

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Вятчин Илья Геннадьевич

МЕХАНИЗМ Ca^{2+} -РЕГУЛЯЦИИ ТОНКИХ НИТЕЙ ЗАПИРАТЕЛЬНЫХ
МЫШЦ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ НА ПРИМЕРЕ МИДИИ
CRENOMYTILUS GRAYANUS

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Шелудько Николай Семенович

Владивосток – 2015

ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Толстые нити.....	10
1.1.1. Парамиозин.....	10
1.1.2. Миозин	12
1.1.3. Миород.....	15
1.1.4. Твитчин	19
1.2. Тонкие нити.....	22
1.2.1. Актин.....	22
1.2.2. Тропомиозин.....	23
1.2.3. Тропонин.....	27
1.2.4. Кальпонин	29
1.2.5. Устройство тонких нитей.....	32
1.3. Регуляция запираательных мышц	34
1.3.1. Актин-ассоциированная Ca^{2+} -регуляторная система	34
1.3.2. Ca^{2+} -регуляция тонких нитей и запираательный тонус	39
1.4. Возможные механизмы запираательного сокращения.....	40
1.4.1. «Мостиковая» гипотеза запираательного тонуса	41
1.4.2. «Парамиозиновая» гипотеза запираательного тонуса	42
1.4.3. «Твитчиновая» гипотеза запираательного тонуса.....	43
1.4.4. «Миородовая» гипотеза запираательного тонуса	45
1.4.5. «Кальпониновая» гипотеза запираательного тонуса.....	45
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Материалы.....	48
2.1.1. Выделение сократительных белков из скелетных мышц кролика	48
2.1.1.1. Выделение миозина скелетных мышц кролика	48
2.1.1.2. Выделение актина скелетных мышц кролика.....	49
2.1.1.3. Выделение тропомиозина скелетных мышц кролика	50
2.1.2. Выделение сократительных белков из запираательной мышцы мидии	50

2.1.2.1.	Выделение тонких нитей запирающей мышцы мидии.....	51
2.1.2.2.	Выделение «миофибрилл» запирающей мышцы мидии	51
2.1.2.3.	Выделение миозина запирающей мышцы мидии	52
2.1.2.4.	Выделение «природного» актина запирающей мышцы мидии.	53
2.1.2.5.	Выделение тропомиозина запирающей мышцы мидии.....	54
2.1.2.6.	Выделение фракции тонких нитей мидии, придающей Ca^{2+} -чувствительность синтетическому актомиозину.....	55
2.1.2.7.	Получение актин-связывающих белков АВР-19, АВР-20 и АВР-28	56
2.2.	Методы	57
2.2.1.	Иммуноферментный анализ.....	57
2.2.2.	Масс-спектрометрия.....	58
2.2.3.	Формирование актомиозиновых моделей.....	59
2.2.4.	Определение Mg^{2+} -АТФазной активности актомиозиновых моделей	59
2.2.5.	ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле	60
2.2.6.	Денситометрия.....	62
2.2.7.	Определение концентрации белков методом биурета	65
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ	66
3.1.	Тонкие нити мидии содержат минорные белки, придающие Ca^{2+} -чувствительность реконструированному актомиозин-тропомиозину.....	67
3.1.1.	Идентификация компонентов, придающих Ca^{2+} -чувствительность тонким нитям мидии	67
3.1.2.	Содержание тропонин-тропомиозинового комплекса в тонких нитях мидии.....	71
3.1.3.	Происходят ли потери тропонина в процессе выделения тонких нитей мидии?.....	72
3.1.4.	Зависимость степени Ca^{2+} -регуляции реконструированного актомиозин-тропомиозина от содержания в нем реконструированного тропонина.....	74

3.1.5. Тонкие нити мидии содержат фактор, ингибирующий активирование ими миозина кролика, но не миозина мидии	75
3.1.6. Тропомиозин мидии ингибирует Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина кролика, но не актомиозина мидии	77
3.1.7. Гибридные и негибридные актомиозиновые модели, реконструированные из актина, миозина и тропомиозина скелетной и запирающей мышцы	80
4. ОБСУЖДЕНИЕ	83
4.1. Тонконитевая регуляция запирающих мышц двустворчатых моллюсков	83
4.2. Идентификация тропониновой регуляции в тонких нитях запирающей мышцы мидии	83
4.3. Использование гибридных актомиозиновых моделей для изучения запирающих мышц двустворчатых моллюсков	86
4.4. Распространение тропониновой регуляции среди двустворчатых моллюсков	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Запирательные мышцы двустворчатых моллюсков относятся к категории гладких мышц и способны находиться не только в состоянии сокращения и расслабления, но и в состоянии запирательного тонуса («catch»). Состояние запирательного тонуса мышца может поддерживать до нескольких недель без затрат энергии (Twarog, 1967). Явление запирательного сокращения описано более 100 лет назад (Parnas, 1910), но интерес к нему не ослабевает, поскольку механизм запирательного тонуса невозможно объяснить в рамках современных представлений о механизмах мышечного сокращения.

Существует несколько гипотез о механизме catch. В настоящее время наиболее популярна «твитчиновая» гипотеза, предложенная в 2004 году и дополненная в 2007 (Shelud'ko et al., 2004, 2007). Согласно этой гипотезе, при переходе мышцы к catch, белок толстых нитей твитчин образует сшивки между толстыми и тонкими нитями, фиксирующие мышцу в сокращенном состоянии.

Гипотеза «твитчиновых» сшивок объясняет фиксацию мышцы в сокращенном состоянии, но не объясняет, каким образом запирательный механизм сочетается с другими мышечными функциями – актин–миозиновым взаимодействием и его регуляцией ионами кальция. Можно предположить, что связующим звеном между ними служит актин-ассоциированная регуляторная система тонких нитей (Avrova et al., 2010).

Степень разработанности выбранной темы. Актин-ассоциированная (тонконитиевая) Ca^{2+} -регуляторная система запирательных мышц малоизучена. К настоящему времени в запирательных мышцах найдены свидетельства в пользу существования двух типов актин-ассоциированной регуляции тонких нитей. Так, в запирательных мышцах гребешков найден тропониноподобный белок, сходный с тропонином скелетных мышц позвоночных (Nishita et al., 1997), а в запирательных мышцах мидий и устриц обнаружен кальдесмон-подобный белок, входящий в Ca^{2+} -регуляторную систему гладких мышц позвоночных (Bennett, Marston, 1990). Следует отметить, что наличие кальдесмона в тонких нитях запирательной мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* не было подтверждено (Dobrzhanskaya et al., 2013). Возможно, что в разных группах двустворчатых моллюсков существуют разные системы Ca^{2+} -регуляции тонких нитей.

Цели и задачи исследования. Целью работы было выяснение механизма Ca^{2+} -регуляции тонких нитей запираательных мышц двустворчатых моллюсков на примере мидии *Crenomytilus grayanus*.

Были поставлены следующие задачи:

1. Выявить белки запираательных мышц мидии *Crenomytilus grayanus*, придающие тонким нитям Ca^{2+} -чувствительность.
2. Идентифицировать белковые компоненты регуляторной системы тонких нитей запираательной мышцы мидии по функциональным свойствам, иммуноферментному окрашиванию и MALDI TOF/TOF спектрам.
3. Выяснить причины зависимости свойств гибридных актомиозиновых моделей от их состава и найти условия корректного использования этих моделей.

Научная новизна. Из тонких нитей запираательной мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* выделена фракция минорных белков, способная придавать Ca^{2+} -чувствительность актомиозиновым моделям, содержащим тропомиозин. Из этой фракции в свою очередь выделены актин-связывающие белки (actin binding proteins) АВР-19, АВР-20 и АВР-28, которые образуют комплекс, способный придавать Ca^{2+} -чувствительность актомиозиновым моделям. Показано, что физико-химические свойства этих белков близки к свойствам компонентов тропонина скелетных мышц позвоночных.

Установлено, что молярное содержание компонентов тропонина в запираательной мышце мидии вдвое меньше содержания тропомиозина (ТМ:Тп=1:0.5), а соотношение актина и тропомиозина в ней такое же, как и в скелетных мышцах позвоночных (А:ТМ=7:1). Предложена гипотеза, объясняющая низкое содержание тропонина в тонких нитях запираательной мышцы мидии при высокой степени Ca^{2+} -регулируемости этих нитей.

Изучено влияние тропомиозинов мидии и кролика на АТФазную активность сократительных моделей разной степени гибридности. Показано, что необычная способность тропомиозина моллюсков сильно (до 90%) ингибировать актин-миозиновое взаимодействие проявляется только в гибридной сократительной модели, содержащей одновременно тропомиозин из мышц моллюсков и миозин из мышц позвоночных. Найдены условия среды, в которых ингибирующая способность тропомиозина мидии не проявляется.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе данные об устройстве актин-ассоциированной регуляторной системы запирающих мышц важны для понимания роли актин-ассоциированной Ca^{2+} -регуляции в запирающем сокращении.

Качественные различия между гибридной и не гибридной актомиозиновыми моделями, выявленные в ходе данной работы, указывают на необходимость осторожно и критически относиться к результатам, полученным посредством гибридных моделей.

Разработан метод получения хроматографически чистых компонентов тропонинового комплекса из мышцы мидии. Детально описаны методы выделения и очистки миозина и тропомиозина, а также реконструкции сократительных моделей, которые могут быть использованы в других исследованиях в области биологической подвижности. Определены относительные коэффициенты связывания красителя Coomassie brilliant blue R-250 с актином, тропомиозином и компонентами тропонина мидии, что позволяет посредством денситометрии устанавливать молярные соотношения этих белков.

Методология и методы диссертационного исследования. В данной работе были применены различные физико-химические и биохимические методы получения и анализа белков и их комплексов. При определении состава препаратов в процессе выделения белков и для контроля состава белковых смесей использовали электрофорез в полиакриламидном геле. Для идентификации тропонина мидии были применены методы иммуноферментного окрашивания и МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) спектроскопии. Для тестирования свойств тропонинового комплекса были использованы хроматографически очищенные компоненты тропонина. Тестирование проводили посредством сократительных моделей, представляющих собой комплекс актина, миозина и тропомиозина. Для определения молярного содержания белков в тонких нитях мидии была применена денситометрия электрофоретических гелей с предварительным определением коэффициентов связывания красителя с белками тонких нитей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Тонкие нити запирающей мышцы мидии содержат тропонин, свойства которого близки к свойствам тропонина скелетных мышц позвоночных животных.

2. Содержание тропонина в тонких нитях запирающей мышцы мидии вдвое меньше его содержания в тонких нитях скелетных мышц позвоночных.

3. Сильное ингибирование тропомиозином мидии актин-миозинового взаимодействия, описанное в литературе, проявляется только в гибридных сократительных моделях.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов исследования была обеспечена использованием современных молекулярно-биохимических подходов. Все этапы выделения белков и их комплексов контролировали с помощью электрофореза. Предварительная ригоризация мышечной ткани позволила исключить потери белков в процессе их выделения. О достоверности экспериментальных результатов также свидетельствует их воспроизводимость. Идентификацию белков тонких нитей запирающей мышцы мидии подтверждали использованием отрицательного и положительного контроля.

Апробация результатов и публикации. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международных симпозиумах «Биологическая подвижность» (Пушино, 2012, 2014), X Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2011), ежегодных научных конференциях Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (Владивосток, 2011, 2012, 2014, 2015).

По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 2 статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 117 страницах, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 245 ссылок, из них 240 на иностранных языках. Рукопись содержит 17 рисунков и 1 таблицу.

Благодарности. Автор выражает признательность сотрудникам лаборатории биофизики клетки Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук за постоянную помощь на всех этапах исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-33076), Российского научного фонда (грант № 14-14-00080) и Программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения Российской академии наук «Дальний Восток» (проект № 14-III-B-06-117).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Толстые нити

Толстые нити запираательных мышц моллюсков состоят из параамиозина, миозина, миорода и твитчина.

1.1.1. Параамиозин

Параамиозин был выделен из мышц по меньшей мере семи типов беспозвоночных животных, включая моллюсков и артропод (Winkelman, 1976). Этот белок не является уникальным для запираательных мышц двустворчатых моллюсков (Castellani-Ceresa, Lanzavecchia, 1982).

Палочковидная молекула параамиозина (130 нм в длину и 2 нм в диаметре) состоит из двух полипептидных цепей, закрученных в суперспираль (Kendrick-Jones et al., 1969). Обе цепи параамиозина, по-видимому, идентичны и ориентированы параллельно (Weisel, Szent-Gyorgyi, 1975). Молекулярный вес параамиозина варьирует, в зависимости от источника его получения, в пределах 200-226 кДа (Winkelman, 1976). Параамиозин является исключительно устойчивым белком: его можно получить обработкой мышечного экстракта этанолом (Szent-Györgyi, Kendrick-Jonas, 1973).

Растворимость параамиозина зависит от pH. При понижении pH раствора с 7.0 до 6.75 параамиозин теряет растворимость и образует паракристаллы. Этот переход имеет обратную зависимость от ионной силы в растворе (Johnson, Kahn, 1959). Показано, что параамиозин ингибирует актин активирруемую Mg^{2+} -АТФазную активность миозина, не влияя на актин активирруемую Ca^{2+} -АТФазную активность (Cohen et al., 1971). Степень выраженности ингибирования зависит от концентрации актина и параамиозина, что объясняется конкуренцией между ними за миозин (Epstein et al., 1976).

Функциональное предназначение параамиозина еще не до конца ясно. Формирование основы толстой нити, казалось бы, не может быть основной функцией параамиозина, так как миозин способен полимеризоваться и сам по себе.

Однако полимер миозина намного меньше сополимера парамиозина и миозина (Ikemoto, Kawaguti, 1967; Szent-Gyorgyi et al., 1971). То есть, отсутствие парамиозина в миозиновых полимерах не позволяет им достигать размеров, свойственных парамиозиносодержащим толстым нитям *in vivo*. Действительно, существует корреляция между длиной нативных полимеров и содержанием в них парамиозина (Levine et al., 1976). Вовлеченность парамиозина в формирование длинных толстых нитей была подтверждена и экспериментами по реконструкции толстых нитей *in vitro* (Ikemoto, Kawaguti, 1967). Таким образом, парамиозин, по-видимому, необходим для формирования длинных толстых нитей.

По-видимому, именно он определяет размер толстых нитей моллюсков, которые значительно длиннее нитей позвоночных (20-30 мкм против 1,6 мкм). Интересно, что самые крупные толстые нити обнаружены в мышцах, способных к запирательному сокращению (Chantler, 1983; Pere et al., 1986). Существование таких длинных толстых нитей в запирательных мышцах моллюсков, по-видимому, обусловлено необходимостью развивать значительное напряжение. Это предположение основывается на том, что усилие, передаваемое на одну тонкую нить пропорционально количеству соединенных с ней головок миозина, и, следовательно, длине толстой нити (Huxley, Niedergerke, 1954). Кроме увеличения длины толстой нити парамиозин обеспечивает и увеличение ее диаметра (в сравнении с миозиновым полимером). Осуществляется это за счет того, что парамиозин локализован внутри толстой нити и образует полимерную сердцевину (Szent-Gyorgyi et al., 1971). Ранние исследования показали (Bear, 1944; Bear, Selby, 1956), что парамиозиновая сердцевина толстой нити представляет собой либо паракристаллическую структуру, напоминающую двумерную сеть, либо спиралевидный полимер (Bear, Selby, 1956). Позже было показано на нативных толстых нитях, с которых с которых был удален миозин и, видимо, миород, что парамиозин действительно образует паракристаллическую структуру (Cohen et al., 1971; Elliott, 1979; Szent-Gyorgyi et al., 1971).

1.1.2. Миозин

Миозин является главным поверхностным белком толстых нитей. Все известные миозины обладают близким молекулярным весом, около 450-500 кДа, и сходным строением. Типичный миозин представляет собой молекулу с высокой степенью асимметрии, состоящую из тяжелых (с высоким молекулярным весом, около 200 кДа каждая) и легких цепей (каждая 15-30 кДа). Тяжелые цепи в молекуле миозина составляют длинный миозиновый хвост (140-нм), и две головки миозина (12-20 нм). Хвост образован двумя сплетенными в «coiled-coil α -helices» участками тяжелых цепей миозина, и отвечает за связывание миозина с толстой нитью (Harrison et al., 1971). Головки представляют собой расплетенное продолжение хвоста миозина. Каждая из головок несет на себе актиновый и АТФазный сайт (Lowey et al., 1969;). Между каждой головкой и хвостом миозина расположен небольшой (8.5 нм) гибкий α -спиральный участок молекулы, отвечающий за ее конформационные изменения и несущий на себе участки связывания с легкими цепями миозина (Houdusse, Cohen, 1996; Weeds, Lowey, 1971).

Легкие цепи миозина подразделяются на существенные и регуляторные. В молекуле миозина с каждой из головок тяжелых цепей связано по две легких цепи, по одной регуляторной и существенной цепи на головку. Существенные цепи миозина обладают молекулярным весом 17 кДа и, по-видимому, участвуют в поддержании стабильности молекулы миозина (Aguilar et al., 2010). Происхождение их названия объясняется тем, что в ранних опытах, избирательное удаление этой пары легких цепей приводило к полной инактивации миозина (Dreizen, Gershman, 1970). Регуляторные легкие цепи миозина, как следует из названия, вовлечены в регуляцию АТФазной активности миозина. Данное утверждение справедливо как в отношении миозина из мышц позвоночных, так и беспозвоночных животных, несмотря на разное устройство миозин-ассоциированных регуляторных механизмов этих мышц. Так, легкие цепи гладких мышц позвоночных несут на себе участок связывания киназы легких

цепей миозина. Эта киназа в присутствии кальция активирует миозин фосфорилированием. Регуляторные цепи миозина скелетных мышц позвоночных не несут на себе такого участка, однако, их удаление оказывает влияние на моторную функцию миозина. Регуляторные цепи миозинов из запирающих мышц моллюсков, как и регуляторные цепи скелетных миозинов позвоночных, не несут на себе участка для связывания с киназой. Однако, эти цепи участвуют в формировании Ca^{2+} -связывающего домена, благодаря которому, миозин из мышц моллюсков способен осуществлять саморегуляцию (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1980).

В формировании этого уникального для моллюсковых миозинов домена одновременно с регуляторными цепями участвуют и тяжелые цепи миозина. Об этом свидетельствует то, что миозин, лишенный регуляторных цепей, теряет способность к Ca^{2+} -регуляции и, при этом, диссоциированные регуляторные цепи не несут Ca^{2+} -связывающего участка (Asakawa et al., 1981; Bagshaw, Kendrick-Jones, 1979; Chantler, Szent-Gyorgyi, 1978; Jakes et al., 1976). Из-за того, что отделение регуляторной цепи приводит к утрате контроля над миозином, процесс удаления его регуляторных цепей был назван десенсибилизацией. Происходит десенсибилизация в присутствии 10 мМ ЭДТА при температуре 25-35°C (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1980). Интересно, что обработка миозина ЭДТА при более низкой температуре приводит к отделению только одной из двух его регуляторных цепей (Szent-Györgyi, Kendrick-Jonas, 1973), но Ca^{2+} -регулируемость миозина утрачивается полностью (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1980; Jakes et al., 1976).

Протеолитическое расщепление молекулы миозина – другой подход к исследованию его структуры и функции. Молекула миозина вследствие высокого содержания α -спиралей является довольно жесткой и малочувствительна к действию ферментов. Наиболее чувствительными к действию протеаз являются шарнирные участки между головкой и шейкой миозина, а также между шейкой и хвостом. При обработке миозина папаином (Lowey et al., 1969), или химотрипсином (Weeds, Taylor, 1975), молекула миозина расщепляется в области

первого шарнира (между головками и шейкой миозина). Такое расщепление позволяет получить головку (S-1 фрагмент миозина) и его хвост. Воздействие на миозин трипсином позволяет разделить молекулу миозина в области второго шарнира, на тяжелый меромиозин (НММ), содержащий обе головки миозина и небольшую часть хвоста, и легкий меромиозин (ЛММ), содержащий С-концевую часть молекулы (Mihalyi, Szent-Gyorgyi, 1953). На тяжелый меромиозин, в свою очередь, можно воздействовать папаином и, таким образом, отделить S-1 фрагмент от шейки миозина (весом 60 кДа). Получившаяся таким образом шейка называется S-2 фрагментом миозина (Lowey et al., 1969).

Отдельные фрагменты молекулы сохраняют определенные свойства миозина. Так, и ЛММ и хвост миозина, полученный при химотрипсинолизе, способны при низкой ионной силе образовывать филаменты, а НММ моллюсков демонстрирует типичную для моллюскового миозина Ca^{2+} -регулируемую АТФазу. Интересно, что в отличие от НММ, S-1 фрагмент моллюскового миозина обладает Ca^{2+} -независимой АТФазой. Наверняка, это связано с нарушением целостности Ca^{2+} -связывающего домена миозина. S-1 фрагмент миозина может быть получен в двух вариантах: если расщепление проводилось в присутствии бивалентного катиона, то он будет содержать оба типа легких цепей, расщепление же миозина в присутствии ЭДТА дает S-1 фрагмент, практически лишенный регуляторных цепей (Stafford et al., 1979). Таким образом, бивалентный катион предохраняет легкие цепи от расщепления (Bagshaw, Reed, 1977; Szent-Györgyi, Kendrick-Jonas, 1973). S-2 фрагмент миозина, в отличие от ЛММ, несмотря на свою α -спиральную структуру, не является нерастворимым и не проявляет тенденции к полимеризации. Исследование этого фрагмента показало, что он является рычагом, перемещающим головку миозина относительно толстых нитей в процессе сокращения. Все эти фрагменты могут оказаться особенно полезны в исследовании миозина моллюсков и его АТФазного цикла.

Во многих работах сообщалось о неустойчивости моллюскового миозина даже при непродолжительных сроках хранения (Barany, Barany, 1966; Kondo et al.,

1979; Lehman, Szent-Györgyi, 1975). Однако, по мнению Chantler (Chantler, 1983) неустойчивость миозина обусловлена денатурацией в процессе получения препарата. Должным образом полученный миозин моллюсков сохраняет активность и способность взаимодействовать с актином Ca^{2+} -зависимым образом не менее одной недели. Более того, миозин, помещенный в 40% сульфат аммония может храниться в нем неопределенный продолжительный срок (Wallimann, Szent-Györgyi, 1981). Наиболее удобный метод приготовления миозина к хранению в сульфате аммония описан Chantler и Szent-Gyorgyi (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1978). Этот метод основан на сульфат-аммонийном фракционировании (Focant, Huriaux, 1976) и позволяет в кратчайшие сроки получить чистый миозин.

В толстых нитях мышц моллюсков, миозин находится в поверхностном слое, окружающем парамиозиновую сердцевину. Этот вывод вытекает из простой демонстрации того, что миозин легко можно извлечь из толстых нитей, оставляя сердцевину интактной (Hardwicke, Hanson, 1971; Szent-Gyorgyi et al., 1971).

1.1.3. Миород

Миород также является поверхностным белком толстых нитей. Миород – водонерастворимый, термостабильный, фибриллярный белок, представленный двумя одинаковыми или разными полипептидными цепями с молекулярной массой 100 – 120 кДа (106 и 113 кДа в мышцах мидии) (Shelud'ko et al., 1999). Содержание миорода в мышцах высокое, оно превышает содержание тропомиозина и приближается к содержанию миозина. Миород является продуктом альтернативного сплайсинга гена тяжелых цепей миозина, он содержит С-концевую стержневую часть миозина и уникальную N-концевую последовательность (Yamada et al., 2000). Миород локализован на поверхности парамиозиновой основы толстых нитей (Shelud'ko et al., 1999) наряду с миозином (Szent-Gyorgyi et al., 1971) и твитчином (Vibert et al., 1993) и способен *in vitro* взаимодействовать со всеми этими белками (Shelud'ko et al., 2001, 2007). Миород полимеризуется, причем его полимеры сильно отличаются от полимеров миозина,

несмотря на идентичность участков, определяющих полимеризацию этих белков (Матусовская и др., 2004; Матусовский и др., 2005; Shelud'ko et al., 2001). Поскольку основой толстых нитей моллюсков является парамиозин, неясно, находится ли миород на поверхности парамиозиновой основы в виде полимера, или способность миорода (как, впрочем, и миозина) полимеризоваться не используется при построении толстых нитей. Расположение миорода на поверхности толстой нити, по всей вероятности, такое же, как и миозина, поскольку доменная структура миорода сходна с таковой миозина. Можно ожидать, что "хвостовой" домен миорода (идентичен LMM миозина) лежит на поверхности толстых нитей, а его «шейный» и «головной» домены находятся в межфиламентном пространстве. Такая конфигурация наводит на мысль о том, что функция миорода может быть связана с влиянием на взаимодействие толстых и тонких нитей.

Миород появляется на очень ранней стадии миогенеза, когда гладкие мышцы, типичные для взрослых животных, еще не сформированы (Odintsova et al., 2006). Это обстоятельство позволяет предполагать, что миород может принимать участие в формировании сократительного аппарата. В этом случае его функция в процессе миогенеза может меняться и, соответственно, он может обладать свойствами, обеспечивающими как «эмбриональные», так и «взрослые» функции.

В мышцах дрозофилы существует *myosin rod protein* (MRP), который имеет такое же строение и происхождение, как и миород (Polyak et al., 2003; Standiford et al., 1997). Он является альтернативным продуктом гена тяжелых цепей миозина, содержит С-концевую стержневую часть миозина, уникальную N-концевую последовательность и входит в состав толстых нитей. Однако миород и MRP – разные белки. Их уникальные и общие с миозином части имеют разные размеры и, главное, уникальные части имеют разные аминокислотные последовательности. Видимо, сходство этих белков ограничивается одинаковым способом образования, в основе которого лежит функциональное разделение стержневой и

головной части молекул. Стержневая часть миозина определяет локализацию белка, а уникальная часть определяет его функцию, специфическую для данной мышцы. Интересно отметить, что запираательные мышцы моллюсков и асинхронные летательные мышцы насекомых, предельно различные функционально, сходны в том, что обе мышцы содержат парамиозин и обе обладают уникальными свойствами – способностью к запираательному сокращению в первом случае и способностью к осциллирующему сокращению во втором. Возможно, что эти уникальные функции и обеспечиваются миород-подобными белками.

Миород более чем на 75% состоит из стержневой части миозина, которая определяет особенности растворимости миозина и его полимеризации. Однако эти свойства миорода заметно отличаются от таковых миозина. Миород в зависимости от условий среды способен образовывать различные полимеры: короткие, длинные нитевидные и латеральные агрегаты нитевидных полимеров, однако он никогда не образует нити, сходные с миозиновыми нитями (Матусовский и др., 2005). Похожие нити образуются протеолитическим фрагментом миорода после отщепления уникальной последовательности. Кроме того, отщепление уникальной последовательности приводит к резкому изменению реологических свойств миорода. Нативный миород обладает необычным свойством – сильно выраженной тиксотропией, которая связана с высокой структурной вязкостью (Shelud'ko et al., 2001). Миород без уникальной последовательности этими свойствами не обладает, также, впрочем, как и НММ или LMM. С другой стороны, модификация N-этилмалеимидом аминокислоты Cys722 в хвостовой части миорода полностью ингибирует его полимеризацию, но придает ему способность к агрегации в присутствии Mg^{2+} (Матусовская т др., 2004). И это свойство есть только у нативного миорода. Все вместе взятое говорит о сильном влиянии небольшого уникального домена на свойства стержневого домена и, соответственно, о потенциально высокой регуляторной способности уникального домена миорода. Это предположение получило поддержку после

обнаружения фосфорилирования уникального домена миорода (Sobieszek et al., 2006).

Оказалось, что миород фосфорилируется киназой легких цепей миозина из гладких мышц позвоночных. Участок фосфорилирования (Thr141) локализован в уникальном домене миорода (Sobieszek et al., 2006). Известно, что сокращение мышц моллюсков регулируется прямым связыванием кальция с миозином, т.е. киназа легких цепей миозина в этих мышцах не используется. Однако киназа легких цепей миозина (MLCK) входит в качестве домена в твитчин (Funabara et al., 2003), гигантский регуляторный белок мышц моллюсков, который способен взаимодействовать с миородом (Shelud'ko et al., 2007). Показано, что твитчин, действительно, способен фосфорилировать миород *in vitro* и не исключено, что миород может быть субстратом этого домена *in vivo*. Более того, в гладких мышцах моллюсков обнаружена еще одна ассоциированная с миозином киназа, которая способна фосфорилировать миород в С-концевом домене.

Вышеизложенные данные, как нам кажется, свидетельствуют в пользу регуляторной функции миорода. Очевидно, что *in vivo* этот белок взаимодействует с парамиозиновой основой толстой нити. Вполне вероятно, что его уникальная часть взаимодействует с твитчином, который способен фосфорилировать миород и эта способность может зависеть от состояния твитчина: является ли он сшивкой между толстой и тонкой нитью или нет, или от степени его растяжения, как это имеет место в случае MLCK-домена титина (Gräter et al., 2005). Кроме того, в С-концевой части миород может фосфорилироваться киназой, связанной с миозином и активность этой киназы может зависеть от состояния миозина. Таким образом, миород может интегрировать информацию о состоянии твитчина и миозина и сообразно этому влиять на состояние толстой нити в целом, что в свою очередь влияет на взаимодействие нитей между собой.

1.1.4. Твитчин

Твитчин тоже поверхностный белок толстых нитей. Это гигантский белок (530 kDa), входящий в суперсемейство протеинкиназ. Он принадлежит семейству «САМК (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase) Ser/Thr protein kinase», куда относится, также, титин. К этому семейству относятся гигантские белки, состоящие из повторяющихся копий иммуноглобулиновых (Ig) и фибронектин-подобных (Fn III) доменов (Benian et al., 1996). Молекулярный уровень организации двух типов доменов представлен семи или восемью β-складчатыми структурами. Белки титинового семейства имеют длинные, вытянутые молекулы и содержат серин-треониновый киназный домен вблизи СООН-конца, который гомологичен каталитическому участку киназы легких цепей миозина (MLCK). Отличительной особенностью белков данного семейства является их способность взаимодействовать с миозином и Ф-актином.

