacman L.S. Mechanism of regulation of cardiac actin-myosin subfragment 1 by troponin-tropomyosin / L.S. Tobacman, R.S. Adelstein // Biochemistry. – 1986. – Vol. 25(4). – P. 798-802.
285. Transmural dispersion of myofiber mechanics: implications for electrical heterogeneity in vivo / H. Ashikaga, B.A. Coppola, B. Hopenfeld, E.S. Leifer, E.R. McVeigh, J.H. Omens // J Am Coll Cardiol. – 2007. – Vol. 49(8). – P. 909-916.
286. Transmural mechanics at left ventricular epicardial pacing site / H. Ashikaga, J.H. Omens, N.B. Ingels., J.W. Covell // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2004. – Vol. 286(6). – P. 2401-2407.
287. Transmural variation in myosin heavy chain isoform expression modulates the timing of myocardial force generation in porcine left ventricle / J.E. Stelzer, H.S. Norman, P.P. Chen, J.R. Patel and R.L. Moss // J Physiol. – 2008. – Vol. 586. – P. 5203-5214.
288. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments / W. Lehman, V. Hatch, V. Korman, M. Rosol, L. Thomas, R. Maytum, M.A. Geeves, J.E. van Eyk, L.S. Tobacman, R. Craig // J Mol Biol. – 2000. – Vol. 302. – P. 593-606.
289. Tropomyosin period 3 is essential for enhancement of isometric tension in thin filament-reconstituted bovine myocardium / M. Kawai, X. Lu, S.E. Hitchcock-Degregori, K.J. Stanton, M.W. Wandling // J. Biophys. – 2009. – P. 380-967
290. Unloaded shortening increases peak of Ca^{2+} transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes / S. Yasuda, S. Sugiura, H. Yamashita, S. Nishimura, Y. Saeki, S. Momomura, K. Katoh, R. Nagai, H. Sugi // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2003. – Vol. 285. – P. H470–H475.
291. Unloaded shortening of skinned muscle fibers from rabbit activated with and without Ca^{2+} / D.A. Martyn, P.B. Chase, J.D. Hannon, L.L. Huntsman,

- M.J. Kushmerick, A.M. Gordon // *Biophys J.* – 1994. – Vol. 67(5). – P. 1984-1993.
292. Uyeda T.Q. Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin / T.Q. Uyeda, S.J. Kron, J.A. Spudich // *J Mol Biol.* – 1990. – Vol. 214(3). – P. 699-710.
293. van der Velden J. Age-dependent changes in myosin composition correlate with enhanced economy of contraction in guinea-pig hearts / J. van der Velden, A.F. Moorman, G.J. Stienen // *J Physiol.* – 1998. – Vol. 507, № 2. – P. 497-510.
294. van der Velden J. Minoxidil-induced cardiac hypertrophy in guinea pigs / J. van der Velden, P. Borgdorff, C.J.M. Stienen // *Cell Mol Life Sci.* – 1999. – Vol. 55. – P. 788-798.
295. VanBuren P. Enhanced force generation by smooth muscle myosin in vitro / P. VanBuren, S.S. Work, D.M. Warshaw // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – Vol. 91(1). – P. 202-205.
296. VanBuren P. Tropomyosin directly modulates actomyosin mechanical performance at the level of a single actin filament / P. VanBuren, K.A. Palmiter, D.M. Warshaw // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 12488–12493.
297. Wang Y. The off rate of Ca^{2+} from troponin C is regulated by force-generating cross bridges in skeletal muscle / Y. Wang, W.G.L. Kerrick // *J Appl Physiol.* – 2002. – Vol. 92. – P. 2409–2418.
298. Woledge R.C. Energetic aspects of muscle contraction / R.C. Woledge, N.A. Curtin, E. Homsher. – London: Academic Press. – 1985. – P. 8-212.
299. Woledge R.C. The energetics of tortoise muscle / R.C. Woledge // *J Physiol.* – 1968. – Vol. 197(3). – P. 685-707.
300. Yamamoto K. The binding of skeletal muscle C-protein to regulated actin / K. Yamamoto // *FEBS let.* – 1986. – Vol. 208. – P. 122 – 127.

301. Yamamoto K. The c-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles / K.Yamamoto, C. Moos // J. Biol. Chem. – 1983. – Vol. 258. – P. 8395–8401.