Впервые твитчин был описан в составе мышц нематоды *Caenorhabditis elegans* как продукт unc-22 гена, кодирующего гигантский 753 кДа белок, который локализован в А-зоне саркомера (Benian et al., 1989; Moerman et al., 1988). Мутация по этому гену приводила к беспорядочным, замедленным сокращениям стенок тела червя («twitch» отсюда и название белка твитчин) и дезорганизации мышечной структуры, в которой толстые и тонкие нити не были организованы в А и I-зоны (Waterston et al., 1980).

Интересно, что кроме твитчина, в мышце нематоды *Caenorhabditis elegans* был обнаружен еще один белок, играющий важную роль в формировании саркомеров. Этот белок кодируется геном unc-89 (Benian et al., 1996). В мышцах животных, мутантных по данному гену, наблюдалась дезорганизация саркомерной структуры – толстые нити не формировали А-полосы, и, более того, отсутствовала М-линия (Waterston et al., 1980). Было выяснено, что кодируемый геном unc-89 белок состоит из 6632 аминокислотных остатков и имеет молекулярный вес 732 кДа. Интересен этот гигантский белок еще и тем, что в его

состав входят иммуноглобулиновые, но не фибронектин-подобные домены (Benian et al., 1996). Этот белок получил название UNC-89.

Первая работа о твитчине из запирающих мышц моллюсков появилась в начале 90-х (Vibert et al., 1993). В ней с помощью иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии было установлено, что «мини-титин» (прежнее название твитчина) со-локализован с толстыми нитями в гладкой и поперечнополосатой частях аддуктора гребешка *Placopecten magellanicus* и в толстых нитях гладких мышц мидии *Mytilus edulis*. Таким образом, впервые было показано, что представители иммуноглобулинового семейства присутствуют не только в составе поперечнополосатых, но и в составе гладких мышц.

Известна полная аминокислотная последовательность твитчина мидии *Mytilus galloprovincialis* (Funabara et al., 2003). Твитчин мидии *Mytilus galloprovincialis* состоит из 4736 аминокислотных остатков, а его расчетная молекулярная масса составляет 527 кДа. В последовательности данного белка имеется 24 иммуноглобулиновых, 15 фибронектиновых повторов III типа, небольшой PEVK-подобный участок и киназный домен, имеющий высокую гомологию к MLCK (Funabara et al., 2003).

Фибронектиновые последовательности твитчина мидии *Mytilus galloprovincialis* достаточно консервативны и гомологичны на 30-50% таковым твитчина нематоды *Caenorhabditis elegans* и прожектина из мышц речного рака (Oshino et al., 2003). Доменная структура твитчина из мышц мидии *Mytilus galloprovincialis* и нематоды *Caenorhabditis elegans* также имеет значительное сходство – (Ig)11 (IgFn2)2 Ig(Fn)3 Ig(Fn)2 Ig(Fn)3 – (Ig)2 (Fn)2 (Ig)2 Fn Kinase (Ig)4 для твитчина *Mytilus galloprovincialis*, и (Ig)8 (IgFn2)10 – Ig (Fn)3 Ig (Fn)2 Ig (Fn)3 (Ig)2 (Fn)2 (Ig)2 Fn Kinase (Ig)5 для твитчина нематоды *Caenorhabditis elegans*. Отличия наблюдаются в Ig доменах при N-концевой части молекулы – твитчин нематоды *Caenorhabditis elegans* имеет 10 IgFn2 повторов, тогда как твитчин мидии *Mytilus galloprovincialis* только два подобных повтора. В целом, иммуноглобулиновые последовательности двух твитчинов менее гомологичны,

чем фибронектиновые – на 10-25%, за исключением пяти Ig повторов, которые имеют 40% гомологию (Funabara et al., 2005).

Еще до расшифровки первичной последовательности твитчина появились данные о его регуляторной роли в «catch». На скинированных волокнах мидии *Mytilus edulis* было показано, что фосфорилирование-дефосфорилирование высокомолекулярного белка с массой ~ 600 кДа регулирует запирающее сокращение (Siegman et al., 1997). Далее, стало известно, что белком, фосфорилирование которого посредством РКА расслабляет мышцу из запирающего тонуса, является твитчин (Siegman et al., 1998), а дефосфорилирование твитчина осуществляется Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой Ser/Thr фосфатазой 2В (PP2B) (Yamada et al., 2004).

Фосфорилирование твитчина и связанный с этим процесс расслабления мышцы из запирающего тонуса, происходит в течение 30 сек, после добавления циклического АМФ к скинированным волокнам мышцы или серотонина к нативной мышце (Siegman et al., 1997). Фосфорилирование твитчина посредством каталитической субъединицы РКА *in vitro*, приводит к включению 3-х молей фосфата на молекулу белка (Funabara et al., 2001). С помощью протеолитического расщепления молекулы фосфорилированного твитчина были идентифицированы два основных участка фосфорилирования, названные D1 (Ser-1075) и D2 (Ser-4316) (Funabara et al., 2003). Использование антител позволило определить их локализацию в твитчиновой молекуле – участки расположены на противоположных концах молекулы. D2 сайт находится за киназным доменом между 21 и 22 Ig доменами, а D1 сайт локализован в N-концевой части между 7 и 8 Ig доменами. Как в нативной мышце, так и в скинированных волокнах, уровень фосфорилирования D1 сайта может достигать 50%, при этом расслабления мышцы все еще не происходит (Funabara et al., 2003). Следовательно, фосфорилирование только D1 недостаточно для быстрого высвобождения мышцы из запирающего тонуса. Высказано предположение, что D1 и D2 сайты имеют разную чувствительность к РКА и фосфатазе PP2B (Funabara et al., 2003; Yamada

et al., 2004). Существует также вероятность того, что с твитчином, вблизи D1 участка, связан нерегулируемый фермент (или каталитическая субъединица), который может приносить вклад в фосфорилирование D1. Даже если это имеет место, 100% фосфорилирование данного участка требует активации РКА (Funabara et al., 2003). Важно отметить, что расслабление мышцы из запирающего тонуса происходит только при фосфорилировании второго D2 сайта. В свою очередь, для этого необходимо, чтобы уровень фосфорилирования D1 достиг относительно высокого значения (Funabara et al., 2003).

Из вышесказанного следует, что во время «catch»-состояния, когда мышца поддерживает высокое напряжение, твитчин должен быть дефосфорилирован. Было показано, что скинированные волокна «catch»-мышц, которые интенсивно отмывались раствором для удаления эндогенной фосфатазы, восстанавливали способность поддерживать высокое напряжение после добавления бычьего кальцинерина (Castellani, Cohen, 1992), который является фосфатазой PP2B (Klee et al., 1988). Yamada с соавторами (Yamada et al., 2004) подтвердили, что твитчин дефосфорилируется *in vitro* фосфатазой PP2B.

1.2. Тонкие нити

Тонкие нити запирающих мышц двустворчатых моллюсков включают актин, как основу тонких нитей, и поверхностные белки – тропомиозин, кальпонин и, по крайней мере, для некоторых моллюсков, тропонин.

1.2.1. Актин

Актин является одним из самых известных белков; он распространен повсеместно (Pollard, Weihing, 1974) и участвует в генерации силы в мышцах и немышечных клетках. Тем не менее, следует отметить, что очень немного работ по химии актина были выполнены непосредственно на актине моллюсков, поскольку методов выделения актина из этих объектов нет. Поэтому в гибридных

сократительных моделях используется актин скелетных мышц позвоночных. Предполагается, что актин скелетных мышц и актин из мышц моллюсков имеют практически идентичные свойства. Данное предположение основано на том, что актин моллюсков, по результатам глубоких структурных исследований, очень близок к актину скелетных мышц позвоночных (Craig et al., 1980; Lowy, Vibert, 1967; Nakamura et al., 1979; Vibert et al., 1978).

Действительно, актин является очень консервативным белком (Elzinga et al., 1973; Vandekerckhove, Weber, 1978). Так, полные аминокислотные последовательности актина из скелетных мышц кролика (Elzinga et al., 1973), скелетных мышц цыпленка и актина из куриного желудка (Vandekerckhove, Weber, 1979) отличаются от последовательностей немышечных актинов лишь 25 аминокислотными заменами (Vandekerckhove, Weber, 1978), при общей длине молекулы в 374 аминокислотных остатка. Эти замены распределены не случайно, но приурочены к конкретным участкам, общим для актинов (Vandekerckhove, Weber, 1978). При этом, аминокислотными заменами не затронуты участки, отвечающие за актин-актиновое взаимодействие и области контакта между актином и различными актин-связывающими белками. То есть наиболее важные участки аминокислотных последовательностей абсолютно одинаковы у всех исследованных актинов.

Удивительное сходство обнаружено и между актинами из мышц позвоночных, протехордат, нематод, поперечнополосатых мышц гребешка *Ratinopecten yessoensis*, быстрой мышцы морского уха *Haliotis discus* и мантии кальмара *Todarodes pacificus* (Nakamura et al., 1979).

1.2.2. Тропомиозин

Тропомиозин – белок, характерный для всех, без исключения, мышц. Он является одним из основных белков тонких нитей. Содержание этого белка как в тонких нитях мышц позвоночных, так и моллюсков одинаково: один тропомиозин приходится на 7 мономеров актина (Lehman et al., 1980; O'Brien et al., 1975; Potter,

1974). Основной функцией тропомиозина является участие в Ca^{2+} -регуляции тонких нитей.

Мышечный тропомиозин – очень асимметричный фибриллярный белок, около 41 нм длиной и 2 нм в диаметре, с молекулярным весом 66-70 кДа (Phillips et al., 1979; Weber, Murray, 1973). Соединяясь концами, молекулы тропомиозина формируют полимер (Flicker et al., 1981; Gordon et al., 2000).

В клетках существуют различные изоформы тропомиозина, специфичных каждая для своей изоформы актина (Gunning et al., 2005). Это касается и мышечных клеток, в которых содержится по несколько изоформ тропомиозина (Janco et al., 2013).

Так, в скелетных мышцах кролика существуют две изоформы тропомиозина (α и β) (Boussouf et al., 2007; Bronson, Schachat, 1982). Эти изоформы могут быть разделены ДСН-электрофорезом или гидроксилпатитной хроматографией. Соотношение изоформ тропомиозина в скелетных мышцах кролика составляет 4 α к 1 β (Cummins, Perry, 1973; Kalyva et al., 2012).

Многое, из известного сейчас о тропомиозине было открыто благодаря изучению аминокислотной последовательности кроличьего скелетного α -тропомиозина (Stone, Smillie, 1978). Так, именно исследование аминокислотной последовательности тропомиозина дало подтверждение стерической модели регуляции тонких нитей. Произошло это благодаря тому, что анализ последовательности выявил на тропомиозине 14 квазиэквивалентных участка (McLachlan, Stewart, 1976). Эти участки, очевидно, отвечают за связывание молекулы тропомиозина с семью мономерами актина, на поверхности которых он располагается. То, что этих участков 14, а не 7, прямо указывает на возможность тропомиозина связываться с двумя разными участками на поверхности каждой молекулы актина. Это дает тропомиозину возможность занимать на поверхности тонкой нити два разных положения. Эти данные подтверждают представления о том, что тропомиозин, при активации кальцием мышечного сокращения, способен перемещаться с внешней стороны актина вглубь его канавки (Huxley, 1973).

При этом, тропомиозин сам по себе занимает промежуточное положение между этими сайтами (Lehman et al., 2009).

Некоторые исследователи считают, что тропомиозин взаимодействует с актином не двумя разными парами сайтов, а лишь одним набором (Phillips et al., 1986).

Тропомиозин – первый фибриллярный белок, из которого удалось получить кристалл (Bailey, 1948). Кристаллы формируются тропомиозином при повышении содержания в растворе двухвалентных катионов (Cohen, Longley, 1966; Ishii, Lehrer, 1989). Исследование кристаллов белков позволяет получать сведения о структуре молекул, составляющих их. Так, кристаллы тропомиозина позволяют понять, что при полимеризации молекулы тропомиозина соединяются голова к хвосту (Murakami et al., 2008). При этом длина перекрытия молекул составляет 9 аминокислотных остатков (Lehman et al., 2015; Phillips et al., 1979).

Паракристаллы тропомиозина из разных источников очень похожи. Так, схожи паракристаллы тропомиозина разных видов: устрицы *Crassostrea commercialis* и морского уха *Notohaliothis ruber* (Millward, Woods, 1970; Woods, Pont, 1971). Значительное сходство наблюдается и между паракристаллами тропомиозина из разных тканей одного животного: например, из аддуктора и ноги моллюска *Anodon pacifica* (Tsao et al., 1965). Паракристаллы тропомиозина из всех этих мышц демонстрируют 40-нм исчерченность, по которой можно судить о длине молекулы тропомиозина. Такая же исчерченность характерна для паракристаллов скелетномышечного тропомиозина.

Тропомиозин моллюсков по множеству физико-химических свойств напоминает тропомиозин позвоночных. Так, молекулярный вес тропомиозина находится в пределах 68 ± 6 килодальтон (Woods, Pont, 1971). Несмотря на то, что тропомиозин растворим в высокой ионной силе, полимеризуется он при понижении ионной силы ниже 0.1 М (Sousa, Farah, 2002; Tsao et al., 1951). При этом происходит сильное повышение вязкости раствора. Способность тропомиозина полимеризоваться в низкой ионной силе обусловлена его С-

концевой последовательностью. Так, если карбоксипептидазой А отщепить от С-конца тропомиозина концевой 9-аминокислотный участок, то получившийся 64-кДа тропомиозин не сможет полимеризоваться с понижением ионной силы, и вообще взаимодействовать с актином даже при избытке магния в растворе (Cho et al., 1990; Mak, Smillie, 1981).

Профиль денатурации тропомиозина, наблюдаемый по молярной эллиптичности раствора при 222 нм (характеризующей содержание в растворе α -спиралей), показал, что термостабильность тропомиозина из мышц некоторых моллюсков близка к таковой тропомиозинов позвоночных (Woods, 1976). При этом, термостабильность тропомиозина гребешка *Argopecten irradians* несколько меньше термостабильности тропомиозинов других моллюсков (Woods, 1976). Этот тропомиозин денатурирует одноэтапно. Температура, необходимая для полумаксимальной денатурации тропомиозина ($T_{1/2}$) составляет 30.8°C. Интересно, что эта температура совпадает с $T_{1/2}$ первого этапа денатурации тропомиозина кролика ($T_{1/2(I)} = 30.8^\circ\text{C}$; $T_{1/2(II)} = 54.1^\circ\text{C}$). Такое совпадение температур предполагает существование у этих тропомиозинов участка со значительной степенью гомологии.

Мышечный тропомиозин моллюсков, по ряду свойств отличается от тропомиозина позвоночных. Так, аминокислотный состав тропомиозинов устрицы *Crassostrea commercialis*, морского уха *Notohaliothis ruber*, и гребешка *Pecten alba* отличается от состава тропомиозина позвоночных по содержанию лизина, аспарагина и треонина (Woods, Pont, 1971; Woods, 1976). Кроме того, у тропомиозинов позвоночных и моллюсков значительно отличаются и температуры диссоциации от актина. Так, тропомиозин гребешков *Argopecten irradians* и *Placopecten magellanicus* полностью диссоциирует от актина при температуре 25°C и выше, или при высокой ионной силе (0.6 М NaCl и 2 мМ Mg-АТФ), а диссоциация тропомиозина скелетных мышц происходит при 47°C (Nevzorov et al., 2011). Возможно, это обусловлено различиями участков

перекрытия соседних тропомиозинов в тонких нитях гребешков и позвоночных (Chantler, Szent-Gyorgyi, 1980; Newman, Carlson, 1980).

1.2.3. Тропонин

Тропонин, впервые полученный Эбаши (Ebashi et al., 1968), – ключевой белок в актин-ассоциированной регуляции поперечнополосатых (скелетных) мышц позвоночных. Он связывает кальций, выделившийся под воздействием нервного импульса из саркоплазматического ретикулума, и активирует сокращение (Greene et al., 1987).

Тропонин состоит из трех компонентов: тропонина С (18 кДа), на котором располагаются участки связывания кальция; тропонина I (21-32 кДа), способного ингибировать актин-миозиновое взаимодействие; и тропонина Т (37 кДа), прикрепляющего тропониновый комплекс к тропомиозину. Субъединицы тропонинового комплекса позвоночных соотносятся между собой как 1:1:1 (Potter, 1974). Тропонин входит в состав Ca^{2+} -чувствительного комплекса наряду с тропомиозином и актином. Соотношение тропонина, тропомиозина и актина в этом комплексе 1:1:7 (Potter, 1974).

Тропопиновая регуляция характерна для поперечнополосатых мышц как позвоночных, так и беспозвоночных. Поэтому, неудивительно, что в поперечнополосатой мышце гребешков, не имеющей аналогов среди мышц других двустворчатых моллюсков, была обнаружена тропопиновая регуляция. Существование тропопиновой регуляции в мышцах других групп двустворчатых моллюсков не доказано, возможно, из-за того, что мышцы других двустворчатых моллюсков гладкие. При этом, следует заметить, что, хотя тропопин найден не только в поперечнополосатой, но и в гладкой мышце гребешков, его участие в кальций-регуляции гладких мышц гребешков не доказано (Chantler, 2011).

Согласно работам на поперечнополосатой мышце гребешка, в тонких нитях моллюсков соотношение актина, тропомиозина и тропопина (7 : 1 : 1) соответствует таковому скелетных мышц позвоночных (Lehman et al., 1980). При

этом соотношении компонентов тропонина в тропониновом комплексе является эквимольным (Nishita et al., 1997; Ojima, Nishita, 1986). Компоненты тропонина, как из поперечнополосатой, так и гладкой мышц гребешков, по своему влиянию на сократительную модель соответствуют компонентам тропонина позвоночных (Nishita et al., 1997; Ojima, Nishita, 1986, 1992). Кроме того, как показало тестирование в гибридных сократительных моделях, компоненты тропонина гребешков и позвоночных взаимозаменяемы (Goldberg, Lehman, 1978; Ojima, Nishita, 1988).

Несмотря на значительное сходство тропонинов позвоночных и моллюсков, последние обладают и уникальными свойствами. Так, механизм их функционирования в регуляторной системе оказался скорее «активаторным», нежели «ингибиторным». «Ингибиторный» механизм регуляции, характерный для тропонина позвоночных, подразумевает обеспечение Ca^{2+} -регуляции за счет подавления взаимодействия актина с миозином в отсутствие кальция, и небольшого активирования этого взаимодействия в присутствии Ca^{2+} . «Ингибиторный» механизм регуляции характеризуется тем, что тропонин моллюсков не ингибирует актин-миозиновое взаимодействие в отсутствие Ca^{2+} , и сильно активирует его в присутствии Ca^{2+} . Такой механизм связан с тем, что тропомиозин моллюсков сам по себе (без тропонина) сильно ингибирует АТФазную активность сократительной модели. Поэтому, добавление к нему тропонина среде с низкой концентрацией Ca^{2+} не приводит к понижению уровня активности миозиновой АТФазы. В присутствии же Ca^{2+} , тропонин снимает ингибирование тропомиозином АТФазной активности модели, восстанавливая ее уровень до значений, наблюдаемых в отсутствие тропомиозина, что выглядит, как активирование (Ojima, Nishita, 1986).

Другой особенностью тропонина гребешков является то, что его С-компонент, в отличие от тропонина С позвоночных имеет не два Ca^{2+} -связывающих домена, а один. Это справедливо для тропонина С как из гладких,

так и поперечнополосатых мышц гребешков (Nishita et al., 1997; Ojima, Nishita, 1986).

Интересен вопрос молекулярного веса моллюсковых аналогов тропонина. Как следует из литературы, молекулярный вес компонентов моллюскового тропонина довольно сильно варьирует, в зависимости от типа мышцы, и вида моллюска. В гладких мышцах гребешков тропонины I, T и C обладают весом 19-20, 20-21 и 40 кДа (Nishita et al., 1997; Ojima, Nishita, 1986). В поперечнополосатых мышцах гребешков эти же субъединицы весят 52 или 23, 18-20 и 40 кДа, соответственно (Lehman et al., 1980; Ojima, Nishita, 1986, 1992).

Для тропонинов из поперечнополосатых мышц гребешков были определены первичные последовательности (Inoue et al., 1996; Nishita et al., 1994; Tanaka et al., 1998).

1.2.4. Кальпонин

Кальпонин принадлежит к семейству актин-связывающих белков, которое включает основные (h1) и нейтральные (h2) изоформы кальпонина, присутствующие в гладких мышцах (Strasser et al., 1993), и кислые изоформы (h3) в гладких мышцах и в немышечных клетках (Applegate et al., 1994). Считается, что они вовлечены в различные биологические процессы, такие как регуляция сокращения в гладких мышцах (Winder, Walsh, 1996), организация актинового цитоскелета в гладкомышечных и немышечных клетках (North et al., 1994) и выполняют роль сигнальных молекул (Menice et al., 1997).

Аминокислотные последовательности изоформ кальпонина довольно консервативны, но значительно различаются в С-концевой области. С-концевые различия определяют размер и заряд изоформ кальпонина. Кальпонины *in vitro* взаимодействуют с актином (Makuch et al., 1991; Takahashi et al., 1986) и могут связывать нити актина (Leinweber et al., 1999). Кроме того, они связывают Ca^{2+} -кальмодулин (Takahashi et al., 1986), тропомиозин (Childs et al., 1992), миозин (Lin et al., 1993), десмин (Wang, Gusev, 1996), тубулин (Fujii, Koizumi, 1999),

кальдесмон (Graceffa et al., 1996), кальтропин (Wills et al., 1994), гельзолин (Ferjani et al., 2006) и фосфолипиды (Bogatcheva, Gusev, 1995).

Посредством анализа конфокальной иммунофлуоресценции показано, что *in vivo* кальпонин локализован в тонких нитях гладкомышечных клеток (Walsh et al., 1993). Более детальные исследования показали, что этот белок может находиться как в сократительном домене клеток (Gimona, Small, 1996; Small, Gimona, 1998), где присутствует α -гладкомышечный актин, миозин и кальдесмон, так и в цитоскелетном домене (Mabuchi et al., 1996), где представлена β -форма актина, десмин и филамин. При этом локализация зависит от функционального состояния клетки. В расслабленных клетках кальпонин солокализован преимущественно с нитями α -актина в то время, как в стимулированных клетках усиливается его солокализация с нитями β -актина (Parker et al., 1998).

Посредством двух сайтов связывания с актином кальпонин ингибирует актин-активируемую Mg^{2+} -АТФазу гладкомышечного миозина *in vitro* (Winder, Walsh, 1993), скольжение нитей актина в искусственных подвижных системах (Shirinsky et al., 1992) и сокращение демембранизированных гладкомышечных полосок (Jaworowski et al., 1995).

Выявлены две возможности регулировать актин-кальпониновое взаимодействие *in vitro*. Посредством Ca^{2+} -связывающих белков, таких как кальмодулин (Gimona, Small, 1996), и фосфорилированием кальпониона протеин киназой С или Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеин киназой II (Nakamura et al., 1993; Tang, Janmey, 1996). В обоих случаях комплекс Ф-актин-кальпонин диссоциирует.

Ассоциация кальпониона с нитями актина, ингибирование актомиозиновой АТФазы и возможность регуляции этого ингибирования стали основой для выдвижения гипотезы о способности кальпониона влиять *in vivo* на работу миозинового мостика (Winder et al., 1998). Некоторые основания для такого предположения были также найдены при исследовании гладких мышц нокаутных по кальпонину мышей (Matthew et al., 2000; Takahashi et al., 2000). Было показано,

что отсутствие кальпонины не сказывается на развитии силы и Ca^{2+} -чувствительности или Ca^{2+} -сенсibilизации. Однако скорость сокращения ненагруженной мышцы намного выше в мышцах нокаутных животных. Полагают, что эти данные указывают на физиологическую роль кальпонины как регулятора цикла миозиновых мостиков, хотя и не являются доказательством этой роли (Matthew et al., 2000). Интересно, что такой же вывод можно сделать на примере гладкой мышцы аорты, в которой кальпонин в норме не экспрессируется и это коррелирует только с пониженной чувствительностью мышцы к норадреналину (Nigam et al., 1998).

В течение 1990-х годов поиски функции кальпонины ограничивались исследованием его взаимодействия с актином, его способности ингибировать АТФазу и его локализации в клетке. Однако в последние годы стало ясно, что кальпонин может функционировать как сигнальная молекула, контролирующая связанные с актином клеточные процессы посредством регуляции степени стабильности актинового цитоскелета (Rozenblum, Gimona, 2008; Wu, Jin, 2008). Также очевидно, что кальпониновое семейство в целом вовлечено во множество функций в мышечных и неммышечных клетках и экспрессия кальпонины служит маркером не только дифференциации гладкомышечной клетки, но и позволяет предсказывать развитие опухолевых метастазов (Taniguchi, 2005).

У беспозвоночных кальпониноподобные белки были идентифицированы в тканях кольчатых червей рода *Eisenia* (Royuela et al., 1997), двустворчатых моллюсков рода *Mytilus* (Funabara et al., 2001), брюхоногих моллюсков рода *Helix* (Royuela et al., 2000), ленточных червей рода *Echinococcus* (Martin et al., 1995, 1997), трематод рода *Schistosoma* (Jones et al., 2001) и нематод рода *Onchocerca* (Irvine et al., 1994), но не в мышцах ракообразных или насекомых рода *Drosophila* (Royuela et al., 1997, 2000). Последовательности ДНК кальпониноподобных белков были определены для нематод рода *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno et al., 2001), ленточных червей рода *Echinococcus* (Martin et al., 1995), и трематод рода *Schistosoma* (Yang et al., 1999). Показано, что кальпонин из тканей представителей

рода *Echinococcus* обладает единственным геном, однако множественные изоформы экспрессируются благодаря посттрансляционным модификациям, включая фосфорилирование протеин киназой С (Martin et al., 1997).

Лишь в одном случае кальпониноподобный белок беспозвоночных был изолирован и частично физико-химически охарактеризован (Funabara et al., 2001). Авторы выделили 45 кДа кальпониноподобный белок из запирающей мышцы мидии *Mytilus galloprovincialis*. Идентификация кальпониноподобного белка была проведена на основании следующих фактов. N-концевой участок этого белка обладал высокой гомологией к таковому гладкой мышцы позвоночных, белок реагировал с моноклональными антителами на гладкомышечный кальпонин цыпленка (Serva-Aldrich) и ингибировал АТФазную активность актомиозина. Запирающая мышца мидии *Mytilus galloprovincialis* является одной из наиболее изученных запирающих мышц. Наличие в ней кальпониноподобного белка, как полагают авторы, позволяет предполагать его участие в запирающем сокращении («catch») вслед за предположением об участии кальпониона гладких мышц позвоночных в тоническом сокращении («latch») (Szymanski, Program, 2004). Имеющиеся экспериментальные данные позволяют выдвинуть «кальпониновую» гипотезу «catch», согласно которой в основе этого явления лежит способность кальпониноподобного белка сшивать тонкие нити, стабилизируя актиновый цитоскелет сократительного домена.

1.2.5. Устройство тонких нитей

Сочетание дифракционного анализа, электронной микроскопии и оптической дифракции позволило заключить, что симметрия актинового полимера и природа взаимодействия тропомиозина с этим полимером одинаковы для мышц моллюсков и позвоночных.

В основе тонких нитей лежит достаточно гибкий (Egelman et al., 1982) полимер глобулярного актина, представляющий собой двойную спираль. На один виток этой спирали приходится 13–15 субъединиц актина, длина витка при этом

составляет 35-40 нм (Bear, 1945; Bear, Selby, 1956; Egelman et al., 1982; Egelman, 1985; Lowy, Vibert, 1967; Tsuchiya et al., 1978; Vibert, Craig, 1982). Точное число мономеров на один виток спирали зависит от надмолекулярной формы актина (например, филаменты, пучки, паракристаллы) и типа препарата актина (глицеринизированные, фиксированные или интактные тонкие нити). Кроме того, расхождения в длине витка могут быть связаны с артефактами, возникающими при электронной микроскопии и дифракции, и зависящими от источника актина (Reedy et al., 1983). Также длина витка актина, как показано в литературе (Ruiz et al., 1998), зависит от того, находится ли мышца в покое или ригоре (Maeda et al., 1979) и какое натяжение испытывает (Tajima et al., 1994).

Вдоль двойной актиновой спирали с каждой из ее двух сторон располагается полимер тропомиозина (O'Brien et al., 1971), образованный соединяющимися по принципу голова-к-хвосту молекулами тропомиозина (Flicker et al., 1982; Gordon et al., 2000). Длина одной молекулы тропомиозина составляет около 40 нм (что соответствует длине семи мономеров актина) (Phillips et al., 1979).

Кроме тропомиозина на поверхности тонких нитей располагается с периодичностью 38–44 нм тропониновый комплекс (Lehman, 1983). Эта периодичность совпадает с периодичностью расположения на тонкой нити тропомиозина и обусловлена тем, что тропониновый комплекс с ним взаимодействует (Gordon et al., 2000; Greaser, Gergely, 1971; Greaser et al., 1973). Ввиду того, что тропомиозин на поверхности актина образует полимер, каждый регуляторный тропонин-тропомиозиновый комплекс способен влиять на регуляцию соседнего комплекса (Vibert et al., 1997).

На поверхности тонких нитей мидии присутствует и кальпонин (Dobrzhanskaya et al., 2013). Молярное отношение CaP к актину в мышце моллюсков составляет 1:4, т.е. около двух молекул CaP на одну функциональную единицу тонкой нити (Dobrzhanskaya et al., 2013). В гладких мышцах

позвоночных это соотношение лежит в пределах от 1:10 (Nishida et al., 1990) до 1:16 (Marston, 1991).

1.3. Регуляция запирающих мышц

1.3.1. Актин-ассоциированная Ca^{2+} -регуляторная система

Актин-ассоциированная Ca^{2+} -регуляторная система была впервые обнаружена в скелетных мышцах позвоночных (Ebashi et al., 1968). Эта регуляторная система включает тропомиозин, образующий непрерывный тяж на поверхности тонких нитей и тропониновый комплекс, располагающийся на тропомиозине и взаимодействующий с актином. Тропониновый комплекс, в зависимости от связывания им кальция, способен изменять положение тропомиозинового тяжа на поверхности тонкой нити. Это перемещение стерическим образом влияет на взаимодействие актина с миозином (Lehman et al., 2013).

На поверхности актина существует три участка связывания тропомиозина, соответствующих трем положениям тропомиозина на актине. В зависимости от того, перекрываются ли участки связывания тропомиозина и миозина, различают участки «открыто» (участки не перекрываются), «закрыто» (частичное перекрытие участков) и «блокировано» (тропомиозиновые участки совпадают с участками связывания миозина) (Galinska-Rakoczy et al., 2008).

Сам по себе, в отсутствие тропонина, тропомиозин располагается в положении «закрыто», частично блокируя участки связывания миозина (Lehman et al., 2009). Добавление к тропомиозину тропонина приводит к тому, что тропонин связывается с тропомиозином посредством тропонина Т. При этом, если концентрация Ca^{2+} в среде низка, то I компонент тропонина стремится провзаимодействовать с участком актина «открыто». Связываясь с этим участком, тропонин I выталкивает тропомиозин из положения «закрыто» в направлении участка актина, с которым взаимодействует миозин («блокировано»). Занимая этот участок, тропомиозин блокирует актин-миозиновое взаимодействие. При

добавлении кальция, тропонин С оттягивает на себя тропонин I, диссоциируя его от актина. Происходит это за счет усиления сродства между тропонинами I и С (Holmes, Lehman, 2008). После этого, тропонин I больше не удерживает тропомиозин от перехода обратно в положение «закрыто». При этом, на тропомиозин начинает действовать тропонин Т, принуждающий его занять положение на актине, до сих пор занятое тропонином I. Тропомиозин, перемещаясь в положение «открыто», открывает миозиновые сайты связывания на актине, инициируя взаимодействие актина и миозина (Lehman et al., 2009).

Иная, ассоциированная с миозином Ca^{2+} -регуляторная система, была впервые обнаружена в мышцах двустворчатых моллюсков и поначалу рассматривалась как система, альтернативная актиновой регуляции (Lehman, Szent-Györgyi, 1975). Однако, затем было показано, что все тестированные мышцы беспозвоночных содержат одновременно и актин-ассоциированную и миозин-ассоциированную регуляторные системы, т.е. обладают двойной Ca^{2+} -регуляцией (Hooper, Thuma, 2005; Hooper et al., 2008; Lehman, 1977).

К мышцам с двойной регуляцией относятся, среди прочих, запираательные мышцы двустворчатых моллюсков и гладкие мышцы позвоночных. Считается, что в этих мышцах миозин-ассоциированная регуляция является основной, а актин-ассоциированная – вспомогательной. Функциональное предназначение актин-ассоциированной регуляции в мышцах с двойной регуляцией неизвестно. Предполагается, что эта регуляция имеет отношение к некоторым уникальным свойствам гладких мышц. Так, актиновая регуляция гладких мышц позвоночных, возможно, связана с явлением «latch» в этих мышцах (Bartegi et al., 1998), а запираательных мышц моллюсков с явлением «catch» (Shelud'ko et al., 2007).

Данных о составе и свойствах тонких нитей гладких мышц моллюсков очень немного, и они противоречивы. Так, изначально считалось, что в мышцах моллюсков тропонина нет (Kendrick-Jones, Lehman, 1970; Lehman, Szent-Györgyi, 1972). Однако, в последствии, в тонких нитях некоторых двустворчатых моллюсков, а именно гребешков, было найдено небольшое количество белков,

схожих по молекулярному весу с компонентами I и C тропонина (Lehman, Szent-Györgyi, 1975). Вскоре, из поперечнополосатой мышцы гребешка *Argopecten irradians* удалось выделить белок, похожий на тропонин I (Goldberg, Lehman, 1978). Этот белок оказался, как и тропонин I позвоночных, основным белком. Напоминал он тропонин I позвоночных и по влиянию на АТФазную активность актомиозина. Кроме того, комплекс этого тропониноподобного белка с тропонинами T и C кролика оказался способен придавать Ca^{2+} -регулируемость актомиозину (Goldberg, Lehman, 1978). Два года спустя из той же мышцы был получен белок, охарактеризованный как тропонин C (Lehman et al., 1980). Белок оказался способен снимать ингибирование актин-миозинового взаимодействия тропонином I гребешка. Денситометрия, проведенная авторами, показала, что содержание компонентов I и C в мышце гребешка *Argopecten irradians*, при условии существования в ней эквимольного количества функционально полноценного тропонина T, достаточно для Ca^{2+} -регуляции сокращения. Поиски тропонина в мышцах других гребешков оказались успешны в разной степени: в некоторых из них удалось найти похожие по молекулярному весу белки, в других – нет (Lehman, 1981).

Дальнейшее исследование мышц гребешков (*Patinopecten yessoensis* и *Chlamys nipponensis akazara*) позволило получить все три компонента тропонина двустворчатых моллюсков и охарактеризовать их влияние на АТФазную активность актомиозина, физико-химические свойства (растворимость, сродство к ионообменным смолам) и соотношение в нативном комплексе, оказавшееся эквимольным (Ojima, Nishita, 1986, 1992). Тропонины этих двух гребешков показали очень близкий аминокислотный состав и взаимозаменяемость, что говорит об идентичных свойствах тропоинов этих двух видов гребешков.

Подход, разработанный для выделения тропоинов из поперечнополосатых мышц гребешков *Patinopecten yessoensis* и *Chlamys nipponensis akazara*, был успешно применен и для получения тропоина из гладких мышц этих моллюсков (Ojima, Nishita, 1986; Nishita et al., 1997). Выделенный из гладких мышц тропоин,

как оказалось, значительно отличается по молекулярному весу компонентов от тропонина поперечнополосатых мышц гребешков. Тем не менее, сравнение гладкомышечных тропонинов с тропонинами из поперечнополосатых мышц гребешков показало очень близкий аминокислотный состав всех четырех белков. Таким образом, неудивительно, что окрашивание препарата тропонина гладкой мышцы гребешка *Patinopecten yessoensis* антителами к тропонину из поперечнополосатой мышцы гребешка *Chlamys nipponensis akazara* оказалось высокоспецифичным.

Влияние компонентов тропонина из гладких мышц обоих гребешков на АТФазную активность актомиозина также оказалось идентичным.

Были определены и первичные последовательности компонентов тропонина из поперечнополосатой мышцы гребешков (Inoue et al., 1996; Ojima et al., 2001; Tanaka et al., 1998).

Все эти данные говорят о том, что и в гладкой, и в поперечнополосатой мышцах гребешков Ca^{2+} -регуляция осуществляется тропонином. В отношении же механизма регуляции тонких нитей гладких запираательных мышц прочих групп двустворчатых моллюсков нет такой уверенности: с одной стороны, в некоторых других группах двустворчатых моллюсков были обнаружены белки, похожие на тропонин по подвижности (Lehman, 1981). С другой стороны, ни выделить их, ни охарактеризовать их содержание в мышцах не удавалось.

Кроме того, в составе белков тонких нитей из гладких мышц мидии и устрицы идентифицирован кальдесмон-подобный белок (Bennett, Marston, 1990). На основании этого авторы считают, что Ca^{2+} -чувствительность тонких нитей моллюсков имеет кальдесмоновую природу, как и в гладких мышцах позвоночных. Обнаруженные же ранее в мышцах гребешков компоненты тропонина, на взгляд авторов, являются продуктами протеолитического распада кальдесмона. Последнему предположению противоречит то, что позднее Nishita с соавторами более подробно охарактеризовали компоненты тропонина из гладкой мышцы гребешка (Nishita et al., 1997), в том числе с использованием антител к

кроличьим компонентам тропонина. В результате Нишита с соавторами (Nishita et al., 1997) заключили, что обнаруженный ими тропонин не является результатом протеолитического распада. При этом авторы допускают, что гладкие мышцы гребешков могут быть и исключением среди гладких мышц двустворчатых моллюсков.

Действительно, на сегодняшний день, тропонин двустворчатых моллюсков удалось выделить лишь из мышц двух видов гребешков (иных примеров выделения тропонинов из гладких мышц моллюсков в литературе мы не обнаружили). Поэтому складывается впечатление, что Ca^{2+} -регуляция тонких нитей гребешков осуществляется тропонином, а представителей других отрядов двустворчатых моллюсков – кальдесмоном.

Вместе с тем, стоит отметить, что антитела к кальдесмону, которые использовали в работе Беннет и Марстон (Bennett, Marston, 1990), были того же происхождения (Lehman antibody), что и в работе Бартеги с соавторами (Bartegi et al., 1990), в которой авторы изолировали кальдесмон-подобный белок из поперечнополосатой части аддуктора гребешка. Ca^{2+} -чувствительный комплекс из этой части аддуктора хорошо исследован и, без сомнения, является тропонин-тропомиозиновым (Chantler, 2006; Goldberg, Lehman, 1978; Lehman, 1981; Ojima, Nishita, 1986, 1992). Возможно, что антитела к гладкомышечному кальдесмону позвоночных способны реагировать не только с кальдесмоном, но и с другими белками моллюсков. На такую возможность указывают результаты работы Шизмадия с соавторами (Csizmadia et al., 1994). Авторы выделили из гладких мышц моллюсков, как они считали, кальдесмон-подобный белок, реагирующий с кальдесмоновыми антителами. Позже оказалось, что этот белок, миород, не имеет отношения к кальдесмону (Shelud'ko et al., 1998; Yamada et al., 2000). Миород же часто является примесью в препаратах тонких нитей.

Ситуация стала еще более сложной после того, как в регулируемых тонких нитях из запирающей мышцы мидии *Crenomytilus grayanus*, и в этой мышце в целом, кальдесмон нами не был найден (Dobrzhanskaya et al., 2013). Заметим, что

ранее в запирающей мышце другого двустворчатого моллюска, *Spisula sachalinensis*, не был найден и тропонин (Chiba et al., 1992). Не исключено, что в тонких нитях запирающих мышц присутствует Ca^{2+} -регуляторная система, отличная от «тропониновой» и «кальдесмоновой».

Таким образом, нет оснований сомневаться в том, что гладкие мышцы моллюсков наряду с миозин-ассоциированной Ca^{2+} -чувствительной системой обладают и актин-ассоциированной системой, однако организация этой системы и ее функциональный смысл остаются неясными.

1.3.2. Ca^{2+} -регуляция тонких нитей и запирающий тонус

Наш интерес к Ca^{2+} -регуляции тонких нитей гладких мышц моллюсков связан со способностью твитчина, регулятора запирающего тонуса этих мышц, взаимодействовать с тонкими нитями.

Твитчин, как было сказано выше, это белок толстых нитей, способный образовывать сшивки между толстыми и тонкими нитями (твитчиновая гипотеза «catch»), лежащие в основе запирающего сокращения. Образует он их благодаря способности взаимодействовать с актином (Shelud'ko et al., 2004). Эксперименты показали, что, при образовании сшивки с тонкими нитями, твитчин ингибирует активирование тонкими нитями Mg^{2+} -АТФазы миозина. Осуществляет это твитчин в присутствии Ca^{2+} , невзирая на регуляторную систему тонких нитей. При этом уровень активности Mg^{2+} -АТФазы миозина падает до значений, характерных для ингибирования, развиваемого регуляторной системой тонких нитей в отсутствие Ca^{2+} , но не ниже (Shelud'ko et al., 2007). Объясняется это тем, что твитчин «замораживает» тропомиозин в блокирующей позиции на поверхности тонких нитей, и ингибирует тем самым переход миозина от слабого взаимодействия с актином к сильному (Avrova et al., 2010).

Похоже, что, твитчиновые мостики не только несут силовую нагрузку, удерживая мышцу моллюсков в сокращенном состоянии, но и способны «отключать» актин-миозиновое взаимодействие тонких нитей с толстыми.

Осуществляется это, по-видимому, посредством той же актин-ассоциированной регуляторной системы, которая ингибирует актин-миозиновое взаимодействие в отсутствие кальция (Shelud'ko et al., 2007).

Функциональная необходимость способности твитчина «отключать» взаимодействие, на наш взгляд, продиктована тем, что перед развитием запирающего сокращения необходимо отключить энергозатратное миозиновое взаимодействие с тонкими нитями.

Данное явление, возможно, входит в круг искомых функций актин-ассоциированной регуляции в мышцах с двойной регуляцией. Его изучение требует от нас установления точного механизма регуляции тонких нитей запирающих мышц моллюсков.

1.4. Возможные механизмы запирающего сокращения

Гладкие мышцы двустворчатых моллюсков знамениты тем, что они могут длительное время поддерживать створки раковины закрытыми без затраты энергии. Это явление описано более 100 лет назад, но интерес к нему не ослабевает, поскольку механизм запирающего тонуса невозможно объяснить в рамках современных представлений о механизмах мышечного сокращения. Выдвинутые в процессе исследования этого явления гипотезы делятся на две группы – «независимые» и «мостиковые». В первом случае имеется в виду, что запирающий тонус устанавливается структурой, не связанной с актин-миозиновым взаимодействием, а во втором случае постулируется, что пассивное натяжение устанавливается той же актин-миозиновой системой в результате образования недиссоциирующих миозиновых мостиков.

Ниже перечислены основные специфические особенности запирающих мышц, которые должны получить объяснение в выдвигаемых гипотезах.

1) Запирающее сокращение не требует затраты энергии (Parnas, 1910) и присутствия ионов кальция (Cornelius, 1980), в отличие от активного сокращения.

2) Механические свойства мышцы в запирательном состоянии близки к свойствам обычной мышцы в нефизиологическом ригорном состоянии.

3) Запирательные мышцы обладают двойной иннервацией – не только холинергической, но и серотонинергической (Lowy, 1953).

4) Толстые нити запирательных мышц содержат большое количество белка парамиозина (Bailey, 1956).

5) Толстые нити запирательных мышц содержат специфический белок миород (Shelud'ko et al., 2001).

6) Толстые нити запирательных мышц содержат гигантский эластичный белок твитчин, входящий в семейство титина (Vibert et al., 1993).

7) Переход запирательных мышц из запирательного в расслабленное состояние коррелирует *in vivo* с фосфорилированием твитчина (Butler et al., 1998).

8) Фосфорилированный твитчин в отличие от дефосфорилированного не взаимодействует с фибриллярным актином (Matusovsky et al., 2011).

9) Белок толстых нитей миород взаимодействует с тонкими нитями и это взаимодействие регулируется ионами кальция и фосфорилированием миорода (Matusovsky et al., 2011).

10) Тонкие нити запирательных мышц содержат большое количество кальпониноподобного белка (Dobrzhanskaya et al., 2010).

Для объяснения механизма запирательного тонуса предложено несколько гипотез. Рассмотрим эти гипотезы, уделяя внимание тому, какие из специфических особенностей запирательных мышц, получают в них объяснение.

1.4.1. «Мостиковая» гипотеза запирательного тонуса

Данные, приведенные в пунктах 1 и 2, позволяют предположить, что в основе запирательного состояния могут лежать жесткие поперечные сшивки («catch»-мостики) между элементами сократительного аппарата. Свойства таких мостиков сходны со свойствами ригорных миозиновых мостиков. Это сходство послужило основанием для выдвижения мостиковой гипотезы запирательного

тонуса (Lowy et al., 1964), предполагающей, что в запирающих мышцах миозиновые мостики могут быть как активными, циклически работающими, так и замкнутыми, как ригорные мостики. Однако эта гипотеза не получила экспериментального подтверждения, более того, недавно было показано, что в состоянии запирающего тонуса миозин не взаимодействует с тонкими нитями (Galler et al., 2010). Следовательно, механизм запирающего тонуса является «независимым», т.е. пассивные «catch»-мостики сосуществуют с активными миозиновыми мостиками.

1.4.2. «Парамиозиновая» гипотеза запирающего тонуса

В количественном отношении самые большие различия между запирающими и другими мышцами связаны с содержанием парамиозина, которое доходит в запирающих мышцах до 50–60% (пункт 4). Было показано, что в запирающем состоянии образуются сшивки между толстыми нитями, что должно приводить к образованию огромного агрегата, противодействующего расслаблению мышечной клетки. На этом основании была предложена «независимая» гипотеза механизма запирающего тонуса (Ruegg, 1961). Следует сказать, что парамиозин присутствует во многих, если не во всех мышцах беспозвоночных, независимо от их типа. Например, он входит в состав, как запирающих мышц двустворчатых моллюсков, так и в состав совершенно несходных с ними летательных мышц насекомых. Однако содержание парамиозина в вышеупомянутых мышцах очень разное, в мышцах моллюсков оно многократно больше. Есть прямая зависимость между количеством парамиозина в мышце и силой, которую мышца развивает (Levine et al., 1976). Запирающие мышцы являются ярким примером такой зависимости: среди исследованных на сегодня мышц они являются рекорсменами, как по содержанию парамиозина, так и по способности развивать очень высокое напряжение. По всей вероятности, такая зависимость опосредована размером толстых нитей. Чем больше размер толстой нити, тем большее количество тонких нитей имеет возможность

взаимодействовать с толстой нитью и, соответственно, тем большее количество миозиновых мостиков суммируют свои усилия при сокращении. В более поздних работах образование парамиозиновых сшивок не было подтверждено (Bennett, Elliott, 1989). По всей вероятности, парамиозин, скорее всего, лишь обеспечивает развитие высокого напряжения запираТЕЛЬными мышцами, но не лежит в основе запираТЕЛЬНОГО сокращения.

1.4.3. «Твитчиновая» гипотеза запираТЕЛЬНОГО тонуса

Серотонинергическая иннервация (пункт 3) – единственная особенность запираТЕЛЬНОЙ мышцы, для которой была однозначно установлена структурно-функциональная связь. Возбуждение серотонинергического нерва активирует цАМФ зависимую киназу А и приводит к расслаблению мышцы, находящуюся в запираТЕЛЬНОМ состоянии. Считается, что расслабление является результатом фосфорилирования твитчина (пункт 7) (Butler et al., 1998). Механизм этого расслабления оказался очень простым и красивым (пункт 8): *in vitro* было показано, что дефосфорилированный твитчин способен взаимодействовать с фибриллярным актином, в отличие от фосфорилированного твитчина (Shelud'ko et al., 2004). То есть взаимодействие между твитчином и актином регулируется фосфорилированием твитчина *in vitro* таким же образом, как фосфорилирование твитчина *in vivo* регулирует запираТЕЛЬНЫЙ тонус мышц двустворчатых моллюсков. На этом основании была предложена «твитчиновая» гипотеза о механизме запираТЕЛЬНОГО тонуса, которая постулирует наличие пассивных «твитчиновых» мостиков между толстыми и тонкими нитями наряду с активными «миозиновыми» мостиками (Shelud'ko et al., 2004, 2007). В настоящее время эта гипотеза является общепринятой (Butler, Siegman, 2010; Butler et al., 2006; Funabara et al., 2005, 2009; Galler et al., 2005, 2010; Hooper et al., 2008; Yamada et al., 2013).

«Твитчиновая» гипотеза объясняет не только природу «catch»-мостиков, но и способ координации активных и пассивных мостиков. Дефосфорилированные

твитчиновые мостики, по-видимому, не только несут силовую нагрузку, но и способны «отключать» взаимодействие тонких и толстых нитей так, как это происходит при расслаблении мышцы. Для механизма координации было предложено два объяснения. Это конкуренция миозина и твитчина за одни и те же места связывания с тонкой нитью (Butler et al., 2006; Funabara et al., 2007), в результате которой с тонкой нитью одновременно могут взаимодействовать либо «тянущие» миозиновые мостики, либо «удерживающие» твитчиновые. Другое объяснение состоит в том, что «отключение» мостиков осуществляется посредством той же регуляторной системы тонких нитей, которая ингибирует актин-миозиновое взаимодействие в отсутствие кальция (Shelud'ko et al., 2007). Возможно, что данное явление и входит в круг искомых «вспомогательных» функций тонконитевой регуляции. Действительно, дефосфорилированный твитчин, введенный в теневое скелетно-мышечное волокно, ингибирует переход миозинового мостика из слабосвязанной формы в сильносвязанную и при этом «замораживает» тропомиозин в блокирующей позиции на поверхности тонких нитей (Avrova et al., 2010).

Нет сомнения в том, что твитчин вовлечен в механизм запирающего сокращения, однако не является очевидным, что он не только необходим, но и достаточен для реализации запирающего тонуса. Дело в том, что содержание твитчина в мышце намного меньше, чем других белков, которые также могут потенциально участвовать в механизме этого явления. Поэтому возможно, что твитчин является преимущественно регуляторным белком (Shelud'ko et al., 2007). Было показано, что введение твитчина моллюсков в волокно скелетных мышц позвоночных приводит к появлению признаков «catch»-состояния, исчезающих при фосфорилировании твитчина, однако количественно эти признаки выражены слабо (Avrova et al., 2009). Показано, что твитчин является механосенсором – растяжение молекулы активирует киназный домен молекулы (Butler, Siegman, 2011). Поскольку твитчин локализован на поверхности толстых нитей, которые растягиваются при развитии силы мышцей (Tajima et al., 2008), видимо, именно

это растяжение активирует твитчин-киназу. Известно также, что *in vitro* твитчин способен фосфорилировать N-концевую часть молекулы миорода (Matusovsky et al., 2010), который также локализован на поверхности толстых нитей и является потенциальным участником запирающего тонуса. Возможно, что такое фосфорилирование происходит и *in vivo* и имеет регуляторное значение.

1.4.4. «Миородовая» гипотеза запирающего тонуса

Миород, как уже было сказано выше, состоит из стержневой части, аналогичной стержневой части миозина, и уникального N-концевого участка. Хотя полимеризация миорода осуществляется благодаря его стержневой части, именно N-концевой участок определяет особенности растворимости миорода и его полимеризации (Матусовский и др., 2005).

Этот участок миорода может быть фосфорилирован MLCK-подобным доменом твитчина (Matusovsky et al., 2010). Показано, что фосфорилирование N-концевого домена миорода в составе «природного» комплекса поверхностных белков толстых нитей приводит к существенному увеличению АТФазной активности актомиозина (Matusovsky et al., 2010). Это является прямым свидетельством влияния миорода на актин-миозиновое взаимодействие. С другой стороны, дефосфорилирование N-концевого участка миорода в присутствии кальция приводит к тому, что миород становится способен взаимодействовать с актином (Matusovsky et al., 2011). На основании этого можно предположить, дефосфорилированный миород способен образовывать «catch»-сшивку между толстыми и тонкими нитями, регулируемую фосфорилированием и концентрацией Ca^{2+} .

1.4.5. «Кальпониновая» гипотеза запирающего тонуса

Кальпонин – поверхностный белок тонких нитей гладких мышц как позвоночных, так и моллюсков. Функция этого белка в запирающих мышцах моллюсков не ясна. Однако, повышенное содержание его в этих мышцах (Dobrzhanskaya et al., 2013; Marston, 1991; Nishida et al., 1990) наводят на мысль,

что неизвестная функция кальпонины должна быть выражена сильнее в запирающих мышцах моллюсков, чем в гладких мышцах позвоночных.

Такой функцией может являться характерное для обоих типов мышц состояние, пребывая в которых мышца поддерживает сокращение с низкими затратами энергии. У моллюсков, как известно, это состояние называется «catch», а у позвоночных «latch».

Задача поддержания мышцы в сокращенном состоянии, подразумевает достижение энергонезатратной фиксации расстояния между противостоящими Z-телами гладкой мышцы. Эта задача, очевидно, по-разному решена в гладких мышцах позвоночных и моллюсков. Во всех гипотезах, объясняющих запирающий тонус моллюсков, фиксация расстояния между противостоящими Z-телами достигается за счет сшивок, формируемых между толстыми и тонкими нитями. При этом самый простой способ фиксации сокращенного состояния мышцы – это «сшить» встречные тонкие нити. Возможно, что именно этот механизм фиксации реализован в гладких мышцах позвоночных. Возможность существования такого решения задачи нами показана благодаря обнаружению способности кальпонины латерально агрегировать *in vitro* тонкие нити (Dobrzhanskaya et al., 2013).

Возможно, что данный способ поддержания клетки в сокращенном состоянии имеет место и в запирающих мышцах моллюсков. Наше предположение основывается на том, что соотношение между количеством тонких и толстых нитей в этих мышцах равно 17:1. Такое соотношение намного превышает возможности толстых нитей связать все тонкие нити (Sobieszek, 1973). На наш взгляд, «лишние» тонкие нити относятся к цитоскелетному домену. Возможно, что для тонких нитей этого домена характерна фиксация благодаря поперечным кальпониновым сшивкам тонких нитей.

Таким образом, мы предполагаем, что запирающий тонус моллюсков – это явление общеклеточного масштаба, затрагивающее как цитоскелетный, так и сократительный домен.

При этом цитоскелетную часть формирования «catch» можно описать следующим образом: при стимуляции клетки к сокращению происходит переход кальпонины с поверхности цитоскелетных тонких нитей (Parker et al., 1998) в кальпониновые депо, располагающиеся в околосаркомерном пространстве. Это «расширяет» актиновый цитоскелет, способствуя свободному процессу сокращения. По завершении сокращения, и переходу клетки в «catch», кальпонин мигрирует обратно, сшивая тонкие нити цитоскелетного домена. В результате происходит стабилизация цитоскелета в новом, сокращенном состоянии. Не исключено, также, что кальпонин образует сшивки не только между тонкими нитями цитоскелетного, но и сократительного домена. Вышеописанный процесс дополняет, а не заменяет события, которые могут происходить в сократительном домене с участием твитчина, миозина и миорода.

В четырех из пяти вышерассмотренных гипотез о механизме запирающего тонуса предполагается участие в этом явлении тонких нитей. В мостиковой, «твитчиновой» и «миородовой» гипотезах эти белки образуют регулируемые сшивки между толстыми и тонкими нитями, а в «кальпониновой» гипотезе кальпонин сшивает тонкие нити. Кроме того, во всех гипотезах предполагается, что именно тонкие нити суммируют и передают запирающую силу на Z-тела и далее на наружную мембрану. Следовательно, белки, образующие сшивки, наряду с миозином являются переменными составляющими тонких нитей. Они могут взаимодействовать с постоянными поверхностными белками, модифицируя функцию друг друга. В первую очередь это относится к Ca^{2+} -регуляторному комплексу. Поскольку функция актин-связанной регуляции в мышцах моллюсков неизвестна, не исключено, что эта регуляция принимает участие в запирающем тонусе.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Выделение сократительных белков из скелетных мышц кролика

Ткани скелетных мышц кролика были предоставлены вивариумом Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук (Владивосток). Все манипуляции были одобрены Комитетом защиты животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (Протокол № 21 от 08.09.2014).

2.1.1.1. Выделение миозина скелетных мышц кролика

Миозин выделяли по методу Перри (Perry, 1955), модифицированному Тартаковским (1978). Срезанные спинные мышцы кролика помещали в молотый лед. Очищенные от соединительной и жировой ткани мышцы пропускали два раза через предварительно охлажденную мясорубку с диаметром отверстий не более 2 мм. Мышечный фарш взвешивали и экстрагировали трехкратным объемом раствора, содержащего (мМ): 300 KCl, 100 K₂HPO₄, 10 Na₄P₂O₇, 1 MgCl₂, pH 6.5. Экстракцию проводили 15-20 минут при постоянном перемешивании. Остаток экстракции осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, 10-15 минут.

Надосадочную жидкость фильтровали через стеклянную вату. Миозин осаждали, выливая фильтрат в 14 объемов 5 мМ ЭДТА, pH 6.6-6.8, осторожно перемешивая получаемую смесь. Суспензию оставляли на льду. Через 3 часа надосадочную жидкость декантировали, а оставшуюся густую суспензию центрифугировали при 2000 об/мин, 20 минут. Скорость центрифугирования и его продолжительность должны быть достаточны для того, чтобы осадок не был сильно уплотнен, а в супернатанте не было видно хлопьев. Осадок растворяли

добавлением к нему 3 М КСl, 5 мМ ЭДТА, рН 7.0, до конечной концентрации 0.5 М КСl.

К растворенному осадку добавляли ЭДТА, рН 6.8, до 5 мМ, понижая концентрацию КСl до 0.3 М. Актомиозин из раствора осаждали центрифугированием при 30 000 об/мин, 1 час. К супернатанту, содержащему миозин, добавляли ЭДТА, рН 6.8, до 5 мМ, понижая концентрацию КСl до 0.04 М.

Конечный препарат миозина растворяли в растворе, содержащем 0.5 М КСl и 5 мМ ЭДТА, рН 7.0 и осветляли центрифугированием при 30 000 об/мин, 1 час. Часть препарата хранили на льду, а часть глицеринизировали (50% глицерина) и хранили при -40°C .

2.1.1.2. Выделение актина скелетных мышц кролика

Для получения актина использовали остаток экстракции миозина (Shelud'ko et al., 2007). Мышечный остаток после экстракции раствором Хассельбаха–Шнейдера (мМ): 600 КСl, 10 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 ЭГТА, 2 MgCl_2 , 0.5 фенилметилсульфонилфторида, 0.5 ДТТ, 100 фосфатного буфера (рН 6.5) дважды отмывали, суспендируя в 10 объемах воды и осаждая при 5000 об/мин 10 минут. Затем остаток дважды отмывали в 5 объемах 5 мМ NaHCO_3 (при 5000 об/мин 10 минут). Далее осадок последовательно обрабатывали холодным ацетоном (8, 4, 2 и 1 объемом, соответственно). Остаток отжимали через два слоя марли и сушили в вакууме до тех пор, пока не исчезал запаха ацетона. Готовый ацетонизированный порошок хранили при -25°C . В отличие от обычного порошка (Spudich, Watt, 1971), порошок, приготовленный вышеописанным способом, практически не содержит тропомиозин и тропонин, которые являются примесью в препаратах актина (Хайтлина, 1978).

Актин экстрагировали из ацетонового порошка раствором Риса–Янга, содержащим (мМ): 0.2 CaCl_2 , 0.5 АТФ, 0.5 ДТТ (рН 7.5) (Rees, Young, 1967). Экстракцию проводили дважды. Первая экстракция проходила на льду, в течение

15 минут, в 20 объёмах раствора Риса–Янга, при постоянном перемешивании. Экстракт получали центрифугированием при 5000 об/мин, 10 минут. Экстракт фильтровали через фильтр Шотта. Осадок в течение 10 минут повторно экстрагировали 10-тью объемами раствора и центрифугировали при 5000 об/мин, 10 минут. Супернатант (второй экстракт) фильтровали через фильтр Шотта и объединяли с первым экстрактом. Полимеризацию глобулярного актина в объединённом экстракте инициировали добавлением концентрированных растворов KCl и MgCl₂ до 75 мМ и 2 мМ, соответственно. Спустя 2 часа к полимерному актину (Ф-актину) добавляли 3 М KCl до 0.6 М и осаждали при 110000 g, 90 минут. Осадки суспендировали в течение ночи на льду, в минимальном объеме раствора, содержащего (мМ): 75 KCl, 0.2 ЭГТА, 0.5 MgCl₂, 0.5 ДТТ, 2 NaN₃, 10 имидазол–HCl (pH 7.0) и осветляли при 40 000 g в течение 30 минут (Shelud'ko et al., 2007).

2.1.1.3. Выделение тропомиозина скелетных мышц кролика

Тропомиозин кролика из экстракта Хассельбаха–Шнейдера осаждали кристаллическим сульфатом аммония (СА), в пределах 40–60% насыщения. Фракцию 40-60% СА растворяли в минимальном объеме раствора для суспендирования актина, и ставили на диализ против этого же раствора. По окончании диализа фракцию осветляли 14000 об/мин, 30 минут. К супернатанту добавляли концентрированный KCl до 0.5–1.0 М, и осаждали тропомиозин изоэлектрически согласно методу получения, описанному в литературе (Bailey, 1948).

2.1.2. Выделение сократительных белков из запирающей мышцы мидии

Мидии *Crenomytilus grayanus* были предоставлены водолазной службой Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук.

2.1.2.1. Выделение тонких нитей запирающей мышцы мидии

Тонкие нити выделяли из запирающей мышцы мидии Грея согласно ранее описанной методике (Dobrzhanskaja et al., 2013) с некоторыми модификациями. Задние аддукторы мидии Грея срезали с раковины и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 10 объемах экстрагирующего раствора, содержащего (мМ) 75 KCl, 5 MgCl₂, 2 ЭГТА, 0.1 фенолметилсульфонилфторида, 0.5 ДТТ, 2.5 мкг/мл леупептина, 25 имидазол–HCl (pH 6.1–6.2). Остаток экстракции удаляли центрифугированием при 10 000 об/мин, 30 минут. Экстракт осветляли при 40000 g, 30 минут. Все вышеперечисленные процедуры проводились при температуре 4°C. Затем температуру экстракта повышали до 25°C и тонкие нити осаждали при 110 000 g, в течение 90 минут. Осадки, содержащие тонкие нити, суспендировали в растворе (мМ): 75 KCl, 2 MgCl₂, 0.2 ЭГТА, 2 NaN₃, 0.5 ДТТ, 25 имидазол–HCl (pH 6.5) и пропускали через стеклянный фильтр. Выход тонких нитей составлял около 20 мг на грамм исходной мышцы.

2.1.2.2. Выделение «миофибрилл» запирающей мышцы мидии

Задние аддукторы мидии Грея (100 г) измельчали скальпелем и помещали в 300 мл раствора, содержащего (мМ): 75 NaCl, 2 MgCl₂, 2 ЭГТА, 3 NaN₃, 0.5 фенолметилсульфонилфторида, 1 ДТТ, 5 мкг/мл леупептина, 0.1 мг/мл ингибитора трипсина, 20 фосфатного буфера, pH 6.2. К полученной взвеси добавляли 300 мл глицерина. Мышцы выдерживали в растворе в течение суток на льду при постоянном перемешивании. Мышечную взвесь доводили до объема 1 литр отмывающим раствором, содержащим (мМ): 75 NaCl, 0.5 ЭГТА, 2 MgCl₂, 5 меркаптоэтанол, 10 фосфатного буфера, pH 6.2. Разбавленную взвесь в два приема гомогенизировали на высокоскоростном гомогенизаторе (POLYTRON PT 2500 rpm) при скорости 5000 об/мин в течение 10 минут, с остановками по одной минуте для очистки диспергатора. К гомогенату добавляли 3 объема отмывающего раствора. Полученную суспензию осаждали при 4000 об/мин, в течение 20 минут. Осадок суспендировали в двух литрах отмывающего раствора,

а затем центрифугировали при 4000 об/мин, 20 минут. Полученный осадок суспендировали в 1 литре отмывающего раствора и центрифугировали при 4000 об/мин, 30 минут. Из остатка отмывки (так называемых, «миофибрилл» мидии) были выделены все интересующие нас белки.

2.1.2.3. Выделение миозина запирательной мышцы мидии

Миозин получали из фракции «миофибрилл» мидии. Экстракцию миозина проводили в пяти объемах раствора, содержащего (мМ): 500 KCl, 1 ЭГТА, 5 АТФ, 5 MgCl₂, 0.3 фенилметилсульфонилфторида, 0.6 ДТТ, 2 NaN₃, 0.1 мг/мл ингибитора трипсина, 50 фосфатного буфера, рН 6.0. Экстракцию проводили в течение 20 минут с постоянным перемешиванием. Остаток экстракции удаляли центрифугированием при 4500 об/мин, 40 минут. Полученный экстракт фильтровали через стеклянную вату.

К экстракту добавляли MgCl₂ до 20 мМ и Трис–HCl до рН 7.5. Экстракт фракционировали насыщенным сульфатом аммония (СА), рН 7.2, на три части: 0–33% СА – фракция, обогащенная актином, 33–43% СА – фракция миорода и твитчина, 43–65% СА – фракция миозина и тропомиозина. Скорость добавления сульфата аммония к экстракту составляла 18 мл/мин. Во время добавления сульфата аммония, значение рН (7.5) поддерживали с помощью 1 М Трис–HCl.

Фракцию 43–65% СА, содержащую миозин, растворяли в 50 мл раствора, содержащего (мМ): 3000 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 ЭГТА, 5 меркаптоэтанол, 1 NaN₃, 20 фосфатного буфера, рН 6.5, и диализовали против этого раствора. Диализат осветляли 1 час при 100 000 g. Осветленный диализат разбавляли 7 объемами раствора, содержащего 1 мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ДТТ. Затем разбавленный диализат центрифугировали 15 минут при 5000 об/мин. Получившийся в результате супернатант может быть использован для получения тропомиозина изоосаждением, как описано в разделе 2.1.2.5. Осадок дважды промывали и осаждали раствором 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ДТТ, 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида, 1 мМ NaN₃, 50 мМ Трис–HCl, рН 7.0. Осадок

растворяли в 20 мл этого раствора добавлением 3 М КСl до 0.5 М КСl. Полученный таким образом миозин осветляли ультрацентрифугированием при 100000 g, 2 часа.

Часть препарата хранили на льду, другую глицеринизировали (50% глицерина) и хранили при -40°C .

2.1.2.4. Выделение «природного» актина запирающей мышцы мидии

Для получения актина используется 0-33% сульфатно-аммонийная фракция миозинового экстракта, полученного из ригоризованной мышцы.

Фракцию 0-33% СА диализовали против трех смен раствора, содержащего (мМ): 500 КСl, 2 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭГТА, 5 мМ меркаптоэтанол, 1 мМ NaN₃, 20 мМ имидазол-НСl, рН 7.0. К готовому диализату добавляли 1 мМ АТФ и 0.5 мМ Тритона X-100, перемешивали 20 минут и осветляли 30 минут, при 14 000 об/мин. Осветленную фракцию разбавляли до 55 мл диализным раствором и центрифугировали 2 часа, при 100000 g. Осадок суспендировали на льду в 20 мл раствора 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭГТА, 2 мМ NaN₃, 2 мкг/мл леупептина, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 2 мМ ДТТ, 25 мМ имидазол-НСl, рН 7.0 до гомогенности при постоянном перемешивании. Белковый раствор осветляли 30 минут, при 14000 об/мин.

В ряде случаев «природный» Ф-актин мидии получали из «миофибрилл» мидии. Для этого, к осадку «миофибрилл» во льду добавляли 450 мл экстрагирующего раствора, содержащего (мМ): 75 КСl, 5 MgCl₂, 5 ЭГТА, 15 АТФ, 5 пиррофосфата натрия, 0.5 ДТТ, 0.1 фенилметилсульфонилфторида, 2.5 мкг/мл леупептина, 10 имидазол-НСl, рН 7.0. Экстракцию проводили на льду, 60 минут, при интенсивном механическом перемешивании. Остаток экстракции удаляли центрифугированием 7000 об/мин, 30 минут. Полученный экстракт тонких нитей ультраосветляли 40 минут, при 60000 g. Затем из ультраосветленного экстракта осаждали комплекс актина и тропомиозина (146000 g, 3 часа). Осадки суспендировали до гомогенности в 70 мл экстрагирующего

раствора, с добавлением ДТТ до 2 мМ. Суспендирование проводилось на льду. К гомогенной суспензии добавляли концентрированный раствор KCl до 0.6 М, после чего суспензию оставляли перемешиваться на магнитной мешалке на 30 минут. Диссоциировавшие друг от друга актин и тропомиозин разделяли центрифугированием при 230000 g, 2 часа. Ультрасадки, содержащие фибриллярный актин, суспендировали на льду в минимальном объеме раствора для суспендирования актина, содержащего (мМ): 75 KCl, 0.2 ЭГТА, 0.5 MgCl₂, 0.5 ДТТ, 2 NaN₃, 10 имидазол-HCl (pH 7.0), и ставили на диализ против этого же раствора. По окончании диализа актин осветляли в течение 30 минут при 146000 g. Полученный таким образом фибриллярный актин можно хранить некоторое время на льду, однако для длительного хранения необходима лиофилизация в присутствии сахарозы.

2.1.2.5. Выделение тропомиозина запирающей мышцы мидии

Тропомиозин мидии может быть получен из ультрасупернатанта осаждения фибриллярного актина (см. предыдущий раздел). Для этого к ультрасупернатанту во льду добавляли 3 М KCl до 1 М, и посредством 1 М HCl подводили pH до 4.7. После формирования хлопьев тропомиозин осаждали при 5000 об/мин, 20 минут.

К осадку тропомиозина добавляли 80 мл ледяного бидистиллята и медленно поднимали pH до 5.5–6.0. В этом интервале наблюдалось внезапное уменьшение мутности раствора, свидетельствующее о растворении тропомиозина. Спустя 15 минут тропомиозин осветляли (5000 об/мин, 20 минут).

К осветленному тропомиозину добавляли, перемешивая, 50 мл 3 М KCl и ледяной бидистиллят до 150 мл, после чего повторяли изоосаждение. Получившиеся осадки суспендировали в 10 мл раствора для суспендирования актина и диализовали против трех смен этого раствора. Диализат осветляли 30 минут при 146000 g. Тропомиозин хранили, добавив к нему ДТТ до 2 мМ. Для длительного хранения тропомиозин лиофилизировали или замораживали.

Тропомиозин мидии также получали и из супернатанта осаждения миозина (см. раздел 2.1.2.3.). В этом случае тропомиозин (находящийся в 43 мМ KCl, 1,28 мМ MgCl₂, 0.07 мМ ЭГТА, 0,7 мМ меркаптоэтанола, 0,14 мМ NaN₃, 2,86 мМ фосфатного буфера, рН 6.5 и 0,5 мМ ДТТ) концентрировали при помощи СА до объема 70 мл и переводили диализом в раствор, содержащий (мМ): 600 KCl, 5 MgCl₂, 5 ЭГТА, 15 АТФ, 5 пиродифосфата натрия, 0.5 ДТТ, 0.1 фенилметилсульфонилфторида, 2.5 мкг/мл леупептина, 10 имидазол–HCl, рН 7.0. После этого к нему применяли описанный выше подход для получения тропомиозина из ультрасупернатанта осаждения фибриллярного актина.

2.1.2.6. Выделение фракции тонких нитей мидии, придающей Ca²⁺-

чувствительность синтетическому актомиозину

Ca²⁺-чувствительную фракцию тонких нитей мидии получали либо из «природных» тонких нитей, либо из «миофибрилл». Ниже описано выделение фракции из «миофибрилл».

Осадок, содержащий «миофибриллы» мидии суспендировали в 1 л отмывающего раствора, в котором 20 мМ имидазол–HCl буфер (рН 6.5) был заменен на 50 мМ цитратный буфер (рН 4.9). Получившуюся суспензию центрифугировали 20 минут, при 4000 об/мин. К осадку добавляли 200 мл отмывающего раствора (рН 4.9) и 300 мл двухкратного LiCl-экстрагирующего раствора (0.8 М LiCl, 1 мМ ЭГТА, 6 мМ NaN₃, 2 мМ ДТТ, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 50 мМ цитратного буфера, рН 4.9). Экстракцию проводили в течение 1 часа с перемешиванием и последующим осаждением 10000 об/мин, 20 минут. Полученный экстракт осветляли 146000 g, 30 минут. Осветленный экстракт фракционировали сульфатом аммония в пределах 20–70% насыщения. Фракцию 20–70% растворяли в 20 мл раствора для суспендирования актина: 75 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 0.2 мМ ЭГТА, 2 мМ NaN₃, 0.5 мМ ДТТ, 25 мМ имидазол–HCl (рН 6.5) и диализовали против этого раствора. По окончании диализа фракцию осветляли 146000 g, 30 минут.

2.1.2.7. Получение актин-связывающих белков АВР-19, АВР-20 и АВР-28

Ca²⁺-чувствительную фракцию тонких нитей диализовали против трех смен двадцатикратного объема колоночного буфера (6М urea, 30 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 2 мМ NaN₃, 0.5 мМ ДТТ и 10 мМ Трис–HCl, pH 7.6). По окончании диализа фракцию наносили на колонку (1 x 25см) с DEAE-Sepharose CL6B (Sigma-Aldrich), предварительно уравновешенную колоночным буфером. В ходе промывки колонки колоночным буфером, белки АВР-28, АВР-20 и АВР-19 адсорбировались на смоле, а актиновая примесь – нет (Рисунок 1А). Элюцию проводили в два этапа, линейным повышающимся градиентом KCl 0.03–0.2М, и 0.2–0.35 М. АВР-19 элюировался при ионной силе около 0.35 М KCl. АВР-28 и АВР-20 элюировались вместе, при ионной силе 0.1–0.2 М KCl. Чтобы разделить АВР-28 и АВР-20, использовали смолу CM Sephadex C-50 (Sigma) для проведения катионообменной хроматографии (Рисунок 1Б). Фракции, содержавшие АВР-28 и АВР-20, объединяли и диализовали против колоночного буфера. По окончании диализа, смесь белков АВР-28 и АВР-20 наносили на колонку (1 x 25см) со смолой CM Sephadex C-50. Как и предыдущую, эту колонку элюировали в два этапа: линейным градиентом 0.03–0.175 М KCl (при этом вышел АВР-28 белок), и линейным градиентом 0.175–0.5 М KCl (вышел АВР-20 белок).

Полученный АВР-19 белок диализовали против раствора для суспендирования актина. АВР-20 и АВР-28 белки при физиологической ионной силе (75 мМ KCl) были нерастворимы. Поэтому, их диализовали против раствора, содержавшего (мМ): 150 KCl, 1 MgCl₂, 0.2 ЭГТА, 2 NaN₃, 0.5 ДТТ, 0.5 фенилметилсульфонилфторида, 20 Трис–HCl, pH 7.0.

Для реконструкции комплекса АВР белков, его компоненты смешивали в эквимольной пропорции и диализовали сначала против колоночного буфера, а потом – против раствора для суспендирования актина.

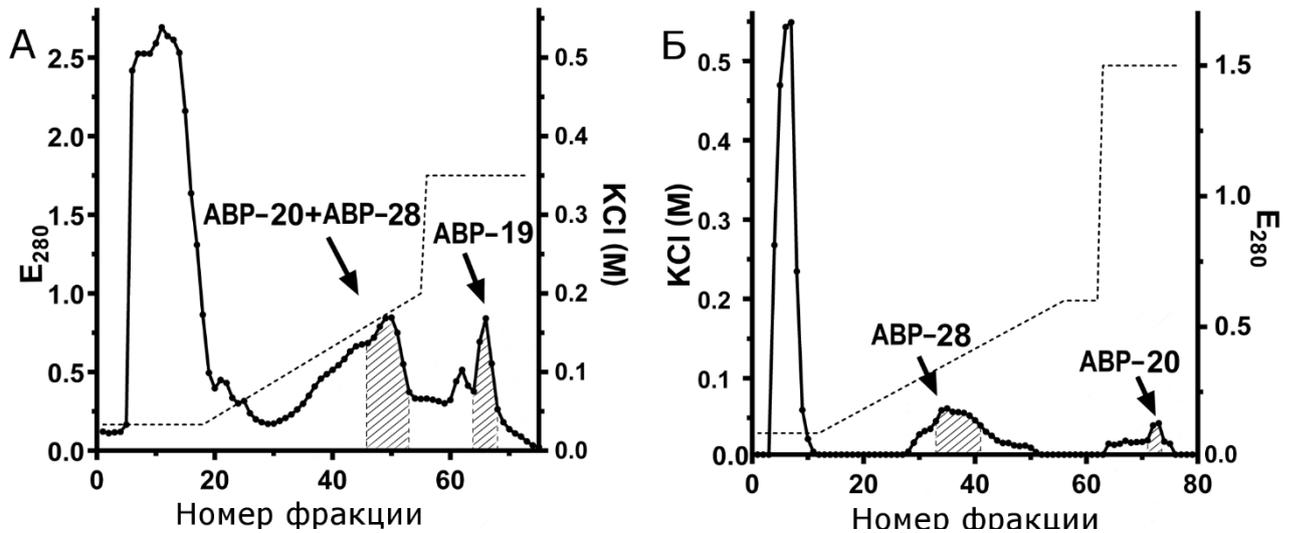


Рисунок 1 – Выделение АВР-белков мидии из Ca^{2+} -чувствительной фракции тонких нитей. А – кривая элюции анионообменной хроматографии; Б – кривая элюции катионообменной хроматографии.

2.2. Методы

2.2.1. Иммуноферментный анализ

Для иммуноферментной идентификации АВР-белков использовали метод Вестерн-блоттинга с некоторыми модификациями. Белковые зоны эквимольной смеси АВР-белков разделяли с помощью ДСН-электрофореза в 13% полиакриламидном геле. Перенос белковых зон на мембрану проводили в Трис–глициновом буфере, содержащем (мМ): 40 глицина, 50 Трис, 20% этанола и 0.1% ДСН. Перенос осуществляли в течение 1.5 часов при силе тока 180 мА и напряжении 110 В. О качестве переноса судили по окраске мембраны 0.1% раствором Понсо С. После переноса белковых зон проводили блокировку мембраны блокирующим буфером, содержащим (мМ): 150 NaCl, 50 Трис–HCl (pH 7.5), 0.1% твин-20, 1% БСА. Отмывку мембраны после переноса, и после каждого шага, проводили используя отмывающий раствор, содержащий (мМ): 150 NaCl, 50 Трис–HCl (pH 7.5). С антителами мембрану инкубировали в течение ночи при 4°C. Инкубацию проводили при следующем разбавлении антител: поликлональные антитела к тропонину С сердечной мышцы человека (Novus biologicals, H00007134-A01) разбавляли 1 : 500, моноклональные антитела к

тропонину I скелетных мышц человека (Novus biologicals, NB200-432) и поликлональные антитела к тропонину T скелетных мышц человека (Novus biologicals, H00007138-B01P) разбавляли 1 : 1000. Разбавляли первичные антитела блокирующем буфером. Со вторичными антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой (KPL, 05-18-06), мембрану инкубировали в течение часа при комнатной температуре, используя разведение 1 : 2500. Вторичные антитела разбавляли буфером, содержащим 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис–HCl (pH 7.5), 0.1% твин-20, 1% обезжиренного сухого молока. Связывание антител выявляли готовым раствором BCIN/NBT (Sigma).

2.2.2. Масс-спектрометрия

Для проведения масс-спектрометрии использовали белковые зоны ПААГ-геля, полученного при ДСН-электрофорезе хроматографически чистых АВР-19,-20,-28 белков. Белковые зоны были вырезаны и переданы для проведения масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия была выполнена на ULTAFLEX II MALDI TOF/TOF масс-спектрометре. Образцы предварительно подвергали трипсинолизу, а затем смешивали с 2,5-дигидро-бензойной кислотой, которая выступает в качестве матрицы для масс-спектрометрии. Поиск белков по набору масс пептидов проводили в онлайн базе данных Mascot с помощью программы Scaffold (version Scaffold-4.3.4, Proteome Software Inc.). При этом использовали следующие параметры поиска: база данных – NCBI, используемый фермент – трипсин, допустимые модификации аминокислотных остатков – окисление метионина и модификацию цистеина пропионамидом, точность определения масс пептидов – 100 ppm. При проведении идентификации допускалось не более одного пропущенного сайта гидролиза на пептид. При поиске гомологичных пептидов использовали уровень статистической значимости $p < 0.05$. Идентификация пептидов считалась верной, если ее достоверность достигала 95%. Идентификация белков считалась верной, если вероятность правильной

идентификации достигала или превышала 99%, при условии, что белок содержал как минимум один идентифицированный пептид.

2.2.3. Формирование актомиозиновых моделей

Актомиозиновый комплекс реконструировали путем смешивания в высокой ионной силе равных по весу количеств актина и миозина. Высокая ионная сила создавалась раствором, содержащим (мМ): 500 KCL, 0.5-2 MgCl₂, 2 NaN₃, 1 ЭГТА (или 0.2 CaCl₂), 20 imidazole-HCl. Затем ионная сила в пробе понижалась до 30 или 75 мМ KCL раствором, содержащим (мМ): 0.5-2 MgCl₂, 2 NaN₃, 1 ЭГТА (или 0.2 CaCl₂), 20 imidazole-HCl. При этом достигалась рассчитанная заранее необходимая концентрация актомиозина в пробе. К сформированному актомиозиновому комплексу добавляли тропомиозин, и, когда это было необходимо, тропонин.

2.2.4. Определение Mg²⁺-АТФазной активности актомиозиновых моделей

К пробе, содержащей актомиозиновую модель, добавляли расчетное количество 50 мМ Mg²⁺-АТФ (до 0.3 мМ). Реакцию останавливали по истечении 10 минут добавлением 50% ТХУ (до 5%). Затем, для удаления из пробы белка, ее центрифугировали 20 минут при 5000 об/мин.

В полученные супернатантах, содержащих наработанный актомиозиновой моделью неорганический фосфат и ТХУ определяли концентрацию PO₄. Для этого использовали метод Фиске-Суббароу (Fiske, Subbarow, 1925), со следующими модификациями: 1) понижение содержания серной кислоты в пробе с 5 до 2.5 Н; 2) использование трихлоруксусной кислоты (ТХУ) с конечной концентрацией 5% вместо 2.5%; 3) приготовление контроля для каждой пробы.

Для расчета концентрации неорганического фосфата в пробе использовали формулу (1):

$$C_{\text{неорг.фосф}} = K \times E_{625}, \quad (1)$$

где $C_{\text{неорг.фосф}}$ – концентрация неорганического фосфата;

K – коэффициент, равный tg угла α калибровочной кривой;

E_{625} – значение экстинкции при длине волны 625 нм.

Для расчета Mg^{2+} -АТФазной активности использовали следующую формулу (2):

$$\text{Mg}^{2+}\text{-АТФазная активность (нмоль/мг/мин)} = (C_{\text{неорг. фосф}}/t_{\text{р-ции}}/C_{\text{миоз.}}) \times 10^{-3}, \quad (2)$$

где $t_{\text{р-ции}}$ – длительность Mg^{2+} -АТФазной реакции;

$C_{\text{миоз.}}$ – концентрация миозина.

2.2.5. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков осуществляли в 13% ПААГ геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Электрофорез проводили по методу Лаемли (1970) с некоторыми модификациями (Шелудько, 1975; Shelud'ko et al., 1999). Состав разделяющего геля, (мМ): 300 Трис, 300 HCl 13% акриламида, 0.125% бис-акриламида, бидистиллированная вода до конечного объема 22.5 мл. После тщательного перемешивания раствора для формирования разделяющего геля, в геле инициировали полимеризацию добавлением 15 мкл ТЕМЕД и 200 мкл 2.5% ПСА. Раствор заливали в сэндвич, представляющий собой две стеклянные пластины (13 x 18 см), между которыми, ограничивая сэндвич по краям, находились спэйсоры – пластиковые полоски, толщиной около 1 мм, шириной 5 мм и длиной 13 см. Залитый гель заполнял сэндвич на $\frac{3}{4}$ объема, так как сверху сэндвич ограничивала широкая пластиковая пластинка препятствовавшая распространению геля по оставшейся $\frac{1}{4}$ сэндвича.

Во время полимеризации разделяющего геля, или ранее, готовили электрофорезные пробы. Пробы представляли собой смесь равных частей раствора для проб, содержащего 8.5М мочевины, 0.25М Трис–HCl (pH 6.8), 4% ДСН, 50 мМ ДТТ, 5 мМ ЭДТА, 150 мкл насыщенного раствора бромфенолового синего, и раствора, содержащего белок. Конечная концентрация белка в пробе составляла 0.5–1.0 мг/мл.

Спустя 20-30 минут, по окончании полимеризации разделяющего геля, в 4 мл раствора концентрирующего геля, содержащего (мМ): 188 Трис, 180 HCl, 4%

акриламида, 0.6% бис-акриламид и 19.35% глицерина, запускали полимеризацию добавлением 5 мкл ТЕМЕД и 45 мкл ПСА. Сэндвич устанавливали вертикально, широкую пластинку заменяли на более узкую, имеющую на стороне обращенной к разделяющему гелю прямоугольные вырезки, служащие для формирования в концентрирующем геле кармашков. Таким образом, между разделяющим гелем и этой пластинкой оказывалась полость, в которую наглаивали шприцем начавший полимеризоваться раствор концентрирующего геля. По окончании полимеризации (20 минут), из сэндвича осторожно, чтобы не повредить образованные концентрирующим гелем кармашки, вынимали верхнюю пластинку. Сэндвич помещали в электрофорезную камеру, заполненную Трис-глицериновым электродным буфером (0.025М Трис и 0.25М глицина). В камеру с полярностью «—» дополнительно добавляли 10 мл 5% ДСН. В кармашки для проб наносили электрофорезные пробы (обычно 10-25 мкл), подслаивая под электродный буфер. Концентрирование проб проводили при токе 20 мА/гель в течение 20 минут. Разделение белков проводили при токе 45 мА/гель. При достижении полосы красителя бромфенолового синего конца геля процесс останавливали, гель извлекали из сэндвича и фиксировали в течение 30 минут, в растворе, содержащем этанол, воду и уксусную кислоту в пропорции 5:4:1. Гели окрашивали 0.2% раствором Coomassie brilliant blue R-250, содержащем 50% этанола и 10% ЛУК, в течение 30 минут, при интенсивном покачивании на шейкере. Краситель отмывали раствором 7% уксусной кислоты до полного исчезновения фоновой окраски.

Типичные электрофореграммы, полученные по данной прописи, приведены на рисунке 2.

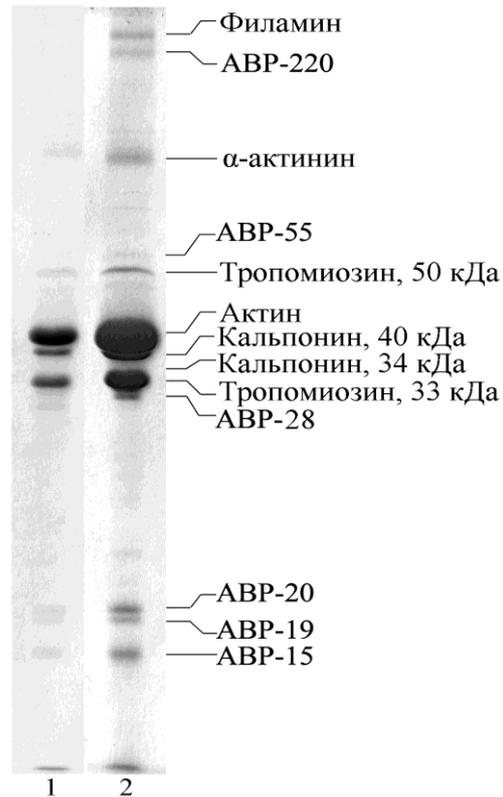


Рисунок 2 – Белковый состав тонких нитей мидии *Crenomytilus grayanus* при двух нагрузках, 1 -10 и 2 - 20 мкл, соответственно. Обозначения: АВР – актин-связывающие белки с указанием их молекулярной массы в кДа.
(По: Dobrzhanskaya et al., 2013).

2.2.6. Денситометрия

Известно, что коэффициенты связывания электрофоретических красителей различными белками могут значительно различаться. Поэтому перед определением относительного содержания актина, тропомиозина и компонентов тропонина в тонких нитях мидии мы провели определение относительных констант связывания этих белков с электрофоретическим красителем. Были использованы хроматографически чистые препараты белков тонких нитей, из которых были приготовлены электрофоретические пробы с различными концентрациями. После проведения стандартного электрофореза полиакриламидные гели были окрашены красителем Coomassie brilliant blue R-

250. Интенсивность окраски белковых зон была определена программой TotalLab TL120 (TotalLab Limited 2013). По результатам были построены линейные зависимости интенсивности окраски белковых зон от количества нанесенного белка (Рисунок 3).

Белок	A	TM	TnT	TnI	TnC
DBC	0.52	1.00	0.56	1.97	0.97

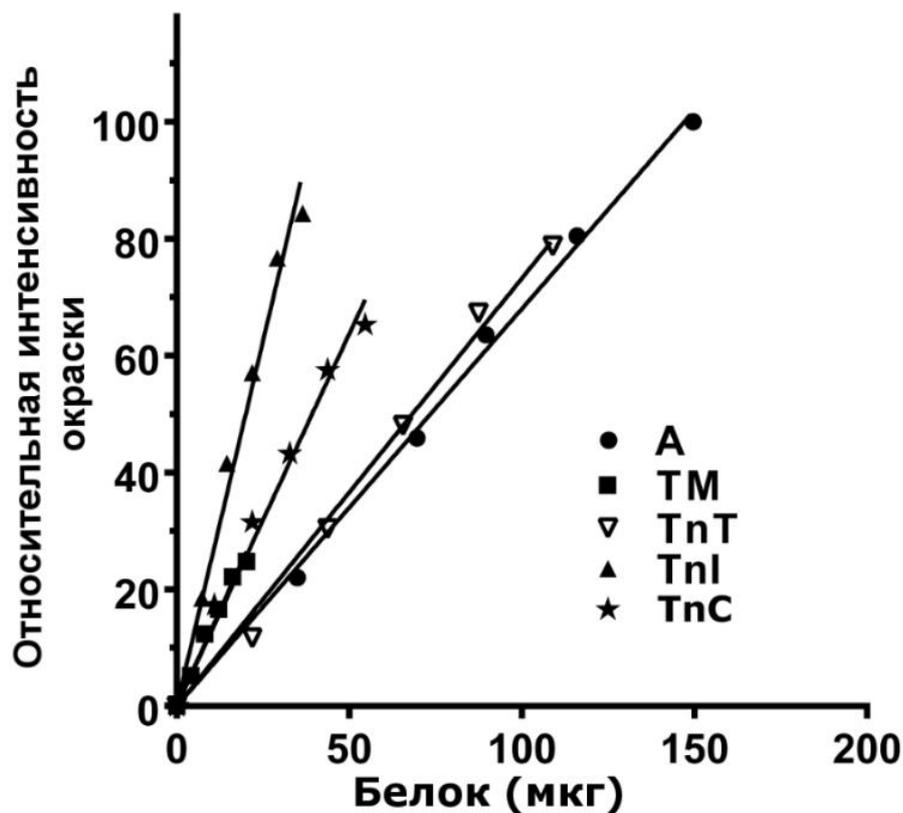


Рисунок 3 – Определение констант связывания красителя Coomassie Brilliant Blue R-250 компонентами тонких нитей мидии.

Обозначения: A – актин; TM – тропомиозин; TnT – тропонин T; TnC – тропонин C; TnI – тропонин I; DBC – константа связывания красителя белком.

Линейные зависимости проходили через ноль и включали 5–8 точек в области концентраций, где сохраняется линейная зависимость между количеством нанесенного белка и интенсивностью окраски. Константы связывания красителя

белками были определены по углу наклона линейных зависимостей (slope), и нормированы по константе связывания красителя тропомиозином (таблица на рисунке 3).

Содержание белков в тонких нитях определяли по электрофореграммам схожим образом. Были приготовлены 16 электрофоретических проб с различными концентрациями тонких нитей в двух диапазонах нагрузок, рассчитанных на построение линейных зависимостей отдельно для тропомиозина и компонентов тропонина, и для актина и тропомиозина (Рисунок 4).

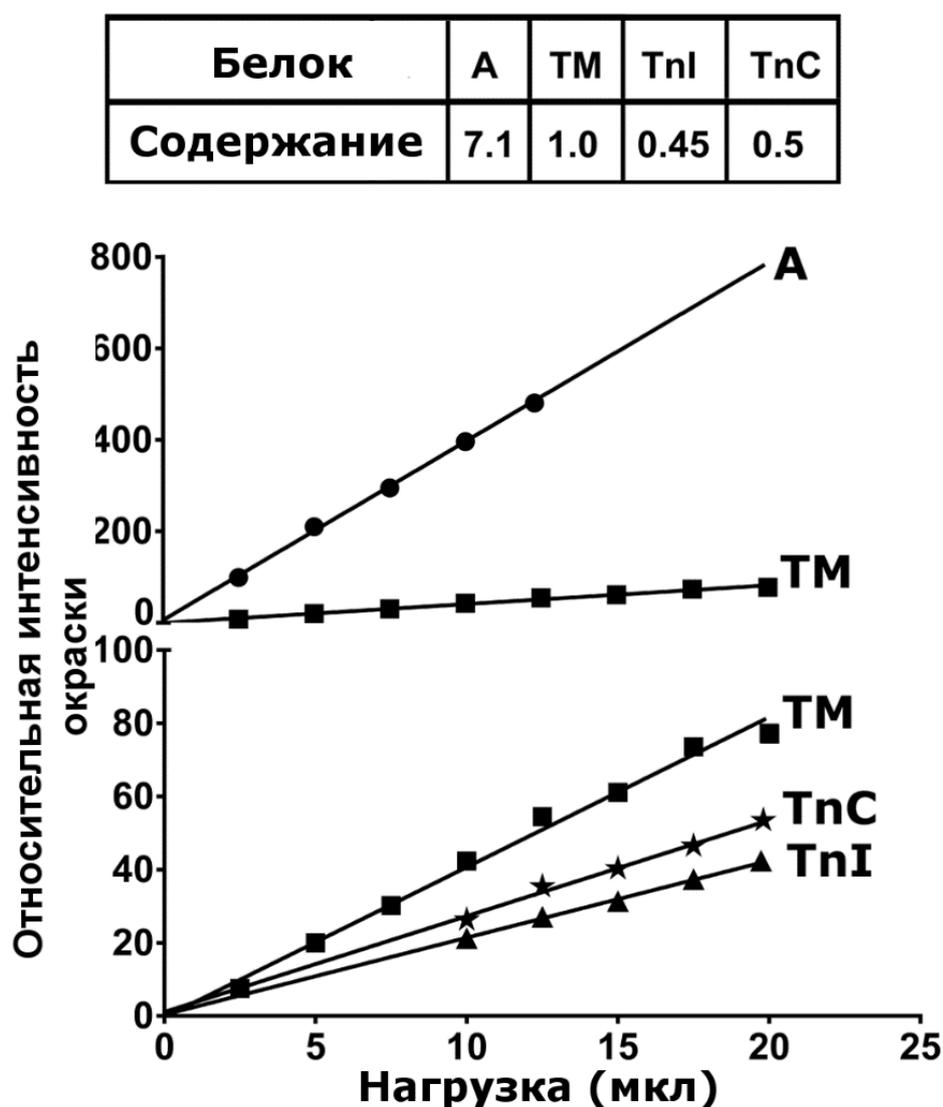


Рисунок 4 – Определение относительного содержания белков в тонких нитях мидии. В таблице приведены молярные концентрации белков, нормированные по тропомиозину. Обозначения: А – актин; ТМ – тропомиозин; ТnC – тропонин С; ТnI – тропонин I.

Полученные значения, характеризующие содержание белков в тонких нитях, были скорректированы с учетом молярного веса белков, их констант связывания электрофоретического красителя и нормированы по содержанию тропомиозину (Рисунок 4, таблица).

2.2.7. Определение концентрации белков методом биурета

Концентрации белков определяли по методу биурета: к 1.9 мл раствора 1 М NaOH добавляли 100 мкл раствора белка, затем добавлением 1 мл раствора биурета инициировали развитие окраски. По истечении 10 минут с помощью спектрофотометра Shimadzu UV mini-1240 измеряли экстинкцию окрашенного белкового раствора при длине волны 310 нм. В качестве контроля использовали тот раствор в котором пребывал тестируемый белок. Концентрацию вычисляли по формуле (3):

$$C_b = k * E_{310} * L, \quad (3)$$

где: k – тангенс угла наклона калибровочной кривой, L – длина оптического пути кюветы.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было показано, что тонкие нити запирающей мышцы мидии обладают Ca^{2+} -чувствительностью (Shelud'ko et al., 2007; Dobrzhanskaya et al., 2013). Эта Ca^{2+} -чувствительность не связана с кальпонином - Ca^{2+} -связывающим белком, обнаруженным нами в этой мышце, поскольку его избирательное удаление не сказывается на этом свойстве (Dobrzhanskaya et al., 2013). Также, вопреки литературным данным, мы не обнаружили в этой мышце кальдесмон, который по мнению ряда авторов, придает запирающим мышцам Ca^{2+} -чувствительность. Для идентификации фактора, придающего тонким нитям Ca^{2+} -чувствительность, мы выделили (см. раздел 2.1.2.6.) из тонких нитей мидии фракцию минорных белков, придающую Ca^{2+} -чувствительность «природному» фибриллярному актину в присутствии тропомиозина (Рисунок 5Б).

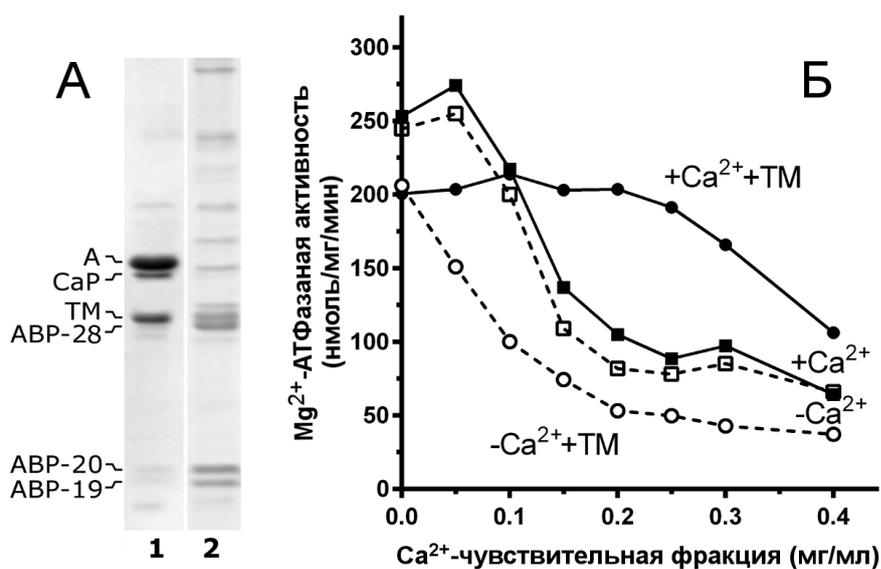


Рисунок 5 – Фракция тонких нитей мидии, придающая Ca^{2+} -регулируемость сократительной модели.

А – сравнение состава тонких нитей (дорожка 1) и Ca^{2+} -чувствительной фракции тонких нитей (дорожка 2); В – Влияние Ca^{2+} -чувствительной фракции на Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина, реконструированного с тропомиозином и без него, в присутствии и отсутствие Ca^{2+} . Условия: миозин кролика, 0.1 мг/мл; фибриллярный актин мидии, 0.1 мг/мл; мидийный тропомиозин 0.05 мг/мл; 30 мМ КСl, 0.5 мМ MgCl_2 ; 2 мМ NaN_3 ; 20 мМ имидазол-НСl рН 7.0; Mg^{2+} -АТФ, 0.3 мМ; 1 мМ ЭГТА, или 0.2 мМ CaCl_2 .

3.1. Тонкие нити мидии содержат минорные белки, придающие Ca^{2+} -чувствительность реконструированному актомиозин-тропомиозину

3.1.1. Идентификация компонентов, придающих Ca^{2+} -чувствительность тонким нитям мидии

В отсутствие тропомиозина, эта фракция оказывает на Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина Ca^{2+} -независимое ингибирующее воздействие. Фракция состоит из варьируемых количеств актина и тропомиозина, а также значительного количества неидентифицированных белков, АВР-28, АВР-20 и АВР-19 (Рисунок 5А, дорожка 2). Эти белки содержатся в тонких нитях в небольших количествах.

Из Ca^{2+} -чувствительной фракции АВР-белки были выделены при помощи ионообменной хроматографии (см. материалы и методы). По результатам хроматографического разделения АВР-белков мидии, оказалось, что эти белки по молекулярному весу и растворимости напоминают компоненты тропонина поперечнополосатой мышцы гребешка. Поэтому, идентификацию АВР-белков мидии мы начали с выявления их схожести с компонентами тропонина иммуноферментным анализом.

На рисунке 6 показаны результаты вестерн-блоттинга компонентов АВР-28, АВР-20, и АВР-19. Электрофореграмма смеси этих белков в эквимольном соотношении сравнивается со смесями АВР-белков с антителами к компонентам тропонина из мышц позвоночных. Как можно видеть на рисунке, антитела к TnC и TnI избирательно связываются с белками АВР-19 и АВР-20, однако антитела к TnT демонстрируют также слабое связывание с компонентами АВР-28 и АВР-20.

Для идентификации АВР-белков нами был также использован MALDI TOF MS/MS анализ. Результаты идентификации спектров в программе Scaffold показали, что белками наиболее похожими на АВР-28 и АВР-19 мидии в базе данных Mascot являются тропонины Т (gi|1655496) и С (gi|378408555) двустворчатых моллюсков (*Chlamys nipponensis akazara* и *Ruditapes philippinarium*; Рисунок 7). Максимальное сходство с АВР-20 белком мидии

показал белок LOTGIDRAFT_200673 (gi|556112145) брюхоногого моллюска *Lottia gigantea*. Этот белок, как оказалось, принадлежит к семейству тропонинов I

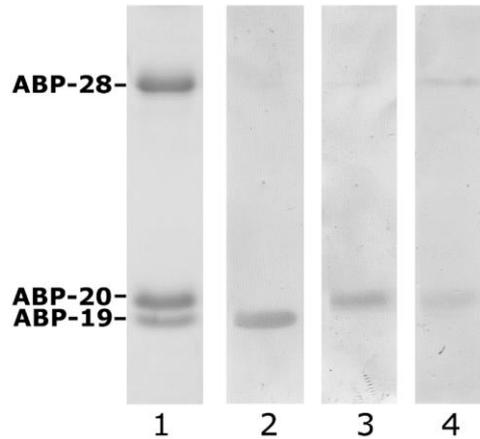


Рисунок 6 – Результаты Вестерн-блоттинга актин-связывающих белков, полученных из Ca^{2+} -чувствительной фракции тонких нитей мидии.

Дорожка 1 – электрофореграмма смеси ABP-19, ABP-20 и ABP-28 белков; дорожка 2 – окраска смеси ABP-белков поликлональными антителами к сердечномышечному тропонину С человека; 3 – окраска смеси ABP-белков моноклональными антителами к скелетномышечному тропонину I человека; 4 – окраска смеси ABP-белков поликлональными антителами к скелетномышечному тропонину Т человека.

A	MDYDDEPRTG DLEQLRLKRE KR IEAKKAKL EEKRAILAQR SQQYDMIELA ERHTDLRTYG AAPAPEAEVA	DGNEARLAME QRKQERIEED KELEERKKMS IQPLTVDGLD ERARQMNK GK TRVDYFETKA AEEE	EAARKKKEKV RRLLEIRKEE KTPNFVITKK LAALMEKATE KRAVQVDDSY KKIEAEMAIG	ESEIAEYEEM DKRRK AEEEE GASNLEEASK FHNKIKSLAN DPMAEKYGSC RKKEEDNLLK	RREQREKEAE RKRKKQEDER DMAK SKEQLE EKYELEERFK PPKVQMYSKY TMEETEETSE
Б	MKKKGK RKGL RVEPLKVDGL TVKVNDTKGK LEEEETS KTP	GGLSPEKKM SQGGLRTLCK FMKPVLR KVN DWRNTLKGKE	LK KLIMQKAA ELQKKYEQLE KTESKFSKLE EGGEHGEEES	EDLRNEAK KK ADVYDWEFKI RKENRDFRGN	AEEKEKHIND REKELEINDL LKSTGQNKYK
В	MTDFKVTDKQ KDWADEMDDED VIPVSDLRWI	FTDAKSTFHL ATGLITWEKF LK SLGDDITE	YVKKGSE EVA KVLFERKLKE EEIDDMIAET	TKDL DQLFKA DEEEKELKEA DTDGSGTVDY	MALHIDDEKL FRVLDSQKKG EEFKSLMSSE

Рисунок 7 – Результат поиска пептидов, гомологичных ABP-белкам мидии в базе данных Mascot.

А – Тропонин Т (*Chlamys nipponensis akazara*); Б – LOTGIDRAFT_200673 (*Lottia gigantea*); В – тропонин С (*Ruditapes philippinarum*). Желтым цветом выделены совпавшие аминокислоты.

Зеленым цветом показаны аминокислоты с посттрансляционными модификациями.

В целом, вышеизложенные данные (Рисунки 5, 6 и 7) позволяют предполагать, что минорные актин-связывающие белки АВР-28, АВР-20 и АВР-19 являются компонентами тропониноподобного белка мидии. Однако для полноценной идентификации было необходимо выяснить, какое влияние эти белки оказывают на АТФазную активность актомиозиновой модели в присутствии и отсутствие кальция по отдельности и в различных комбинациях.

Первым этапом этой работы было исследование зависимости Ca^{2+} -чувствительности АТФазной активности актомиозиновых моделей от состава среды, для выбора оптимальных условий тестирования (Рисунок 8).

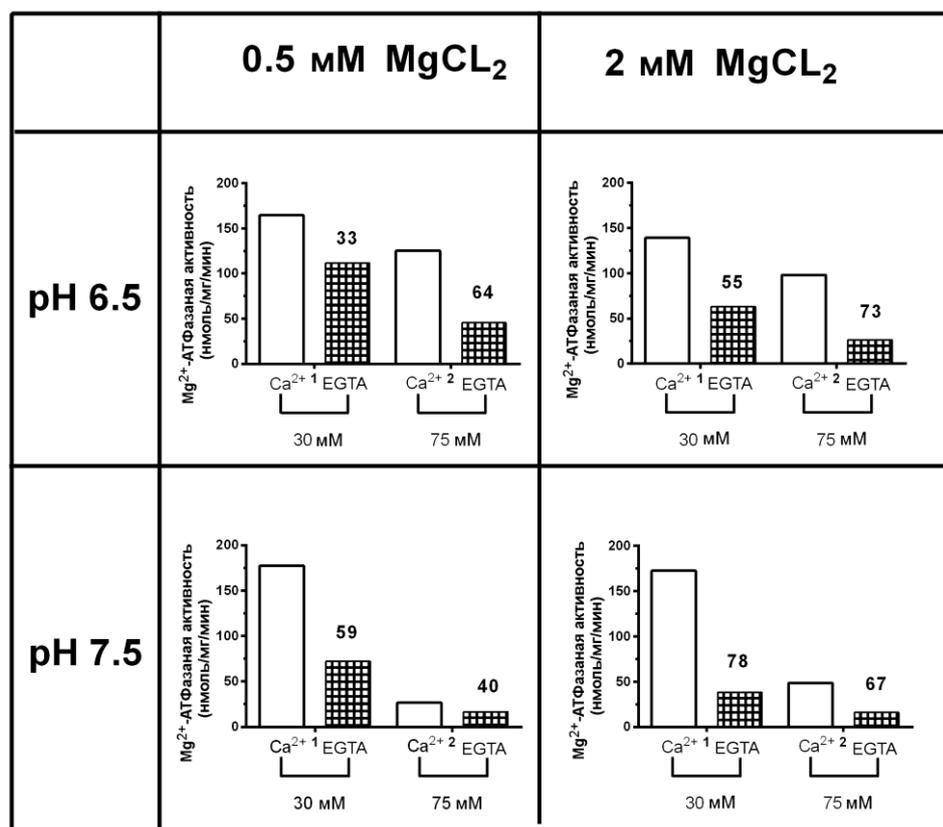


Рисунок 8 – Определение оптимальных условий тестирования АВР белков Ca^{2+} -чувствительной фракции тонких нитей.

Условия: 75 или 30 мМ KCl , 0.5 или 2 мМ MgCl_2 , 2 мМ NaN_3 , 20 мМ имидазол- HCl (pH 6.5 или 7.5), 0.1 мМ CaCl_2 . Актин кролика, 0.05 мг/мл; миозин кролика, 0.1 мг/мл; тропомиозин мидии, 0.025 мг/мл; Ca^{2+} -чувствительная фракция тонких нитей, 0.1 мг/мл. Ca^{2+} -чувствительность (%) указана над заштрихованными столбиками.

На рисунке 8 показана Ca^{2+} -чувствительность актомиозиновых моделей при добавлении фракции тонких нитей при различных сочетаниях параметров среды – 30 или 75 мМ КСl; рН 6.5 или 7.5; 0.5 мМ или 2 мМ MgCl_2 . Оказалось, что максимальные значения Ca^{2+} -чувствительности достигались при 30 мМ КСl, 2 мМ MgCl_2 , рН 7.5.

Следующим этапом нашей работы была идентификация хроматографически очищенных компонентов АВР-28, АВР-20 и АВР-19 путем исследования их функциональных свойств, как по отдельности, так и в различных сочетаниях. Так, было изучено влияние тропониноподобных белков на Mg^{2+} -АТФазную активность реконструированного актомиозин-тропомиозина в присутствии и отсутствие Ca^{2+} (Рисунок 9).

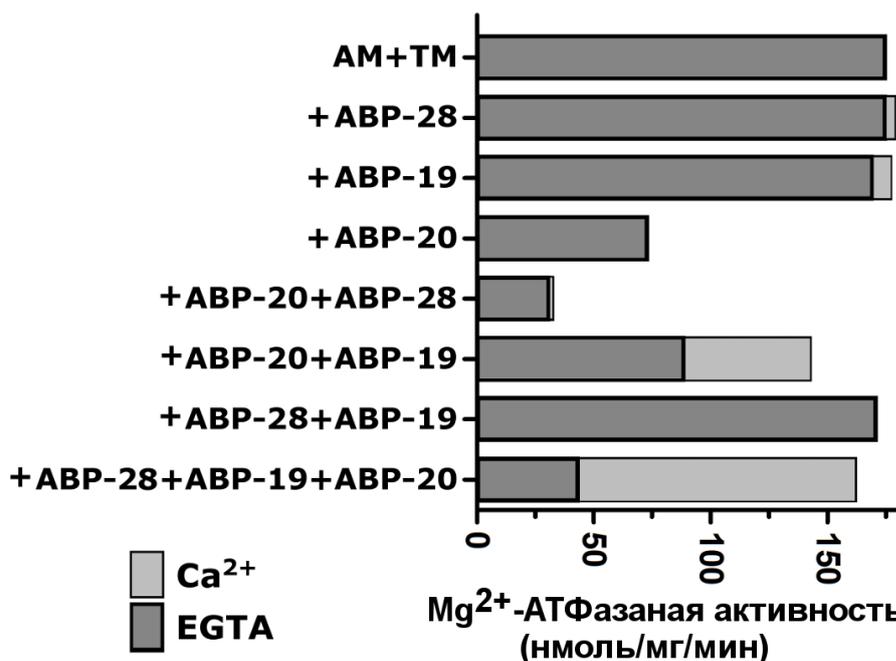


Рисунок 9 – Влияние различных комбинаций АВР-19, АВР-20, и АВР-28 на Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозин-тропомиозинового комплекса в присутствии и отсутствие Ca^{2+} .

Условия: 30 мМ КСl, 2.0 мМ MgCl_2 , 0.5 мМ ДТТ, 10 мМ имидазол–НСl (рН7.5), и 0.1 мМ CaCl_2 или 1.0 мМ ЭГТА. Миозин кролика, 0.1 мг/мл; актин мидии, 0.025 мг/мл; тропомиозин мидии, 0.0125 мг/мл; АВР-19, 0.025 мг/мл; АВР-20, 0.025 мг/мл; АВР-28, 0.025 мг/мл.

Оказалось, что АВР-20, как и TnI позвоночных (Greaser, Gergely, 1971; Greaser et al., 1973; Greaser, Gergely, 1973), ингибирует Mg^{2+} -АТФазную активность сократительной модели (Рисунок 9). Белок АВР-19 способен ослаблять ингибирование АВР-20 в присутствии, но не в отсутствие кальция. Это говорит о способности АВР-19 связывать кальций и придавать Ca^{2+} -чувствительность ингибированию АВР-20 белка, что характерно для TnC позвоночных (Greaser, Gergely, 1971, 1973). Белок АВР-28 способен усиливать как ингибирующее воздействие АВР-20, так и активирующий эффект АВР-19, что характерно для TnT позвоночных (Eisenberg, Kielley, 1974; Endo, Obinata, 1981; Schaub, Perry, 1969). Следует отметить, что АВР-28 и АВР-19 (как TnT и TnC позвоночных) (Greaser, Gergely, 1971; Greaser et al., 1973) ни сами по себе, ни в комплексе, практически не влияют на Mg^{2+} -АТФазную активность сократительной модели. В целом, влияние тропониноподобных белков мидии на реконструированный актомиозин такое же, как и в случае компонентов тропонина гребешка (Ojima, Nishita, 1986) или кролика (Greaser, Gergely, 1971, 1973).

3.1.2. Содержание тропонин-тропомиозинового комплекса в тонких нитях мидии

Содержание белков Ca^{2+} -чувствительного комплекса определяли в тонких нитях мидии, выделенных из неотмытого гомогената при электрофоретическом контроле всех стадий выделения. На первом этапе были определены коэффициенты связывания электрофоретического красителя Coomassie brilliant blue R250 актином, тропомиозином и компонентами тропонина (Рисунок 3; подробности в разделе Материал и методы). Для этого использовались хроматографически очищенные белки из запирательной мышцы мидии Грея.

На втором этапе было определено соотношение белков в тонкой нити, скорректированное с учетом молекулярного веса этих белков и коэффициента связывания ими электрофоретического красителя. Молярное отношение А:ТМ:TnI:TnC в тонкой нити оказалось 7:1:0.45:0.5. (Рисунок 4, таблица).

Содержание TnT нам оценить не удалось из-за близкого расположения его зоны к зоне тропомиозина и большой разницы в интенсивности этих зон. Тем не менее, мы полагаем, что содержание TnT в тонких нитях мидии не отличается заметно от содержания других компонентов тропонина. Такое заключение можно сделать, сравнив состав Ca^{2+} -чувствительной фракции из тонких нитей (Рисунок 5 А, дорожка 2) и состав смеси компонентов тропонина в одинаковой молярной концентрации (Рисунок 6, дорожка 1). Учитывая эти данные мы полагаем, что отношение А:ТМ:Тп близко к 7:1:0.5.

3.1.3. Происходят ли потери тропонина в процессе выделения тонких нитей мидии?

Низкое содержание компонентов тропонина в тонких нитях мидии может быть связано с потерями тропонина при выделении. На рисунке 10 приведены электрофореграммы, иллюстрирующие процесс получения тонких нитей. Процесс получения тонких нитей можно условно разделить на два этапа. На первом этапе мышечный гомогенат, полученный после гомогенизации мышечной ткани, разделяется на две фракции, содержащие толстые и тонкие нити. Достигается это низкоскоростным центрифугированием, при котором толстые нити переходят в осадок. В супернатанте остаются саркоплазматические белки и тонкие нити. В низкоскоростном супернатанте тропонин может быть в двух состояниях. Он может быть связан с тонкими нитями или находиться в диссоциированном состоянии. Это можно установить посредством высокоскоростного ультрацентрифугирования, при котором тонкие нити осаждаются. Если тропонин (рис.10, компоненты TnC и TnI, дорожка 3) переходит при ультрацентрифугировании в осадок, то из этого следует, что тропонин находится в составе тонких нитей. Следовательно, находящиеся в осадке тонкие нити должны быть Ca^{2+} -чувствительными. Если же компоненты тропонина остаются в супернатанте, это означает, что используемый экстрагирующий раствор не является оптимальным.

Другой возможный источник потерь АВР-белков — это потери их вместе с тонкими нитями при общепринятой предварительной отмывке мышечного гомогената. Эта процедура используется при работе со скелетными мышцами для удаления саркоплазматических белков перед выделением сократительных белков. В этом случае, действительно, в низкоскоростном супернатанте (первая отмывка) можно обнаружить спектр немышечных белков, которые полностью удаляются при 3-4 отмывках без потери белков сократительных (аналогичный спектр можно видеть на рисунке 10, дорожка 2). Однако, это не так в случае мышц моллюсков. По не совсем понятным причинам в низкоскоростных отмывках гомогената мышц моллюсков вместе с саркоплазматическими белками оказывается большое количество тонких нитей, которые не осаждаются при центрифугировании и, следовательно, удаляются в процессе выделения (состав удаляемой фракции можно видеть на рисунке 10, дорожка 1).

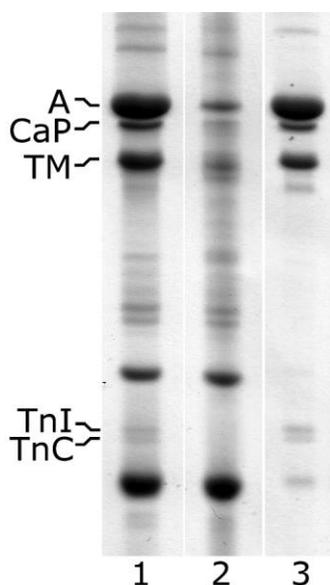


Рисунок 10 – Демонстрация полного соосаждения тропонина с актиновыми филаментами при выделении тонких нитей.

Дорожка 1 – экстракт тонких нитей из неотмытого гомогената свежей мышцы. Дорожка 2 – супернатант ультраосаждения экстракта при 110000 g, 90 мин. Дорожка 3, осадок ультраосаждения экстракта (тонкие нити).

Условия: 75 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ЭГТА, 0.1 mM фенилметилсульфонилфторида, 0.5 mM ДТТ, 2.5 мкг/мл леупептина, 25 mM имидазол-HCl (pH 6.2).

Количество тонких нитей в первой отмывке зависит от особенностей гомогенизации, состава отмывающего раствора и температуры. При использовании поттеровского гомогенизатора в первую отмывку переходит более половины материала, содержащего актин (рис. 10, дорожка 1). Мы использовали первую отмывку в качестве экстракта тонких нитей. Для очистки тонких нитей их осаждали высокоскоростным центрифугированием (рис. 10, дорожка 3), при котором саркоплазматические белки остаются в супернатанте (рис. 10, дорожка 2). Такой подход позволяет проводить количественную оценку связанных и несвязанных с тонкими нитями компонентов тропонина. То есть, сравнивая супернатант и осадок ультрацентрифугирования экстракта тонких нитей можно выяснить, диссоциирует ли тропонин от тонких нитей. На рисунке 10 видно, что ультрасупернатант осаждения тонких нитей в используемой нами среде не содержит тропонин (дорожка 2). Весь тропонин содержится в ультраосадке, вместе с тонкими нитями (дорожка 3). Это означает, что тропонин на всех этапах выделения входит в состав тонких нитей. Таким образом, потеря тропонинов в процессе выделения не происходит. Следовательно, определяемое нами посредством денситометрии содержание тропонина в тонких нитях является корректным.

3.1.4. Зависимость степени Ca^{2+} -регуляции реконструированного актомиозин-тропомиозина от содержания в нем реконструированного тропонина

На рисунке 11 показана зависимость Ca^{2+} -чувствительности реконструированных тонких нитей от количества содержащегося в них реконструированного тропонина.

Ca^{2+} -чувствительность, как и следует ожидать, увеличивается по мере увеличения содержания тропонина и затем выходит на плато. Плато начинается приблизительно при $T_n:T_M=1$, т.е. при тех же значениях, что и в случае T_n - T_M системы скелетных мышц позвоночных. Следовательно, в регуляторной системе

мидии для достижения высоких значений Ca^{2+} -чувствительности также необходимо эквимольное соотношение между тропомиозином и тропонином. При $\text{Tn}:\text{TM}=0.5$ (показано на рисунке 11 стрелкой) реконструированные тонкие нити мидии обладают вдвое меньшей Ca^{2+} -чувствительностью. Следует отметить, что Ca^{2+} -чувствительность нативных тонких нитей достигает 70–80%.

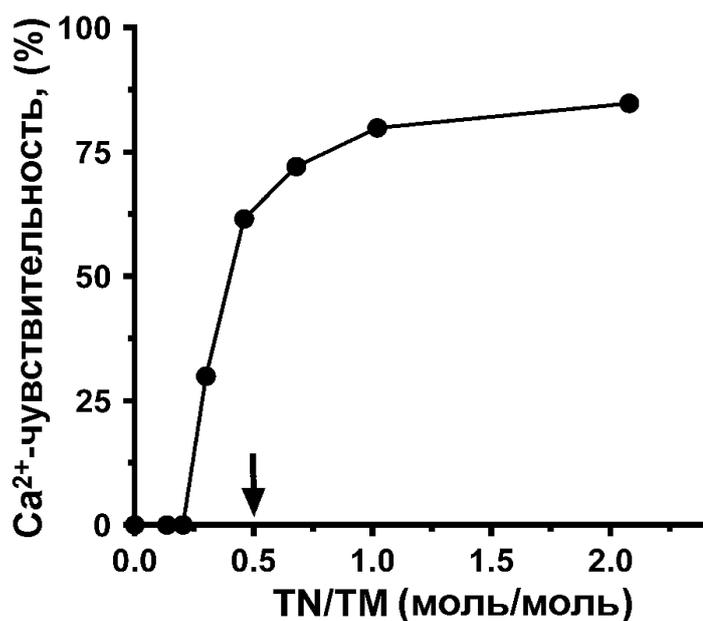


Рисунок 11- Зависимость Ca^{2+} -чувствительности реконструированного актомиозина от содержания восстановленного тропонина мидии.

Условия: 30 мМ КСl, 2.0 мМ MgCl_2 , 0.5 мМ ДТТ, 10 мМ имидазол–НСl (рН7.5), и 0.1 мМ CaCl_2 или 1.0 мМ ЭГТА. Миозин кролика, 0.1 мг/мл; актин мидии, 0.05 мг/мл; тропомиозин мидии, 0.03 мг/мл; тропонин мидии, 0 – 0.1 мг/мл. Стрелкой показано соотношение $\text{Tn}:\text{TM}$, определенное нами в нативных тонких нитях мидии.

3.1.5. Тонкие нити мидии содержат фактор, ингибирующий активирование ими миозина кролика, но не миозина мидии

Мы обнаружили, что активирующая способность «природного» Ф-актина мидии активировать скелетно-мышечный миозин несколько раз выше, чем способность тонких нитей мидии (Рисунок 12). Следует отметить, что активирующая способность «природного» Ф-актина мидии не зависела от

присутствия кальция, что указывает на отсутствие примесей тропомиозин-тропонинового комплекса в это препарате.

Таким образом, тонкие нити мидии, которые являются естественными активаторами миозина мидии *in vivo*, столь же сильно активируют этот миозин и *in vitro*, но намного слабее активируют миозин кролика.

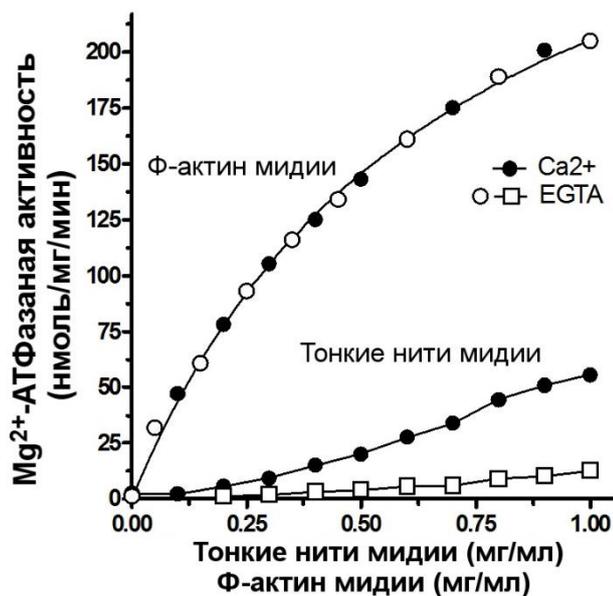


Рисунок 12 – Активирование АТФазной активности миозина кролика актином и тонкими нитями мидии в присутствии и отсутствие кальция.

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 20 мМ имидазол–НСl (рН 6.5), 0.1 мМ СаСl₂ или 1 мМ ЭГТА; миозин кролика, 0.1 мг/мл.

Это, на первый взгляд, кажется естественным, однако плохо сочетается с высоким активированием миозина кролика «природным» Ф-актином, который, собственно, и является «активатором» в тонких нитях. Поскольку тонкие нити и «природный» Ф-актин различаются только актин-связывающими белками, разумно предположить, что среди этих белков присутствуют белки, ингибирующие активирование миозина Са²⁺-независимым образом. Актин-связывающими белками тонких нитей мидии являются тропомиозин, кальпонин, несколько неидентифицированных минорных полипептидов (Dobrzhanskaya et al., 2013), и, как показано в данной работе, компоненты тропонина мидии. В

результате тестирования вышеперечисленных белков было найдено, что ярко выраженными ингибирующими свойствами обладает тропомиозин.

3.1.6. Тропомиозин мидии ингибирует Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина кролика, но не актомиозина мидии

На рисунке 13 показано влияние тропомиозинов мидии и кролика на Mg^{2+} -АТФазную активность актомиозина кролика.

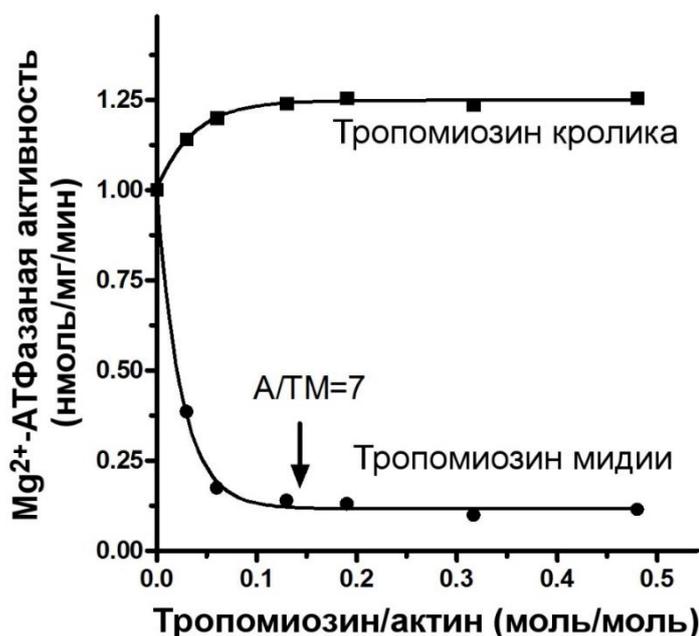


Рисунок 13 – Влияние тропомиозина мидии и тропомиозина кролика на АТФазную активность актомиозина кролика.

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ $MgCl_2$, 2 мМ NaN_3 , 20 мМ имидазол-НСl (рН 7.0), 0.1 мМ $CaCl_2$.

Актин кролика, 0.1 мг/мл; Актин мидии, 0.1 мг/мл.

Оказалось, что тропомиозины мидии и кролика влияют на Mg^{2+} -АТФазную активность сократительной модели диаметрально противоположно: тропомиозин кролика увеличивает ее приблизительно на 25%, а тропомиозин мидии ее снижает на 85-90%. В обоих случаях влияние тропомиозина достигает максимума при молярном соотношении актина и тропомиозина 7:1.

Степень ингибирования Mg^{2+} -АТФазной активности актомиозина кролика тропомиозином мидии зависит от параметров среды: ионной силы, рН и концентрации $MgCl_2$. Нами было определено влияние различных значений

вышеперечисленных условий среды на ингибирование тропомиозином мидии АТФазной активности сократительной модели, реконструированной из актина и миозина кролика. Результаты можно видеть на рисунках 14 и 15.

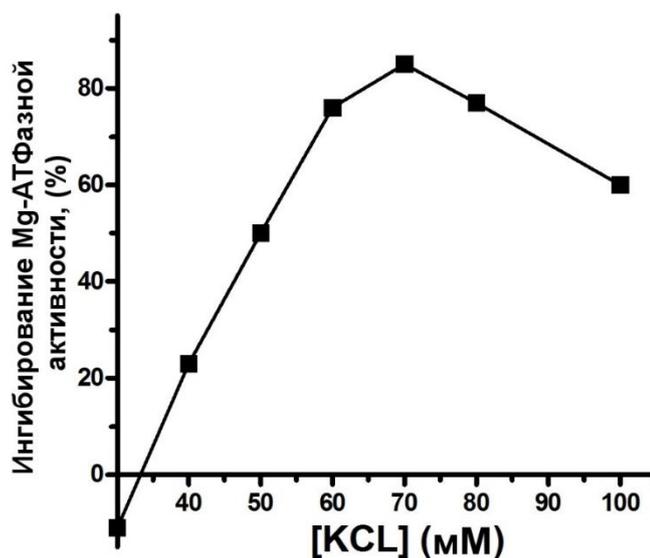


Рисунок 14 – Влияние ионной силы на степень ингибирования тропомиозином мидии АТФазной активности актомиозина.

Mg²⁺-АТФазная реакция проводилась при 25°С в течение 10 мин в растворе, содержащем 30–100 мМ KCl, 0.5 мМ MgCl₂, 2 мМ NaN₃, 20 мМ имидазол–HCl (pH 7.0), 0.2 мМ CaCl₂, 0.3 мМ Mg²⁺-АТФ; 0.1 мг/мл миозина кролика, 0.1 мг/мл актина кролика и 0.03 мг/мл тропомиозина мидии.

Как видно на рисунке 14, изменение ионной силы среды с 75 до 20 мМ KCl оказалось способно привести к смене «тропомиозинового» ингибирования – активированием.

Отследим влияние других параметров среды на ингибирование тропомиозином АТФазной активности. В среде с физиологической ионной силой (рис. 15 А) изменение pH сказывается на общем уровне АТФазной активности сократительной модели, но не на «тропомиозиновом» ингибировании. Уменьшение содержания Mg²⁺ в среде в некоторой степени ослабляет «тропомиозиновое» ингибирование.

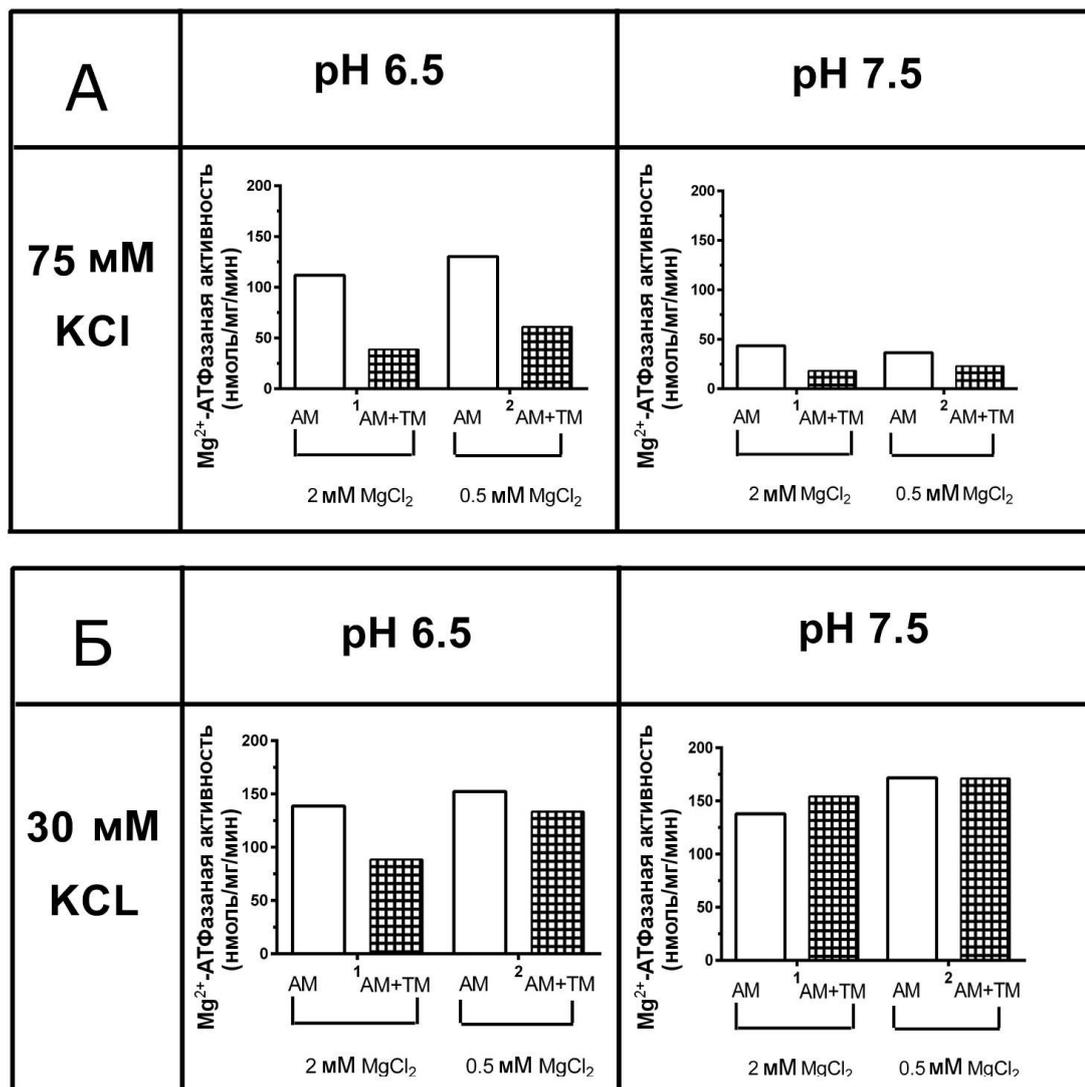


Рисунок 15 – Влияние физиологической ионной силы, pH и концентрации ионов Mg^{2+} на ингибирование АТФазной активности актомиозина кролика тропомиозином мидии. Условия: 75 или 30 мМ KCl, 0.5 или 2 мМ $MgCl_2$, 2 мМ NaN_3 , 20 мМ имидазол–HCl (pH 6.5 или 7.5), 0.1 мМ $CaCl_2$. Актин кролика, 0.1 мг/мл; миозин кролика, 0.1 мг/мл.

В среде с низкой ионной силой (рис. 15 Б) сохраняется тенденция меньшего уровня ингибирования при меньшем содержании Mg^{2+} . При этом, pH перестает влиять на общий уровень АТФазной активности, но становится способен ослабить «тропомиозиновое» ингибирование. Следует отметить, что этот эффект выражен значительно слабее, чем эффект изменения ионной силы раствора.

Таким образом, нами найдены условия среды (30 мМ KCl, 2 мМ $MgCl_2$, pH 7.5), в которых ингибирование тропомиозином мидии АТФазной активности

актомиозина не проявляется. Данная корректировка внешне нормализует свойства гибридных моделей, делая их свойства сходными со свойствами негибридных моделей. Однако у нас нет уверенности в том, что в этих условиях гибридные модели становятся идентичными по свойствам негибридным моделям.

3.1.7. Гибридные и негибридные актомиозиновые модели, реконструированные из актина, миозина и тропомиозина скелетной и запирающей мышцы

Самой простой сократительной моделью является синтетический актомиозин, состоящий только из миозина и актина. Он способен активировать АТФазу миозина и проявлять некоторую механохимическую активность. Мы использовали четыре варианта такой модели, собранной из миозина (М) и актина (А) скелетной мышцы кролика (крол) и запирающей мышцы мидии (мид). Две модели из них были негибридными: ($M_{\text{крол}}+A_{\text{крол}}$) и ($M_{\text{мид}}+A_{\text{мид}}$); а две – гибридными ($M_{\text{крол}}+A_{\text{мид}}$) и ($M_{\text{мид}}+A_{\text{крол}}$) (Рисунок 16).

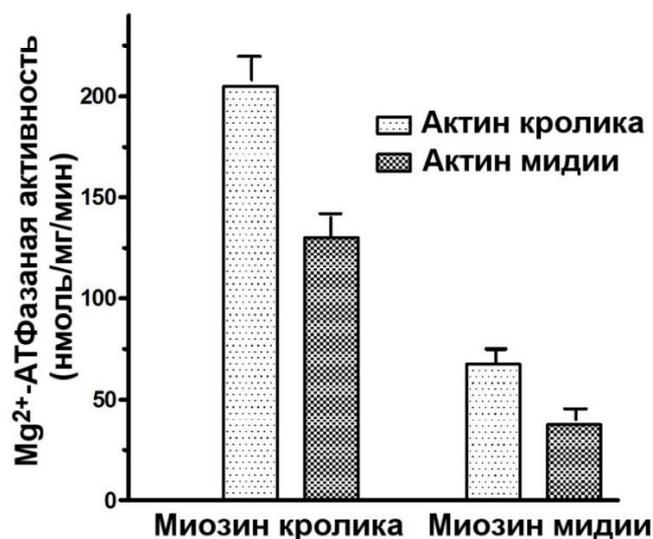


Рисунок 16 – Сравнение Mg²⁺-АТФазной активности синтетических актомиозинов реконструированных из актина и миозина кролика и мидии.

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 2 мМ NaN₃, 20 мМ имидазол–НСl (рН 7.0), 0.1 мМ СаСl₂.

Актин, 0.1 мг/мл; миозин, 0.1 мг/мл.

Модели, содержащие миозин кролика, как и следовало ожидать, обладали заметно большей активностью, чем таковые с миозином мидии. Кроме того,

оказалось, что актин кролика активирует оба миозина сильнее, чем актин мидии. Таким образом, активность полученных моделей снижается в ряду: ($M_{\text{крол}}+A_{\text{крол}}$); ($M_{\text{крол}}+A_{\text{мид}}$); ($M_{\text{мид}}+A_{\text{крол}}$); ($M_{\text{мид}}+A_{\text{мид}}$). Различия не связаны с гибридностью и вполне согласуются с литературными данными (Bárány, 1967).

На рисунке 17 сравниваются Mg^{2+} -АТФазные активности вышеперечисленных моделей от содержания в них тропомиозинов кролика и мидии.

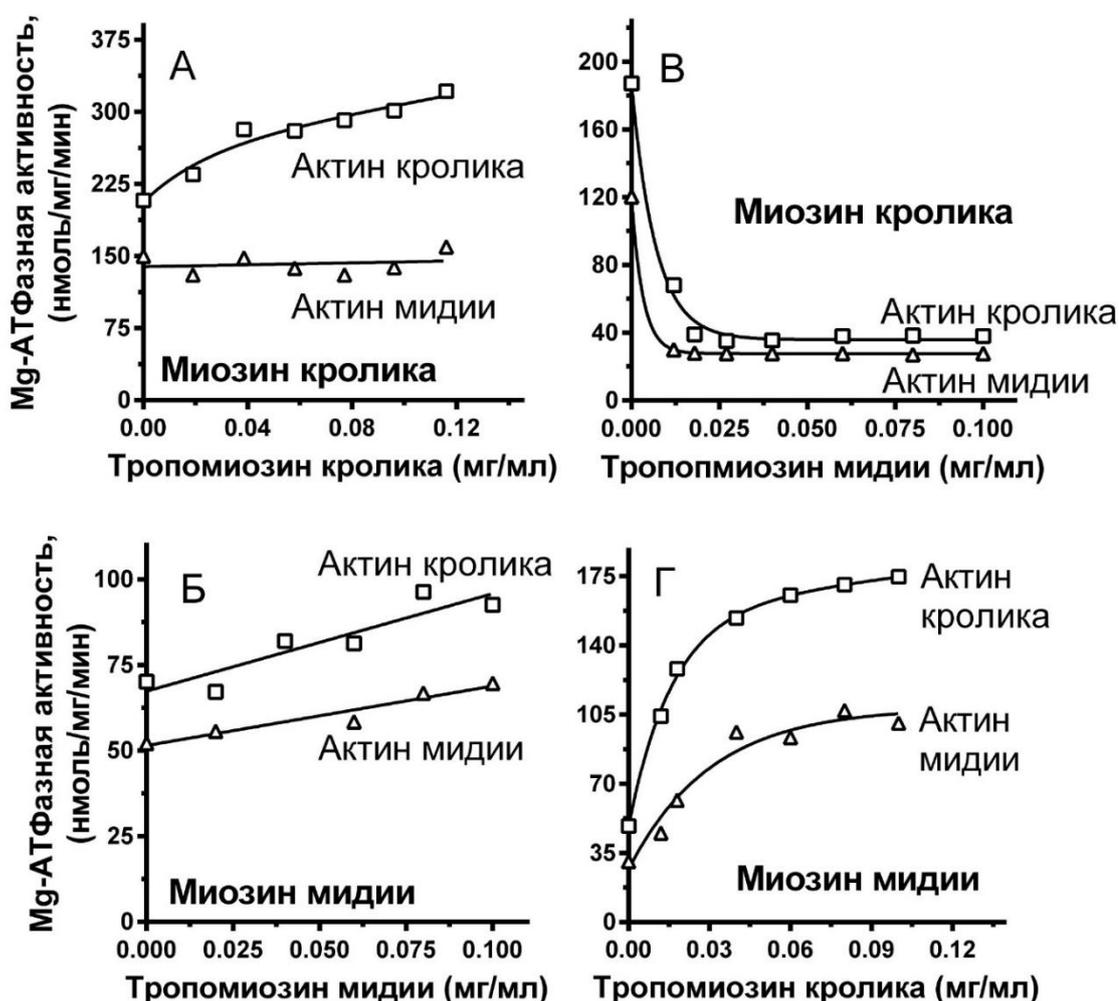


Рисунок 17 – Свойства актомиозиновых моделей, реконструированных из миозина, актина, и тропомиозина кролика и мидии в различных комбинациях.

Условия: 75 мМ КСl, 2 мМ $MgCl_2$, 2 мМ NaN_3 , 20 мМ имидазол–НСl (рН 7.0), 0.1 мМ $CaCl_2$.

Актин кролика и мидии, 0.1 мг/мл; миозин кролика и мидии, 0.1 мг/мл.

Шесть моделей из восьми сходны по влиянию на них тропомиозина: Mg^{2+} -АТФазная активность по мере увеличения содержания тропомиозина в большей или меньшей степени увеличивается. В случае же двух моделей, содержащих миозин кролика и тропомиозин мидии (Рисунок 17В) наблюдается сильное ингибирование АТФазной активности, которое слабо зависит от источника использованного актина. Если в этих моделях (Рисунок 17В) заменить миозин кролика на миозин мидии (Рисунок 17Б), то ингибирование сменяется активированием опять-таки независимо от происхождения актина.

При этом нет оснований считать, что ингибирующий эффект тропомиозина мидии связан с какими-либо погрешностями при приготовлении моделей, поскольку он наблюдается и при использовании нативных тонких нитей (Рисунок 12).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Тонконитевая регуляция запирающих мышц двустворчатых моллюсков

Данные о механизме Ca^{2+} -регуляции тонких нитей моллюсков в значительной степени противоречивы. В одних работах у моллюсков находили следы кальдесмоновой регуляторной системы (Bennett, Marston, 1990), в других – тропониновой (Ojima, Nishita, 1986). На момент написания данной работы тропониновая регуляция была обнаружена в поперечнополосатых (Lehman et al., 1980; Ojima, Nishita, 1986, 1992), и гладких (Nishita et al., 1997; Ojima, Nishita, 1986) мышцах гребешков. Поскольку в мышцах других двустворчатых моллюсков тропонины были обнаружены только в следовых количествах, считалось, что регуляция гладких мышц других моллюсков осуществляется кальдесмоном (Bennett, Marston, 1990).

В поисках кальдесмона был изучен состав гомогената, толстых и тонких нитей запирающей мышцы мидии и был проведен иммуноферментный анализ тонких нитей мидии. Однако кальдесмон не был найден (Dobrzhanskaya et al., 2013) в мышцах мидии Грея, которая является видом, близкородственным мидии *Mytilus edulis*, где он ранее был обнаружен. Был сделан вывод, что кальдесмоновая регуляция не характерна для мышц двустворчатых моллюсков, а результаты иммуноферментной идентификации кальдесмона в мышце мидии *Mytilus edulis* являются ошибочными (Dobrzhanskaya et al., 2013).

Тем не менее, поскольку наличие Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей в мышцах мидии Грея нами было убедительно установлено, мы предприняли поиск Ca^{2+} -чувствительного фактора в тонких нитях этого моллюска.

4.2. Идентификация тропониновой регуляции в тонких нитях запирающей мышцы мидии

Идентификация компонентов тропонина мидии была проведена по Maldi Ms/Ms спектрам белков, физико-химическим свойствам, влиянию на АТФазную

активность сократительных моделей и иммуноферментному окрашиванию антителами.

Тропонин мидии, как оказалось, по своим свойствам во многом похож на тропонин позвоночных. Это белок включает три компонента: ингибиторный, Ca^{2+} -связывающий и тропомиозин-связывающий (Ebashi, 1971). Компоненты тропонина позвоночных и мидии обладают близким молекулярным весом и схожим индивидуальным влиянием на сократительную модель (Greaser, Gergely, 1971, 1973). Кроме того, тропонин мидии, как и тропонин позвоночных, осуществляет Ca^{2+} -регуляцию сокращения тропомиозин-опосредованным образом (Greaser, Gergely, 1971; Greaser et al., 1973).

При этом оказалось, что тропонина в мышце мидии содержится в два раза меньше, чем в скелетных мышцах позвоночных (Potter, 1974) и поперечнополосатых мышцах гребешка (Lehman et al., 1980).

В скелетных мышцах позвоночных и поперечнополосатой мышце гребешка, согласно литературным данным, содержание тропонина и тропомиозина одинаково. Эквимольное содержание в этих мышцах тропонина и тропомиозина необходимо для эффективной Ca^{2+} -регуляции (Galinska-Rakoczy et al., 2008; Lehman, Craig, 2008). Очевидно, что при пониженном содержании тропонина (TN:TM=1:2), наблюдаемом в мышце мидии, тропонин-тропомиозиновая регуляторная система не может обеспечить почти 100%-ную Ca^{2+} -регуляцию, свойственную нативным тонким нитям этого моллюска (Dobrzanskaya et al., 2013).

Данное противоречие можно объяснить потерей тропонина при выделении тонких нитей. Однако, как показано в главе «Результаты», потери тропонина в процессе получения тонких нитей нами исключены.

В таком случае, несоответствие низкого содержания тропонина высокому уровню кальций-регуляции можно объяснить двумя причинами.

Во-первых, существованием в тонких нитях дополнительного, не-тропонинового механизма Ca^{2+} -регуляции. Во-вторых, особым механизмом

тропониновой регуляции, при котором не требуется эквимольного соотношения тропонина и тропомиозина. Мы проверили этот вариант и пришли к выводу, что для эффективной регуляции тропонин мидии должен присутствовать в тонкой нити в количестве эквимольном содержанию тропомиозина. Это говорит о том, что механизм функционирования тропонина мидии такой же, как в скелетных мышцах позвоночных.

На наш взгляд, несоответствие низкого содержания тропонина высокому уровню кальций-регуляции, связано с тем, что выделяемые нами тонкие нити, на самом деле, являются смесью двух типов тонких нитей, принадлежащих к цитоскелетному и сократительному доменам. Сократительные тонкие нити содержат тропонин, и являются Ca^{2+} -регулируемыми. Цитоскелетные тонкие нити не содержат тропонин и, следовательно, не обладают Ca^{2+} -регуляцией. Сходное разделение тонких нитей существует в гладкой мышце позвоночных, в которой есть тонкие нити, содержащие Ca^{2+} -регуляторный белок кальдесмон и не содержащие его (North et al., 1994).

Существование в запирающей мышце двух типов филаментов, содержащих и не содержащих тропонин, вполне объясняет заниженное содержание тропонина, выявленное при денситометрии суммарного препарата тонких нитей. Высокий уровень Ca^{2+} -регуляции таких смешанных тонких нитей обусловлен тем, что цитоскелетные тонкие нити содержат кальпонин. Этот белок способен ингибировать актин-миозиновое взаимодействие и, следовательно, исключать цитоскелетные тонкие нити из АТФазного цикла. В результате, уровень АТФазной активности и Ca^{2+} -регуляции препарата смешанных тонких нитей определяется только сократительными филаментами. Это и приводит к высокой степени Ca^{2+} -регуляции смешанного препарата.

Если наша гипотеза верна, то по результатам денситометрии тонких нитей мидии можно также заключить, что соотношение сократительных и цитоскелетных тонких нитей в запирающей мышце мидии близко к 1:1. Такое

заклучение можно сделать на основании того, что тропомиозин входит в состав всех тонких нитей клетки (Gunning, 2008).

4.3. Использование гибридных актомиозиновых моделей для изучения запирающих мышц двустворчатых моллюсков

В скелетной мышце положение тропомиозина на тонкой нити в отсутствие тропонина совпадает с положением тропомиозина в присутствии тропонина и кальция (Lehman et al., 2009). Согласно этому, введение скелетномышечного тропомиозина в скелетно-мышечный актомиозин не приводит к изменению Mg^{2+} -АТФазной активности (Sobieszek, Small, 1981). Однако если в скелетно-мышечный актомиозин вместо скелетно-мышечного тропонина вводить гладкомышечный тропомиозин, создавая, таким образом, гибридную модель, то происходит увеличение Mg^{2+} -АТФазной активности (Sobieszek, Small, 1981). В случае же введения в скелетно-мышечную модель тропомиозина из мышц двустворчатых моллюсков, наоборот, наблюдается сильное ингибирование, напоминающее реакцию Ca^{2+} -регуляторной системы на отсутствие кальция. При этом происхождение актина, использованного в сократительной модели, практически не влияет на результаты вышеописанных экспериментов. Следовательно, ингибирующий эффект определяется свойствами тропомиозина мидии, но реализуется благодаря участию в сократительной модели кроличьего миозина. Очевидно, в основе такого эффекта лежит способность тропомиозина регулировать взаимодействие миозина и актина, открывая и закрывая сайты связывания миозина на тонкой нити.

Таким образом, мы полагаем, что тропомиозин мидии, при введении его в сократительную модель кролика сам по себе занимает такое положение на актине, которое препятствует взаимодействию миозина кролика с тонкой нитью. То, что при этом, тропомиозин мидии не препятствует взаимодействию актина с миозином мидии (Рисунок 17Б), позволяет считать, что участки связывания миозинов мидии и кролика на актине отличаются.

Посредством изменения параметров среды, в частности, снижения ионной силы до 30 мМ KCL, можно снять ингибирующее влияние тропомиозина мидии (Рисунок 14), т.е. изменить закрываемый этим тропомиозином участок тонких нитей таким образом, чтобы этот участок не перекрывался с участком взаимодействия миозина кролика с актином. Подобная корректировка внешне нормализует свойства гибридных моделей, делая их похожими на негибридные модели. Однако у нас нет уверенности в том, что такие модели становятся идентичными по свойствам негибридным моделям.

4.4. Распространение тропониновой регуляции среди двустворчатых моллюсков

Считалось, что Ca^{2+} -регуляция тонких нитей запирательных мышц моллюсков осуществляется кальдесмоном, а регуляция тонких нитей поперечнополосатых мышц моллюсков – тропонином (Bennett, Marston, 1990; Nishita et al., 1997; Ojima, Nishita, 1986). Ранее мы не обнаружили наличие кальдесмона в запирательных мышцах мидии *Crenomytilus grayanus* (Dobrzhanskaya et al., 2013), а в ходе данной работы мы идентифицировали в этой мышце тропонин.

Возможно ли, чтобы у двустворчатых моллюсков разных видов были разные типы Ca^{2+} -регуляции мышц? Да, возможно, однако вероятность этого обратно пропорциональна степени родства видов. Очень мала вероятность существования столь фундаментальных отличий в молекулярной организации мышц двух видов, принадлежащих к одному семейству. Мидия *Mytilus edulis*, в мышце которой иммуноферментным окрашиванием был выявлен кальдесмон (Bennett, Marston, 1990), принадлежит к тому же семейству митилид (Mytilidae), что и исследованная нами мидия *Crenomytilus grayanus*. В пользу того, что в семействе митилид актин-ассоциированная Ca^{2+} -регуляция осуществляется тропонином говорит и обнаружение в мышце другого моллюска этого семейства,

Modiolus demissus, белков, по молекулярному весу похожих на I и C компоненты тропонина (Lehman, 1981).

Таким образом, тропониновая регуляция распространена среди двустворчатых моллюсков не только подотряда гребешков (Pectinoidea), но и подотряда Mytiloidea, к которому относится семейство митилид.

Кроме того, показана экспрессия гена тропонина в мышцах двустворчатого моллюска *Pinctada fucata*, представителя родственного митилидам и гребешкам подотряда Pterioidea (Funabara et al., 2013). Также, в тонких нитях представителя отряда другого отряда двустворчатых моллюсков Ostreoida, устрицы *Crassostrea virginica*, были обнаружены белки, схожие с компонентами I и C по молекулярному весу (Lehman, 1981). Эти белки удалось выделить из тонких нитей с применением подхода, разработанного для получения тропонинов гребешков.

Все выше названные таксономические группы (подотряды Pectinoidea, Mytiloidea, Pterioidea и отряд Ostreoida), в мышцах представителей которых были обнаружены тропонины или похожие на тропонины белки, относятся к одному подклассу двустворчатых моллюсков – Eupteriomorpha (Таблица 1). Кроме вышеобозначенных таксономических групп в этот подкласс входят два таксона, у представителей которых механизм Ca^{2+} -регуляции тонких нитей запирательных мышц изучен пока не был. Тем не менее, исходя из того, что представители большинства групп подкласса Eupteriomorpha обладают тропониновой регуляцией тонких нитей, можно предположить, что для мышц всех представителей этого подкласса двустворчатых моллюсков характерна тропониновая Ca^{2+} -регуляция тонких нитей.

Кроме подкласса Eupteriomorpha в классе двустворчатых моллюсков существуют еще три подкласса. Данных по актин-ассоциированной Ca^{2+} -регуляции запирательных мышц в этих группах очень мало. Практически вся информация касается подкласса Heterodonta. В одном из пяти отрядов этого подкласса, отряде Veneroidea, были исследованы три вида, принадлежащих к родам *Spisula*, *Ruditapes* и *Mercenaria*. В тонких нитях запирательной мышцы

Mercenaria mercenaria были обнаружены белки, по электрофоретической подвижности похожие на тропонины гребешка (Lehman, 1981). Один из этих белков удалось выделить, применив подход, разработанный для выделения тропонина I позвоночных. В мышцах *Ruditapes philippinarum* была показана экспрессия гена тропонина (Umasuthan et al., 2013). Интересно, что максимальный уровень экспрессии наблюдался в мышце-замыкателе моллюска, а минимальный в его ноге. В другом представителе этого отряда, *Spisula sachalinensis*, тропонинов не обнаружили (Chiba et al., 1992). Однако, авторы искали тропонин в ноге моллюска, а как показала работа на моллюске *Ruditapes philippinarium*, в ноге экспрессия гена тропонина минимальна. Таким образом, тропониновая регуляция характерна для тонких нитей запирательных мышц как минимум двух из четырех подклассов двустворчатых моллюсков (Таблица 1). Эти данные указывают на то, что тропониновая регуляция тонких нитей характерна для запирательных мышц всех, или почти всех, двустворчатых моллюсков.

Класс		Bivalvia									
Подкласс		Pteriomorpha									
Инфракласс		Eupteriomorpha									
Отряд		Veneroidea		Mytiloidea			Ostreoidea				
Подотряд		Pterioidea		Mytilidae			Pectinoidea				
Семейство		Veneridae		Mytilidae			Pectinidae				
Род		Mercenaria	Ruditapes	Modiolus	Crenomytilus	Mytilus	Crassostrea	Chlamys	Patinopecten	Argopecten	
Вид		<i>Mercenaria mercenaria</i>	<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Modiolus demissus</i>	<i>Crenomytilus grayanus</i>	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Crassostrea virginica</i>	<i>Chlamys nipponensis</i>	<i>Patinopecten yessoensis</i>	<i>Argopecten irradians</i>	
Электрофоретическое обнаружение		+		+	+	+ / +	+	+	+	+	
Выделение одного и более		+			+		+	+		+	
Иммуноферментная идентификация					+		+	+		+	
Масс-спектрофотометрическая идентификация			+		+			+		+	
Идентификация или свойств					+			+		+	

Красным - показаны свидетельства в пользу кальдесмоновой регуляции; Синим - в пользу тропониновой

Таблица 1 – Распространение тропонинового типа Ca²⁺-регуляции среди двусторчатых моллюсков

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что «актиновая» Ca^{2+} -регуляция гладких (запирательных) мышц мидии *Crenomytilus grayanus* является «тропониноподобной», т.е. такой же как и в скелетных мышцах позвоночных. При этом, «актиновая» Ca^{2+} -регуляция гладких мышц позвоночных является «кальдесмоно-подобной» т.е. отличается от регуляции скелетных мышц.

В данной работе процедура установления природы «актиновой» Ca^{2+} -регуляции включала несколько стадий:

1. Выделение Ca^{2+} -регулируемых тонких нитей в условиях, гарантирующих сохранение состава тонких нитей.
2. Выделение из них фракции белков, придающей Ca^{2+} -чувствительность реконструированному актомиозину.
3. Хроматографическое разделение этой фракции.
4. Тестирование влияния белков этой фракции на Ca^{2+} -чувствительность актомиозиновых моделей.
5. Идентификация компонентов регуляторной системы как Ca^{2+} -связывающего, ингибирующего и тропомиозин-связывающего белка.
6. Подтверждение идентификации посредством иммуноферментного анализа и МАЛДИ.
7. Определение констант связывания красителя Coomassie Brilliant Blue R-250 с компонентами тропонина мидии.
8. Определение посредством денситометрии молярного содержания актина, тропомиозина и тропонина мидии в тонких нитях.
9. Определение Ca^{2+} -регулируемости комплекса реконструированного актомиозина мидии с реконструированным тропонином мидии.

Согласно литературным данным, только в одной мышце двустворчатых моллюсков «актиновая» регуляция охарактеризована достаточно полно. Это поперечнополосатая мышца гребешков. Эта мышца функционально и структурно сходна со скелетной мышцей позвоночных в такой степени, что компоненты тропонина позвоночных и гребешков взаимозаменяемы. Сходны и основные черты организации «актиновой» регуляторной системы тонких нитей гребешков и позвоночных: молярное соотношение актин : тропомиозин : тропонин в этих тонких нитях одинаково и равно 7 : 1 : 1.

Кроме данных по вышеупомянутым поперечнополосатым мышцам гребешков, в литературе также представлены данные по гладким (запирательным) мышцам двустворчатых моллюсков. В основном они касаются обнаружения или необнаружения в тонких нитях компонентов тропонина. Поскольку в этих работах не приводятся количественные данные о содержании в тонких нитях компонентов тропонина (что, по-видимому, свидетельствует о следовых количествах белка) нет оснований полагать, что в гладких мышцах моллюсков реализуется «тропониновая» регуляция.

В данной работе показано, что в процессе выделения тонких нитей из гладких мышц двустворчатых моллюсков возможны значительные потери материала. Следовательно, обнаружение в гладких мышцах небольших количеств компонентов тропонина можно интерпретировать как результат неоптимальных препаративных процедур. Мы показали, что в отсутствие потерь соотношение между компонентами тонких нитей мидии составляет 1 А : 1 ТМ : 0.5 Тп. При таком соотношении тропонин мидии способен осуществлять регуляцию тонких нитей. Более того, мы полагаем, что в действительности содержание тропонина в тонких нитях сократительного домена гладких мышц еще выше: 1 А : 1 ТМ : 1 Тп, а в тонких нитях цитоскелетного домена тропонин отсутствует. Суммируя вышесказанное, можно предполагать, что в гладких мышцах двустворчатых моллюсков «актиновая» регуляция является тропониноподобной.

ВЫВОДЫ

1. Из Ca^{2+} -регулируемых тонких нитей мышц мидии *Crenomytilus grayanus* выделены актин-связывающие белки АВР-19, АВР-20 и АВР-28, идентифицированные как Ca^{2+} -связывающий, ингибирующий и тропомиозин-связывающий компоненты, аналогичные компонентам тропонина позвоночных.
2. Реконструированный комплекс тропонина и тропомиозина мидии придает фибриллярному актину кролика или мидии Ca^{2+} -чувствительность в пределах 70–90%.
3. Содержание тропонина в запирающей мышце мидии *Crenomytilus grayanus* вдвое ниже, чем в скелетных мышцах позвоночных при таком же уровне Ca^{2+} -регуляции.
4. Гибридные актомиозиновые модели, сочетающие в своем составе миозин скелетных мышц кролика и тропомиозин запирающих мышц мидии, обладают аномальными свойствами.
5. Разработан метод получения хроматографически чистых компонентов тропонинового комплекса из мышцы мидии *Crenomytilus grayanus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Матусовская Г.Г., Пермякова Т.В., Матусовский О.С., Шелудько Н.С. N-этилмалеимид ингибирует полимеризацию миорода – сократительного белка толстых нитей гладких мышц моллюсков // Биофизика. 2004. Т. 49, № 6. С. 1003–1007.
2. Матусовский О.С., Пермякова Т.В., Матусовская Г.Г., Дроздов А.Л., Шелудько Н.С.. Полимеризация миорода – поверхностного белка толстых нитей гладких мышц моллюсков // Биофизика. 2005. Т. 50, № 1. С. 69–74.
3. Тартаковский А.Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечно полосатых мышц // Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л.: Наука. 1978. С. 55–76.
4. Хайтлина С.Ю. Методы выделения и очистки актина. Оценка чистоты и нативности // Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. Л.: Наука. 1978. С. 122–141.
5. Шелудько Н.С. Белковый состав миофибрилл кролика, определенный методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия // Цитология. 1975. Т. 17, № 10. С. 1148–1152.
6. Aguilar H.N., Zielnik B., Tracey C.N., Mitchell B.F. Quantification of rapid myosin regulatory light chain phosphorylation using high-throughput in-cell western assays: Comparison to western immunoblots // PLoS One. 2010. Vol. 5, № 4.
7. Applegate D., Feng W., Green R.S., Taubman M.B. Cloning and expression of a novel acidic calponin isoform from aortic vascular smooth muscle // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, № 14. P. 10683–10690.
8. Asakawa T., Yazawa Y., Azuma N. Light chains of abalone myosin. UV absorption difference spectrum and resensitization of desensitized scallop myosin // J. Biochem. 1981. Vol. 89, № 6. P. 1805–1814.
9. Avrova S.V., Shelud'ko N.S., Borovikov Y.S., Galler S. Twitchin of mollusc smooth muscles can induce “catch”-like properties in human skeletal muscle: Support

for the assumption that the “catch” state involves twitchin linkages between myofilaments // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2009. Vol. 179, № 1. P. 945–950.

10. *Avrova S.V., Shelud'ko N.S., Borovikov Y.S., Galler S.* A new property of twitchin to restrict the “rolling” of mussel tropomyosin and decrease its affinity for actin during the actomyosin ATPase cycle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. Vol. 394, № 1. P. 126–129.

11. *Bagshaw C.R., Reed G.H.* The significance of the slow dissociation of divalent metal ions from myosin “regulatory” light chains // *FEBS Lett.* 1977. Vol. 81, № 2. P. 386–390.

12. *Bagshaw C.R., Kendrick-Jones J.* Characterization of homologous divalent metal ion binding sites of vertebrate and molluscan myosins using electron paramagnetic resonance spectroscopy // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 130, № 3. P. 317–336.

13. *Bailey K.* Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril // *Biochem. J.* 1948. Vol. 43. P. 271–279.

14. *Bailey K.* The proteins of adductor muscles // *Pubbl. Della Stn. Zool. di Napoli* 1956. Vol. 29. P. 96–108.

15. *Barany M., Barany K.* Myosin from the striated adductor muscle of scallop (*Pecten irradians*) // *Biochem. Zeitschrift.* 1966. Vol. 345, № 1. P. 37–56.

16. *Bárány M.* ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening // *J. Gen. Physiol.* 1967. Vol. 50, № 6. P. 197–218.

17. *Bartegi A., Fattoum A., Derancourt J., Kassab R.* Characterization of the Carboxyl-terminated 10-kDA Gyanogen Bromide Fragment of Caldesmon as an Actin-Calmodulin-binding Region // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, № 25. P. 15231–15238.

18. *Bartegi A., Roustan C., Bertrand R., Kassab R., Fattoum A.* Interaction of caldesmon with actin subdomain-2 // *Eur. J. Biochem.* 1998. Vol. 254, № 3. P. 571–579.

19. *Bear R.S.* X-Ray Diffraction Studies on Protein Fibers. II. Feather Rachis, Porcupine Quill Tip and Clam Muscle // *J. Am. Chem. Soc.* 1944. Vol. 66, № 12. P. 2043–2050.
20. *Bear R.S.* Small angle x-ray diffraction studies on muscle // *J. Am. Chem. Soc.* 1945. Vol. 67, № 9. P. 1625–1626.
21. *Bear R.S., Selby C.C.* The structure of paramyosin fibrils according to x-ray diffraction // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1956. Vol. 2, № 1. P. 55–69.
22. *Benian G.M., Kiff J.E., Neckelmann N., Moerman D.G., Waterston R.H.* Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in *C. elegans* // *Nature.* 1989. Vol. 342, № 6245. P. 45–50.
23. *Benian G.M., Tang X.X., Tinley T.L.* Twitchin and related giant Ig superfamily members of *C. elegans* and other invertebrates // *Adv. Biophys.* 1996. Vol. 33. P. 183–198.
24. *Benian G.M., Tinley T.L., Tang X., Borodovsky M.* The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-89*, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains // *J. Cell Biol.* 1996. Vol. 132, № 5. P. 835–848.
25. *Bennett P.M., Elliott A.* The “catch” mechanism in molluscan muscle: an electron microscopy study of freeze-substituted anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1989. Vol. 10, № 4. P. 297–311.
26. *Bennett P.M., Marston S.B.* Calcium regulated thin filaments from molluscan catch muscles contain a caldesmon-like regulatory protein // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1990. Vol. 312, № 4. P. 302–312.
27. *Bogatcheva N.V., Gusev N.B.* Interaction of smooth muscle calponin with phospholipids // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 371, № 2. P. 123–126.
28. *Boussouf S.E., Maytum R., Jaquet K., Geeves M.A.* Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2007. Vol. 28, № 1. P. 49–58.

29. *Bronson D.D., Schachat F.H.* Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257, № 7. P. 3937–3944.
30. *Butler T., Siegman M.* Mechanism of catch force: tethering of thick and thin filaments by twitchin // *Biomed Res. Int.* 2010.
31. *Butler T.M., Mooers S.U., Li C.Q., Narayan S., Siegman M.J.* Regulation of catch muscle by twitchin phosphorylation: Effects on force, ATPase, and shortening // *Biophys. J.* 1998. Vol. 75, № 4. P. 1904–1914.
32. *Butler T.M., Mooers S.U., Siegman M.J.* Catch force links and the low to high force transition of myosin // *Biophys. J.* 2006. Vol. 90, № 9. P. 3193–3202.
33. *Butler T.M., Siegman M.J.* A force-activated kinase in a catch smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2011. Vol. 31, № 5-6. P. 349–358.
34. *Castagnone-Sereno P., Leroy F., Abad P.* cDNA cloning and expression analysis of a calponin gene from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001. Vol. 112, № 1. P. 149–152.
35. *Castellani L., Cohen C.* A calcineurin-like phosphatase is required for catch contraction // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 309, № 3. P. 321–326.
36. *Castellani-Ceresa L., Lanzavecchia G.* Isolation and identification of paramyosin from amphioxus notochord // *J. of Muscle Res. Cell Motil.* 1982. Vol. 3, № 1. P. 75–85.
37. *Chantler P.* Biochemical and structural aspects of molluscan muscle // *Mollusca Acad. Press, London* 1983. Vol. 4. P. 77–154.
38. *Chantler P.* Scallop adductor muscles: structure and function // *Dev. Aquac. Fish. Sci.* 2006. P. 229–316.
39. *Chantler P.D., Szent-Gyorgyi A.G.* Spectroscopic studies on invertebrate myosins and light chains // *Biochem.* 1978. Vol. 17, № 25. P. 5440–5448.
40. *Chantler P.D., Szent-Gyorgyi A.G.* Regulatory light-chains and scallop myosin: full dissociation, reversibility and co-operative effects // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 138. P. 473–492.

41. *Chantler P.D.* Scallop adductor muscles: structure and function // *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Amsterdam: Elsevier Science. 2011. P. 229–317.
42. *Chiba S., Ojima T., Nishita K.* Absence of Troponin in Foot Muscle of Surf Clam *Pseudocardium sachalinensis* // *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992. Vol. 58. P. 1919–1923.
43. *Childs T.J., Watson M.H., Novy R.E., Lin J.J.C., Mak A.S.* Calponin and tropomyosin interactions // *Biochim. Biophys. Acta* 1992. Vol. 1121, № 1-2. P. 41–46.
44. *Cho Y.J., Liu J., Hitchcock-degregori S.E.* The Amino Terminus of Muscle Tropomyosin Is a Major Determinant for Function // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, № 1. P. 538–545.
45. *Cohen C., Longley W.* Tropomyosin paracrystals formed by divalent cations // *Science*. 1966. Vol. 152, № 3723. P. 794–796.
46. *Cohen C., Szent-Gyorgyi A.G., Kendrick-Jones J.* Paramyosin and the filaments of molluscan “catch” muscles. I. Paramyosin: structure and assembly // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 56. P. 223–237.
47. *Cornelius F.* The regulation of tension in a chemically skinned molluscan smooth muscle: effect of Mg^{2+} on the Ca^{2+} -activated tension generation // *J. Gen. Physiol* 1980. Vol. 75, № 6. P. 709–725.
48. *Craig R., Szent-Györgyi A.G., Beese L., Flicker P., Vibert P., Cohen C.* Electron microscopy of thin filaments decorated with a Ca^{2+} -regulated myosin // *J. Mol. Biol.* 1980. Vol. 140, № 1. P. 35–55.
49. *Csizmádia A.M., Bonetkerrache A., Nyitray L., Mornet D., Bonet-Kerrache A.* Purification and properties of caldesmon-like protein from molluscan smooth muscle // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1994. Vol. 108, № 1. P. 59–63.
50. *Cummins P., Perry S.V.* The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin // *Biochem. J.* 1973. Vol. 133, № 4. P. 765–777.
51. *Dobrzhanskaya A.V., Matusovskaya G.G., Matusovsky O.S., Shelud’ko N.S.* Thin filaments of bivalve smooth muscle may contain a calponin-like protein // *Biophysics (Oxf)*. 2010. Vol. 55, № 5. P. 703–706.

52. *Dobrzhanskaya A.V., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S.* Molluscan smooth catch muscle contains calponin but not caldesmon // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. Vol. 34, № 1. P. 23–33.
53. *Dreizen P., Gershman L.C.* Relationship of structure to function in myosin. II. Salt denaturation and recombination experiments // *Biochemistry.* 1970. Vol. 9, № 8. P. 1688–1693.
54. *Ebachi S., Kodama A., Ebashi F.* Troponin. I. Preparation and physiological function // *J. Biochem.* 1968. Vol. 64, № 4. P. 465–477.
55. *Ebashi S.* Troponin and its components // *J. Biochem* 1971. Vol. 66, № 2. P. 441–445.
56. *Egelman E.H., Francis N., DeRosier D.J.* F-actin is a helix with a random variable twist // *Nature.* 1982. Vol. 298, № 5870. P. 131–135.
57. *Egelman E.H.* The structure of F-actin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1985. Vol. 6, № 2. P. 129–151.
58. *Eisenberg E., Kielley W.W.* Column chromatographic separation and activity of the three active troponin components with and without troponin-tropomyosin complex // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, № 15. P. 4742–4748.
59. *Elliott A.* Structure of molluscan thick filaments: a common origin for diverse appearances // *J.Mol.Biol.* 1979. Vol. 132, № 3. P. 323–340.
60. *Elzinga M., Collins J.H., Kuehl W.M., Adelstein R.S.* Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1973. Vol. 70, № 9. P. 2687–2691.
61. *Endo T., Obinata T.* Troponin and its components from ascidian smooth muscle // *J. Biochem.* 1981. Vol. 89, № 5. P. 1599–1608.
62. *Epstein H.F., Aronow B.J., Harris H.E.* Myosin-paramyosin cofilaments: enzymatic interactions with F-actin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1976. Vol. 73, № 9. P. 3015–3019.

63. *Ferjani I., Fattoum A., Maciver S.K., Bénistant C., Chahinian A., Manai M., Benyamin Y., Roustan C.* A direct interaction with calponin inhibits the actin-nucleating activity of gelsolin // *Biochem. J.* 2006. Vol. 396, № 3. P. 461–468.
64. *Fiske C.H., Subbarow Y.* The colorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66. P. 375–400.
65. *Flicker P., Wallimann T., Vibert P.* Location of regulatory light-chains in scallop myosin // *Biophys. J.* 1981. Vol. 33. P. 279.
66. *Flicker P.F., Phillips G.N., Cohen C.* Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study // *J. Mol. Biol.* 1982. Vol. 162, № 2. P. 495–501.
67. *Focant B., Huriaux F.* Light chains of carp and pike skeletal muscle myosins. Isolation and characterization of the most anodic light chain on alkaline pH electrophoresis // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 65, № 1. P. 16–19.
68. *Fujii T., Koizumi Y.* Identification of the binding region of basic calponin on alpha and beta tubulins // *J. Biochem.* 1999. Vol. 125, № 5. P. 869–875.
69. *Funabara D., Kinoshita S., Watabe S., Siegman M.J., Butler T.M., Hartshorne D.J.* Phosphorylation of molluscan twitchin by the cAMP-dependent protein kinase // *Biochem. U.S.A.* 2001. Vol. 40, № 7. P. 2087–2095.
70. *Funabara D., Nakaya M., Watabe S., Article O.* Isolation and characterization of a novel 45 kDa calponin-like protein from anterior byssus retractor muscle of the mussel *Mytilus galloprovincialis* // *Fish. Sci.* 2001. Vol. 67, № 3. P. 511–517.
71. *Funabara D., Watabe S., Mooers S.U., Narayan S., Dudas C., Hartshorne D.J., Siegman M.J., Butler T.M.* Twitchin from molluscan catch muscle: primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 31. P. 29308–29316.
72. *Funabara D., Kanoh S., Siegman M.J., Butler T.M., Hartshorne D.J., Watabe S.* Twitchin as a regulator of catch contraction in molluscan smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2005. Vol. 26, № 6-8. P. 455–460.

73. Funabara D., Hamamoto C., Yamamoto K., Inoue A., Ueda M., Osawa R., Kanoh S., Hartshorne D.J., Suzuki S., Watabe S. Unphosphorylated twitchin forms a complex with actin and myosin that may contribute to tension maintenance in catch // *J. exp. Biol.* 2007. Vol. 210, № 24. P. 4399–4410.
74. Funabara D., Osawa R., Ueda M., Kanoh S., Hartshorne D.J., Watabe S. Myosin loop 2 is involved in the formation of a trimeric complex of twitchin, actin, and myosin // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 27. P. 18015–18020.
75. Funabara D., Watanabe D., Satoh N., Kanoh S. Genome-wide survey of genes encoding muscle proteins in the pearl oyster, *Pinctada fucata* // *Zoolog. Sci.* 2013. Vol. 30, № 10. P. 817–825.
76. Galinska-Rakoczy A., Engel P., Xu C., Jung H., Craig R., Tobacman L.S., Lehman W. Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 379, № 5. P. 929–935.
77. Galler S., Höpflinger M., Andruchov O., Hopflinger M.C., Andruchova O., Grassberger H. Effects of vanadate, phosphate and 2,3-butanedione monoxime (BDM) on skinned molluscan catch muscle // *Pflugers Arch.* 2005. Vol. 449, № 4. P. 372–383.
78. Galler S., Litzlbauer J., Kröss M., Grassberger H. The highly efficient holding function of the mollusc “catch” muscle is not based on decelerated myosin head cross-bridge cycles // *Proc. Biol. Sci.* 2010. Vol. 277, № 1682. P. 803–808.
79. Gimona M., Small J.V. Calponin // *Biochem. Smooth Muscle Contract.* 1996. P. 91–103.
80. Goldberg A., Lehman W. Troponin-like proteins from muscles of the scallop, *Aequipecten irradians* // *Biochem. J.* 1978. Vol. 171, № 2. P. 413–418.
81. Gordon A.M., Homsher E., Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle // *Physiol. Rev.* 2000. Vol. 80, № 2. P. 853–924.
82. Graceffa P., Adam L.P., Morgan K.G. Strong interaction between caldesmon and calponin // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 48. P. 30336–30339.

83. *Gräter F., Shen J., Jiang H., Gautel M., Grubmüller H.* Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88, № 2. P. 790–804.
84. *Greaser M.L., Gergely J.* Reconstitution of troponin activity from three protein components // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246, № 13. P. 4226–4233.
85. *Greaser M.L., Yamaguchi M., Brekke C., Potter J., Gergely J.* Troponin Subunits and Their Interactions // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1973. Vol. 37 . P. 235–244.
86. *Greaser M.L., Gergely J.* Purification and Properties of the Components from Troponin // *J. Biol. Chem.* 1973. Vol. 248. P. 2125–2133.
87. *Greene L.E., Williams D.L., Eisenberg E.* Regulation of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin: effect of the binding of the myosin subfragment 1 (S-1) ATP complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987. Vol. 84, № 10. P. 3102–3106.
88. *Gunning P.W., Schevzov G., Kee A.J., Hardeman E.C.* Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function // *Trends Cell Biol.* 2005. Vol. 15, № 6. P. 333–341.
89. *Gunning P.W.* Tropomyosin // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* New York, NY: Springer New York. 2008. Vol. 644. P. 304.
90. *Hardwicke P.M., Hanson J.* Separation of thick and thin myofilaments // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 59, № 3. P. 509–516.
91. *Harrison R.G., Lowey S., Cohen C.* Assembly of myosin // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 59. P. 531–535.
92. *Holmes K.C., Lehman W.* Gestalt-binding of tropomyosin to actin filaments // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2008. Vol. 29, № 6-8. P. 213–219.
93. *Hooper S.L., Thuma J.B.* Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85, № 3. P. 1001–1060.
94. *Hooper S.L., Hobbs K.H., Thuma J.B.* Invertebrate muscles: Thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle // *Prog. Neurobiol.* 2008. Vol. 86, № 2. P. 72–127.

95. *Houdusse A., Cohen C.* Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 angstrom resolution: Implications for regulation // *Structure*. 1996. Vol. 4, № 1. P. 21–32.
96. *Huxley A.F., Niedergerke R.* Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres // *Nature*. 1954. Vol. 173, № 4412. P. 971–973.
97. *Huxley H.E.* Structural Changes in the Actin- and Myosin-containing Filaments during Contraction // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1973. Vol. 37. P. 361–376.
98. *Ikemoto N., Kawaguti S.* Elongating Effect of Tropomyosin A on the Thick Myofilaments in the Long-Sarcomere Muscle of the Horse-Shoe Crab // *Proc. Jpn. Acad.* 1967. Vol. 43, № 10. P. 974–979.
99. *Inoue A., Ojima T., Nishita K.* Cloning and sequencing of a cDNA for Akazara scallop troponin T // *J. Biochem.* 1996. Vol. 120, № 4. P. 834–837.
100. *Irvine M., Huima T., Prince A.M., Lustigman S.* Identification and characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a highly immunogenic calponin-like protein // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994. Vol. 65, № 1. P. 135–146.
101. *Ishii Y., Lehrer S.S.* Mg²⁺-paracrystal formation of tropomyosin as a condensation phenomenon. Effects of pH, salt, temperature, and troponin binding // *Biophys. J.* 1989. Vol. 56, № 1. P. 107–114.
102. *Jakes R., Northrop F., Kendrick J.* Calcium binding regions of myosin “regulatory” light chains // *FEBS Lett.* 1976. Vol. 70, № 1. P. 229–234.
103. *Janco M., Suphamungmee W., Li X., Lehman W., Lehrer S.S., Geeves M.A.* Polymorphism in tropomyosin structure and function // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. Vol. 34, № 3-4. P. 177–187.
104. *Jaworowski A., Anderson K.I., Arner A., Engstrom M., Gimona M., Strasser P., Small J.V.* Calponin reduces shortening velocity in skinned taenia coli smooth muscle fibres // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 365, № 2-3. P. 167–171.

105. *Johnson W.H., Kahn J.S.* Titration of the protein paramyosin // *Science*. 1959. Vol. 130, № 3383. P. 1190–1191.
106. *Jones M.K., Yang W., Mcmanus D.P.* Immunolocalization of the 38.3 kDa calponin-like protein in stratified muscles of the tail of *Schistosoma japonicum* cercariae // *Parasitol. Int.* 2001. Vol. 50, № 2. P. 129–133.
107. *Kalyva A., Schmidtmann A., Geeves M.A.* In vitro formation and characterization of the skeletal muscle $\alpha\cdot\beta$ tropomyosin heterodimers // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51, № 32. P. 6388–6399.
108. *Kendrick-Jones J., Cohen C., Szent-Györgyi A.G., Longley W.* Paramyosin: molecular length and assembly // *Science*. 1969. Vol. 163, № 872. P. 1196–1198.
109. *Kendrick-Jones J., Lehman W.* Regulation in molluscan muscles // *J. Mol. Biol.* 1970. Vol. 54. P. 313–326.
110. *Klee C.B., Draetta G.F., Hubbard M.J.* Calcineurin // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1988. Vol. 61. P. 149–200.
111. *Kondo S., Asakawa T., Morita F.* Difference UV-absorption spectrum of scallop adductor myosin induced by ATP // *J. Biochem.* 1979. Vol. 86, № 5. P. 1567–1571.
112. *Laemmli U.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
113. *Lehman W., Szent-Györgyi G.* Activation of the adenosine triphosphatase of *Limulus polyphemus* actomyosin by tropomyosin // *J. Gen. Physiol.* 1972. Vol. 59, № 4. P. 375–387.
114. *Lehman W., Kendrick-Jones J., Szent-Györgyi A.G.* Myosin-linked Regulatory Systems: Comparative Studies // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1973. Vol. 37. P. 319–330.
115. *Lehman W., Szent-Györgyi A.G.* Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom // *J. Gen. Physiol.* 1975. Vol. 66, № 1. P. 1–30.
116. *Lehman W., Regenstein J., Ransom A.* The stoichiometry of the components of arthropod thin filaments // *Biochim. Biophys. Acta.* 1976. Vol. 434. P. 215–222.

117. *Lehman W.* Calcium ion-dependent myosin from decapod-crustacean muscles // *Biochem. J.* 1977. Vol. 163, № 2. P. 291–296.
118. *Lehman W., Head J.F., Grant P.W.* The stoichiometry and location of troponin I- and troponin C-like proteins in the myofibril of the bay scallop, *Aequipecten irradians* // *Biochem. J.* 1980. Vol. 187, № 2. P. 447–456.
119. *Lehman W.* Thin-filament-linked regulation in molluscan muscles // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. Vol. 668, № 3. P. 349–356.
120. *Lehman W.* The distribution of troponin-like proteins on thin filaments of the bay scallop, *aequipecten irradians* // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1983. Vol. 4, № 3. P. 379–389.
121. *Lehman W., Craig R.* Tropomyosin and the steric mechanism of muscle regulation // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. Vol. 644. P. 95–109.
122. *Lehman W., Galinska-Rakoczy A., Hatch V., Tobacman L.S., Craig R.* Structural basis for the activation of muscle contraction by troponin and tropomyosin // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 388, № 4. P. 673–681.
123. *Lehman W., Orzechowski M., Li X.E., Fischer S., Raunser S.* Gestalt-Binding of tropomyosin on actin during thin filament activation // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. Vol. 34, № 3-4. P. 155–163.
124. *Lehman W., Medlock G., Li X., Suphamungmee W., Tu A.-Y., Schmidtman A., Ujfalusi Z., Fischer S., Moore J.R., Geeves M.A., Regnier M.* Phosphorylation of Ser283 enhances the stiffness of the tropomyosin head-to-tail overlap domain // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. Vol. 571. P. 10–15.
125. *Leinweber B.D., Leavis P.C., Grabarek Z., Wang C.L.A., Morgan K.G.* Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins // *Biochem. J.* 1999. Vol. 123. P. 117–123.
126. *Levine R.J., Elfvin M., Dewey M.M., Walcott B.* Paramyosin in invertebrate muscles. II. Content in relation to structure and function // *J. Cell Biol.* 1976. Vol. 71, № 1. P. 273–279.

127. *Lin Y., Ishikawa R., Kohama K.* Role of Myosin in the Stimulatory Effect of Caldesmon on the Interaction Between Actin, Myosin, and ATP // *J. Biochem. Tokyo.* 1993. Vol. 114, № 2. P. 279–283.
128. *Lowey S., Slayter H.S., Weeds A.G., Baker H.* Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation // *J. Mol. Biol.* 1969. Vol. 42, № 1. P. 1–29.
129. *Lowy J.* Contraction and relaxation in the adductor muscles of *Mytilus edulis* // *J. Physiol.* 1953. Vol. 120, № 1-2. P. 129–140.
130. *Lowy J., Millman B.M., Hanson J.* Structure and function in smooth tonic muscles of lamellibranch muscle molluscs // *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 1964. Vol. 160. P. 525–536.
131. *Lowy J., Vibert P.J.* Structure and organization of actin in a molluscan smooth muscle // *Nature.* 1967. Vol. 215, № 5107. P. 1254–1255.
132. *Mabuchi K., Li Y.H., Tao T., Wang C.L.A.* Immunocytochemical localization of caldesmon and calponin in chicken gizzard smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1996. Vol. 17, № 2. P. 243–260.
133. *Maeda Y., Matsubara I., Yagi N.* Structural changes in thin filaments of crab striated muscle // *J. Mol. Biol.* 1979. Vol. 127, № 2. P. 191–201.
134. *Mak A.S., Smillie L.B.* Non-polymerizable tropomyosin: preparation, some properties and F-actin binding // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. Vol. 101, № 1. P. 208–214.
135. *Makuch R., Birukov K., Shirinsky V., Dabrowska R.* Functional interrelationship between calponin and caldesmon // *Biochem. J.* 1991. Vol. 280. P. 33–38.
136. *Marston S.B.* Properties of calponin isolated from sheep aorta thin filaments // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 292, № 1-2. P. 179–182.
137. *Martin R.M., Gasser R.B., Jones M.K., Lightowers M.W.* Identification and characterization of myophilin, a muscle-specific antigen of *Echinococcus granulosus* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995. Vol. 70, № 1-2. P. 139–148.

138. *Martin R.M., Chilton N.B., Lightowers M.W., Gasser R.B. Echinococcus granulosus myophilin – Relationship with protein homologues containing “calponin-motifs” // Int. J. Parasitol. 1997. Vol. 27, № 12. P. 1561–1567.*
139. *Martin R.M., Csar X.F., Gasser R.B., Felleisen R., Lightowers M.W. Myophilin of Echinococcus granulosus: isoforms and phosphorylation by protein kinase C // Parasitology. 1997. Vol. 115, № 2. P. 205–211.*
140. *Matthew J.D., Khromov A.S., Smolyo A. V, Somlyo A.P., Karaki H., Tsuchiya T., Takahashi K. Ca²⁺-sensitization of smooth muscle in calponin knockout mouse // Biophys. J. 2000. Vol. 78, № 1. P. 110–110.*
141. *Matusovsky O.S., Shelud’ko N.S., Permyakova T. V, Zukowska M., Sobieszek A. Catch muscle of bivalve molluscs contains myosin- and twitchin-associated protein kinase phosphorylating myorod // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1804, № 4. P. 884–890.*
142. *Matusovsky O.S., Matusovskaya G.G., Dyachuk V.A., Shelud’ko N.S. Molluscan catch muscle myorod and its N-terminal peptide bind to F-actin and myosin in a phosphorylation-dependent manner // Arch. Biochem. Biophys. 2011. Vol. 509, № 1. P. 59–65.*
143. *McLachlan A.D., Stewart M. The 14-fold periodicity in alpha-tropomyosin and the interaction with actin // J. Mol. Biol. 1976. Vol. 103, № 2. P. 271–298.*
144. *Menice C.B., Hulvershorn J., Adam L.P., Wang C.A., Morgan K.G. Calponin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 40. P. 25157–25161.*
145. *Mihalyi E., Szent-Gyorgyi A.G. Trypsin digestion of muscle proteins. I. Ultracentrifugal analysis of the process // J. Biol. Chem. 1953. Vol. 201, № 1. P. 189–196.*
146. *Mihalyi E., Szent-Gyorgyi A.G. Trypsin digestion of muscle proteins. III. Adenosinetriphosphatase activity and actinbinding capacity of the digested myosin // J. Biol. Chem. 1953. Vol. 201, № 1. P. 211–219.*

147. *Millward G.R., Woods E.F.* Crystals of tropomyosin from various sources // *J. Mol. Biol.* 1970. Vol. 52, № 3. P. 585–588.
148. *Moerman D.G., Benian G.M., Barstead R.J., Schriefer L.A., Waterston R.H.* Identification and intracellular localization of the unc-22 gene product of *Caenorhabditis elegans* // *Genes Dev.* 1988. Vol. 2, № 1. P. 93–105.
149. *Murakami K., Stewart M., Nozawa K., Tomii K., Kudou N., Igarashi N., Shirakihara Y., Wakatsuki S., Yasunaga T., Wakabayashi T.* Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin-T // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105, № 20. P. 7200–7205.
150. *Nakamura F., Mino T., Yamamoto J., Naka M., Tanaka T.* Identification of the regulatory site in smooth muscle calponin that is phosphorylated by protein kinase C // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 9. P. 6194–6201.
151. *Nakamura T., Yamaguchi M., Yanagisawa T.* Comparative studies on actins from various sources. Fragments of actins from *Ascaris* muscle cleaved at cysteinyl residues in comparison with those of other actins // *J. Biochem.* 1979. Vol. 85, № 3. P. 627–631.
152. *Nevzorov I.A., Nikolaeva O.P., Kainov Y.A., Redwood C.S., Levitsky D.I.* Conserved noncanonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 18. P. 15766–15772.
153. *Newman J., Carlson F.D.* Dynamic light-scattering evidence for the flexibility of native muscle thin filaments // *Biophys. J.* 1980. Vol. 29, № 1. P. 37–47.
154. *Nigam R., Triggle C.R., Jin J.P.* H1- and h2-calponins are not essential for norepinephrine- or sodium fluoride-induced contraction of rat aortic smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1998. Vol. 19, № 6. P. 695–703.
155. *Nishida W., Abe M., Takahashi K., Hiwada K.* Do thin filaments of smooth muscle contain calponin? A new method for the preparation // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 268, № 1. P. 165–168.
156. *Nishita K., Tanaka H., Ojima T.* Amino acid sequence of troponin C from scallop striated adductor muscle // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 5. P. 3464–3468.

157. *Nishita K., Ojima T., Takahashi A., Inoue A.* Troponin from smooth adductor muscle of Ezo-giant scallop // *J. Biochem.* 1997. Vol. 121, № 3. P. 419–424.
158. *North A.J., Gimona M., Cross R.A., Small J.V.* Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells // *J. Cell Sci.* 1994. Vol. 107, № 3. P. 437–444.
159. *O'Brien E.J., Bennett P.M., Hanson J.* Optical diffraction studies of myofibrillar structure // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1971. Vol. 261, № 837. P. 201–208.
160. *O'Brien E.J., Gillis J.M., Couch J.* Symmetry and molecular arrangement in paracrystals of reconstituted muscle thin filaments // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 99, № 3. P. 461–475.
161. *Odintsova N., Dyachuk V., Kiselev K., Shelud'ko N.* Expression of thick filament proteins during ontogenesis of the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia) // *Comp. Biochem. B – Biochem.* 2006. Vol. 144, № 2. P. 238–244.
162. *Ojima T., Nishita K.* Isolation of troponins from striated and smooth adductor muscles of Akazara scallop // *J. Biochem.* 1986. Vol. 100, № 3. P. 821–824.
163. *Ojima T., Nishita K.* Troponin from Akazara scallop striated adductor muscles // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, № 35. P. 16749–16754.
164. *Ojima T., Nishita K.* Biochemical characteristics of the Mr 52,000 component of Akazara scallop troponin // *J. Biochem.* 1988. Vol. 104, № 2. P. 207–210.
165. *Ojima T., Nishita K.* Comparative studies on biochemical characteristics of troponins from ezo-giant scallop (*Patinopecten yessoensis*) and akazara scallop (*Chlamys nipponensis akazara*) // *Comp. Biochem. Physiol. – B Biochem. Mol. Biol.* 1992. Vol. 103, № 3. P. 727–732.
166. *Ojima T., Ohta T., Nishita K.* Amino acid sequence of squid troponin C // *Comp. Biochem. B – Biochem.* 2001. Vol. 129, № 4. P. 787–796.
167. *Oshino T., Shimamura J., Fukuzawa A., Maruyama K., Kimura S.* The entire cDNA sequences of projectin isoforms of crayfish claw closer and flexor muscles and their localization // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2003. Vol. 24, № 7. P. 431–438.

168. *Parker C.A., Takahashi K., Tang J.X., Tao T., Morgan K.G., Division C., Israel B., Medical D., Medical H.* Cytoskeletal targeting of calponin in differentiated, contractile smooth muscle cells of the ferret // *J. Physiol* 1998. Vol. 508, № 1. P. 187–198.
169. *Parnas J.* Energetik glatter Muskeln // *Pfluegers Arch. Ges. Physiol.* 1910. Vol. 134. P. 441–495.
170. *Pepe F.A., Drucker B., Chowrashi P.K.* The myosin filament: XI. Filament assembly // *Prep. Biochem.* 1986. Vol. 16, № 2. P. 99–132.
171. *Perry S.V.* Proteins in muscular contraction // *Lect. Sci. Basis Med.* 1955. Vol. 5. P. 314–332.
172. *Phillips G.N., Lattman E.E., Cummins P., Lee K.Y., Cohen C.* Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin // *Nature.* 1979. Vol. 278, № 5703. P. 413–417.
173. *Phillips G.N., Fillers J.P., Cohen C.* Tropomyosin crystal structure and muscle regulation // *J. Mol. Biol.* 1986. Vol. 192. P. 111–131.
174. *Pollard T.D., Weihing R.R.* Actin and myosin and cell movement // *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1974. Vol. 2, № 1. P. 1–65.
175. *Polyak E., Standiford D.M., Yakopson V., Emerson C.P., Franzini-Armstrong C., Franziniarmstrong C.* Contribution of myosin rod protein to the structural organization of adult and embryonic muscles in *Drosophila* // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 331, № 5. P. 1077–1091.
176. *Potter J.D.* The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils // *Arch. Biochem. Biophys.* 1974. Vol. 162, № 3. P. 436–441.
177. *Reedy M.K., Goody R.S., Hofmann W., Rosenbaum G.* Co-ordinated electron microscopy and X-ray studies of glycerinated insect flight muscle. I. X-ray diffraction monitoring during preparation for electron microscopy of muscle fibres fixed in rigor, in ATP and in AMPPNP // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1983. Vol. 4, № 1. P. 25–53.

178. *Rees M., Young M.* Studies on the Isolation and Molecular Properties of Homogeneous Globular Actin: Evidence for a A single Polypeptide Chain Structure // *J. Biol. Chem.* 1967. Vol. 242. P. 4449–4458.
179. *Royuela M., Fraile B., Picazo M.L., Paniagua R.* Immunocytochemical electron microscopic study and Western blot analysis of caldesmon and calponin in striated muscle of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in several muscle cell types of the earthworm *Eisenia foetida* // *Eur. J. Cell Biol* 1997. Vol. 72, № 1. P. 90–94.
180. *Royuela M., Fraile B., Arenas M.I., Paniagua R.* Characterization of several invertebrate muscle cell types: a comparison with vertebrate muscles // *Microsc. Res. Tech.* 2000. Vol. 48, № 2. P. 107–115.
181. *Rozenblum G.T., Gimona M.* Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton // *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2008. Vol. 40, № 10. P. 1990–1995.
182. *Ruegg J.C.* On the effect of inhibiting the actin-myosin interaction on the viscous tone of a lamellibranch catch muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1961. Vol. 154, № 955. P. 224–249.
183. *Ruiz T., Bullard B., Lepault J.* Effects of calcium and nucleotides on the structure of insect flight muscle thin filaments // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1998. Vol. 19, № 4. P. 353–364.
184. *Schaub M.C., Perry S.V.* The relaxing protein system of striated muscle. Resolution of the troponin complex into inhibitory and calcium ion-sensitizing factors and their relationship to tropomyosin // *Biochem. J.* 1969. Vol. 115, № 5. P. 993–1004.
185. *Shelud'ko N., Permjakova T., Tuturova K., Neverkina O., Drozdov a, Ko N.S.* Myorod, a thick filament protein in molluscan smooth muscles: isolation, polymerization and interaction with myosin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2001. Vol. 22, № 1. P. 91–100.
186. *Shelud'ko N.S., Tuturova K.P.F., Permyakova T. V, Orlova A.A.* Thick filaments in smooth muscles of bivalve molluscs contain an unknown protein // *Biophys. J.* 1998. Vol. 74, № 2. P. 262–262.

187. *Shelud'ko N.S., Tuturova K.F., Permyakova T.V., Plotnikov S.V., Orlova A.A.* A novel thick filament protein in smooth muscles of bivalve molluscs // *Comp. Biochem. Physiol. B – Biochem. Mol. Biol.* 1999. Vol. 122, № 3. P. 277–285.
188. *Shelud'ko N.S., Matusovskaya G.G., Permyakova T. V, Matusovsky O.S.* Twitchin, a thick-filament protein from molluscan catch muscle, interacts with F-actin in a phosphorylation-dependent way // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. Vol. 432, № 2. P. 269–277.
189. *Shelud'ko N.S., Matusovsky O.S., Permyakova T. V, Matusovskaya G.G.* “Twitchin-actin linkage hypothesis” for the catch mechanism in molluscan muscles: evidence that twitchin interacts with myosin, myorod, and paramyosin core and affects properties of actomyosin // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. Vol. 466, № 1. P. 125–135.
190. *Shirinsky V.P., Biryukov K.G., Hettasch J.M., Sellers J.R.* Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, № 22. P. 15886–15892.
191. *Siegman M.J., Mooers S.U., Li C., Narayan S., Trinkle-Mulcahy L., Watabe S., Hartshorne D.J., Butler T.M.* Phosphorylation of a high molecular weight (approximately 600 kDa) protein regulates catch in invertebrate smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1997. Vol. 18, № 6. P. 655–670.
192. *Siegman M.J., Funabara D., Kinoshita S., Watabe S., Hartshorne D.J., Butler T.M., Group M.B.* Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 9. P. 5383–5388.
193. *Small J.V., Gimona M.* The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell // *Acta Physiol Scand.* 1998. Vol. 164, № 4. P. 341–348.
194. *Sobieszek A.* The fine structure of the contractile apparatus of the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* // *J. Ultrastruct. Res.* 1973. Vol. 43, № 3. P. 313–343.
195. *Sobieszek A., Small J.V.* Effect of muscle and non-muscle tropomyosins in reconstituted skeletal muscle actomyosin // *Eur. J. Biochem.* 1981. Vol. 118, № 3. P. 533–539.

196. *Sobieszek A., Matusovsky O.S., Permyakova T.V., Sarg B., Lindner H., Shelud'ko N.S.* Phosphorylation of myosin (catchin) by kinases tightly associated to molluscan and vertebrate smooth muscle myosins // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. Vol. 454, № 2. P. 197–205.
197. *Sousa A.D., Farah C.S.* Quantitative analysis of tropomyosin linear polymerization equilibrium as a function of ionic strength // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 3. P. 2081–2088.
198. *Sperling J.E., Feldmann K., Meyer H., Jahnke U., Heilmeyer L.M.* Isolation, characterization and phosphorylation pattern of the troponin complexes TI 2C and I 2C // *Eur. J. Biochem.* 1979. Vol. 101, № 2. P. 581–592.
199. *Spudich J., Watt S.* The regulation of rabbit skeletal muscle contraction I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin // *J. Biol. Chem.* 1971. Vol. 246. P. 4866–4871.
200. *Stafford W.F., Szentkiralyi E.M., Szent-Györgyi A.G.* Regulatory properties of single-headed fragments of scallop myosin // *Biochemistry.* 1979. Vol. 18, № 24. P. 5273–5280.
201. *Standiford D.M., Davis M.B., Miedema K., Franziniarmstrong C., Emerson C.P.* Myosin rod protein: A novel thick filament component of *Drosophila muscle* // *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 265, № 1. P. 40–55.
202. *Stone D., Smillie L.B.* The amino acid sequence of rabbit skeletal alpha-tropomyosin. The NH₂-terminal half and complete sequence // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253, № 4. P. 1137–1148.
203. *Strasser P., Gimona M., Moessler H., Herzog M., Small J.V.* Mammalian Calponin – Identification and Expression of Genetic Variants // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 330, № 1. P. 13–18.
204. *Szent-Gyorgyi A.G., Cohen C., Kendrick-Jones J.* Paramyosin and the filaments of molluscan “catch” muscles; 2. Native filaments: Isolation and characterization // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 56. P. 239–258.

205. *Szent-Györgyi A.G., Kendrick-Jonas J.* The light chains of scallop myosin as regulatory subunits // *J. Mol. Biol.* 1973. Vol. 74, № 2. P. 179–203.
206. *Szymanski P.T., Program P.* Calponin (CaP) as a latch-bridge protein — a new concept in regulation of contractility in smooth muscles // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2004. Vol. 25, № 1. P. 7–19.
207. *Tajima Y., Makino K., Hanyuu T.* X-ray evidence for the elongation of thin and thick filaments during isometric contraction of a molluscan smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1994. Vol. 15, № 6. P. 659–671.
208. *Tajima Y., Takahashi W., Ito A.* Small-angle X-ray diffraction studies of a molluscan smooth muscle in the catch state // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2008. Vol. 29, № 1. P. 57–68.
209. *Takahashi K., Hiwada K., Kokubu T.* Isolation and characterization of a 34000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 141, № 1. P. 20–26.
210. *Takahashi K., Yoshimoto R., Fuchibe K., Fujishige A., MitsuSaito M., Hori M., Ozaki H., Yamamura H., Awata N., Taniguchi S., Katsuki M., Tsuchiya T., Karaki H.* Regulation of shortening velocity by calponin in intact contracting smooth muscles // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 279, № 1. P. 150–157.
211. *Tanaka H., Ojima T., Nishita K.* Amino acid sequence of troponin-I from Akazara scallop striated adductor muscle // *J. Biochem.* 1998. Vol. 124, № 2. P. 304–310.
212. *Tang J.X., Janmey P.A.* The polyelectrolyte nature of F-actin and the mechanism of actin bundle formation // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, № 15. P. 8556–8563.
213. *Taniguchi S.* Suppression of cancer phenotypes through a multifunctional actin-binding protein, calponin, that attacks cancer cells and simultaneously protects the host from invasion // *Cancer Sci.* 2005. Vol. 96, № 11. P. 738–746.
214. *Tsao T.C., Bailey K., Adair G.S.* The size, shape and aggregation of tropomyosin particles // *Biochem. J.* 1951. Vol. 49, № 1. P. 27–36.
215. *Tsao T.C., Kung T.H., Peng C.M., Chang Y.S., Tsou Y.S.* Electron microscopical studies of tropomyosin and paramyosin. I. Crystals // *Sci. Sin.* 1965. Vol. 14. P. 91–105.

216. *Tsuchiya T., Yamada N., Mori H., Matsumoto J.J.* Adenosinetriphosphatase activity of squid myosin // *Nippon Suisan Gakkaishi* 1978. Vol. 44. P. 203–207.
217. *Twarog B.M.* The regulation of catch in molluscan muscle // *J. Gen. Physiol.* 1967. Vol. 50, № 6. P. 157–169.
218. *Umasuthan N., Anushka D., Elvitigala S., Saranya K., Lee Y., Whang I., Park M., Lee J.* Identification and in silico analysis of a novel troponin C like gene from *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) and its transcriptional response for calcium challenge // *Gene*. 2013. Vol. 519, № 1. P. 194–201.
219. *Vandekerckhove J., Weber K.* Actin amino-acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin // *Eur. J. Biochem.* 1978. Vol. 90, № 3. P. 451–462.
220. *Vandekerckhove J., Weber K.* The amino acid sequence of actin from chicken skeletal muscle actin and chicken gizzard smooth muscle actin // *FEBS Lett.* 1979. Vol. 102, № 2. P. 219–222.
221. *Vibert P., Szent-Gyorgyi A.G., Craig R., Wray J., Cohen C.* Changes in crossbridge attachment in a myosin-regulated muscle // *Nature*. 1978. Vol. 273. P. 64–66.
222. *Vibert P., Craig R.* 3-Dimensional reconstruction of scallop thick filaments // *Biophys. J.* 1982. Vol. 37, № 2. P. A266–A266.
223. *Vibert P., Edelstein S.M., Castellani L., Elliott B.W., Mofilify C., Elliott W., Chemisfry B.* Mini-titins in striated and smooth molluscan muscles: structure, location and immunological crossreactivity // *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 1993. Vol. 14, № 6. P. 598–607.
224. *Vibert P., Edelstein S., Castellani L., Elliott B.* Location and cross-reactivity of scallop mini titin // *Biophys. J.* 1993. Vol. 64, № 2. P. 25–25.
225. *Vibert P., Craig R., Lehman W.* Steric-model for activation of muscle thin filaments // *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 266, № 1. P. 8–14.
226. *Wallimann T., Szent-Györgyi A.G.* An immunological approach to myosin light-chain function in thick filament linked regulation. 1. Characterization, specificity, and

cross-reactivity of anti-scallop myosin heavy- and light-chain antibodies by competitive, solid-phase radioimmunoassay // *Biochemistry*. 1981. Vol. 20, № 5. P. 1176–1187.

227. *Walsh M.P., Carmichael J.D., Kargacin G.J.* Characterization and confocal imaging of calponin in gastrointestinal smooth muscle // *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 265, № 5. P. 1371–1378.

228. *Wang P.Y., Gusev N.B.* Interaction of smooth muscle calponin and desmin // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 392, № 3. P. 255–258.

229. *Waterston R.H., Thomson J.N., Brenner S.* Mutants with altered muscle structure of *Caenorhabditis elegans* // *Dev. Biol.* 1980. Vol. 77, № 2. P. 271–302.

230. *Weber A., Murray J.M.* Molecular control mechanisms in muscle contraction // *Physiol. Rev.* 1973. Vol. 53, № 3. P. 612–673.

231. *Weeds A.G., Lowey S.* Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 61, № 3. P. 701–725.

232. *Weeds A.G., Taylor R.S.* Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin // *Nature*. 1975. Vol. 257, № 5521. P. 54–56.

233. *Weisel J.W., Szent-Gyorgyi A.G.* The coiled-coil structure: identity of the two chains of *Mercenaria* paramyosin // *J. Mol. Biol.* 1975. Vol. 98, № 4. P. 665–673.

234. *Wills F.L., Mccubbin W.D., Kay C.M.* Smooth Muscle Calponin-Caltropin Interaction – Effect on Biological Activity and Stability of Calponin // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33, № 18. P. 5562–5569.

235. *Winder S.J., Walsh M.P.* Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction // *Cell. Signal.* 1993. Vol. 5, № 6. P. 677–686.

236. *Winder S.J., Walsh M.P.* Calponin // *Curr. Top. Cell. Regul.* 1996. Vol. 34. P. 33–61.

237. *Winder S.J., Allen B.G., Clement-Chomienne O., Walsh M.P.* Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin // *Acta Physiol. Scand.* 1998. Vol. 164, № 4. P. 415–426.

238. *Winkelman L.* Comparative studies of paramyosin // *Comp. Biochem. Physiol.* 1976. Vol. 55 B. P. 391–397.
239. *Woods E.F., Pont M.J.* Characterization of some invertebrate tropomyosins // *Biochemistry.* 1971. Vol. 10, № 2. P. 270–276.
240. *Woods E.F.* The conformational stabilities of tropomyosins // *Aust. J. Biol. Sci.* 1976. Vol. 29, № 5-6. P. 405–418.
241. *Wu K., Jin J.* Calponin in non-muscle cells // *Cell Biochem.* 2008. Vol. 52, № 3. P. 139–148.
242. *Yamada A., Yoshio M., Oiwa K., Nyitray L.* Catchin, a novel protein in molluscan catch muscles, is produced by alternative splicing from the myosin heavy chain gene // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 295, № 2. P. 169–178.
243. *Yamada A., Yoshio M., Nakamura A., Kohama K., Oiwa K.* Protein phosphatase 2B dephosphorylates twitchin, initiating the catch state of invertebrate smooth muscle // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 39. P. 40762–40768.
244. *Yamada A., Yoshio M., Oiwa K.* Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state in vitro // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2013. Vol. 34, № 2. P. 115–123.
245. *Yang W., Zheng Y.Z., Jones M.K., McManus D.P.* Molecular characterization of a calponin-like protein from *Schistosoma japonicum* // *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999. Vol. 98, № 2. P. 225–237.