МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

**«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**(ФГБОУ ВО «КубГУ»)**

**Кафедра биохимии и физиологии**

**КУРСОВАЯ РАБОТА № 1**

**ИЗУЧЕНИЕ ИЗОФОРМНОГО ТАЙТИНА И НЕБУЛИНА В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

Работу выполнила\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Я. А. Юцкевич

(Подпись, дата)

Факультет биологический, курс 3

Направление 06.03.01 Биология

Научный руководитель,

канд. биол. наук,

доцент\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ В. В. Хаблюк

 (Подпись, дата)

Нормоконтролёр,

канд. биол. наук,

доцент\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Н. Н. Улитина

 (Подпись, дата)

Краснодар 2016

РЕФЕРАТ

Курсовая работа 27 с., 2 гл., 27 источников.

САРКОМЕР, N2A-, N2BA-, N2B- и NT-ИЗОФОРМЫ ТАЙТИНА, α- и β-КОННЕКТИН, НЕБУЛИН, КАЛЬПАИН, ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ.

Целью проделанных исследований является выявление роли, функций и особенностей изоформ вышеприведённых белков в поперечно-полосатых мышцах позвоночных в различных условиях.

Работа представляет собой аналитический обзор об исследовании белков поперечно-полосатых мышц позвоночных животных тайтина и небулина, в частности, зимоспящего якутского суслика Spermophilus undulatus.

Для достижения поставленной цели в работах применялись следующие методы исследования: метод Сотериоу с соавт., метод Подлубной с соавт., гель-электрофорез, вестерн-блоттинг, метод обратной транскрипции, метод кругового дихроизма, электронная микроскопия, ионообменная хроматография на ДЕАЕ-сефадексе, метод иммуногистохимии, флуоресцентная микроскопия.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение………………………………………………………………………….......6

1. Аналитический обзор.……………………………………………………………8
	1. Общая характеристика тайтина, его основных изоформ и небулина………………………………………………………………………8
	2. Изучение изоформного состава тайтина и небулина в условиях микрогравитации...........................................................................13
	3. Изучение изоформного состава тайтина в условиях гибернации у зимоспящих позвоночных…………………………………………………14
	4. Изучение изоформного состава тайтина и небулина при патологиях мышечной системы…………………………………………………………15
2. Материал и методы……………………………………………………………..19

Заключение………………………………………………………………………….22

Список использованных источников………………………………...................24

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Гибернация – период замедления жизненных процессов и метаболизма у гомойотермных животных в периоды малодоступности пищи, когда невозможно сохранять активность и высокий уровень метаболизма.

Гипертрофия мышц – увеличение объема или массы мышцы.

Изоформа белка – любая из нескольких разных форм одного и того же белка.

 Интактная формы белка – неповреждённая форма белка.

 Кальпаин – член широкого семейства цитозольных Са2+-активируемых цистеиновых протеаз; разрезает множество внутриклеточных белков, модифицируя их функции.

 Микрогравитация – состояние, в котором ускорение, вызванное гравитацией, крайне незначительно, а сама сила гравитации не изменяется.

 Миопатия – хроническое прогрессирующее наследственное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся первичным поражением мышц.

 Саркомер – базовая сократительная единица поперечно-полосатых мышц, представляющая собой комплекс нескольких белков, состоящий из трёх разных систем волокон.

Убиквитин-протеосомная система (УПС) протеолиза – осуществляет убиквитинирование (ковалентное присоединение белка убиквитина к белкам-субстратам с целью маркирования данных белков для последующей деградации) и деградацию множества белков, играющих ключевую роль в регуляции жизнедеятельности клетки. УПС состоит из каскада убиквитинирующих ферментов Е1-Е2-Е3-Е4 и протеолитического ядра – 26S протеасомы (полиферментной каталитической белковой структуры, обладающей протеолитической и АТФазной активностями). Начальный запуск данной системы деградации белков происходит посредством влияния кальпаина на фосфорилирование компонентов данной системы на молекулярном уровне. Предполагается взаимодействие с кальпаиновой системой протеолиза белков.

Филаментная система – система внутриклеточных нитевидных образований.

C-конец молекулы белка – один из двух концов полипептидной молекулы белка, имеющий COOH-группу.

M-линия (M-зона) саркомера – тонкая тёмная полоса, находящаяся в H-зоне саркомера (узкой светлой полосы, соответствующей промежутку между противостоящими друг другу концами двух наборов тонких филаментов каждого саркомера), представляющая собой сеть белков, соединяющих центральные части толстых филаментов.

N-конец молекулы белка - один из двух концов полипептидной молекулы белка, имеющий NH2-группу.

PEVK-элемент – повторяющаяся последовательность аминокислот пролин-глутамат-валин-лизин в молекуле белка.

Z-зона (Z-мембрана, Z-диск, Z-линия) саркомера – сеть из переплетающихся белковых молекул, разграничивающая лежащие рядом саркомеры.

ВВЕДЕНИЕ

Тайтин (коннектин) и небулин являются важными структурными белками саркомеров мышц позвоночных животных. На данный момент достоверно известно, что тайтин, являясь самым большим из описанных к настоящему времени животных белков, играет важную роль в организме позвоночных животных, являясь полифункциональным белком саркомеров. Основной его функцией является поддержание упорядоченной структуры саркомеров мышц. Данная функция этого белка осуществляется наличием изоформ тайтина, имеющих различный размер и работающих по принципу «биологических пружин», удерживающих саркомер в физиологических пределах. Небулин является гигантским белком, связанный непосредственно с тонкими актиновыми нитями саркомера; его основной функцией является стабилизация актиновых нитей и защита от перенапряжения, вызванного сильным сокращением. Таким образом, можно сказать, что тайтин и небулин являются защитными белками мышц, предохраняя саркомеры от разрушения. На данный момент были проведены многочисленные исследования тайтина и небулина в различных условиях (микрогравитация, гибернация) и при различных патологиях, связанных с деградацией мышц (миопатии, синдром «ригидного человека» и т.д.). При этом в условиях микрогравитации и патологий наблюдалось существенное снижение концентрации высокомолекулярных форм тайтина и небулина и увеличение уровня их фосфорилирония, коррелирующее с развитием мышечной атрофии. В условиях гибернации у зимоспящих животных наблюдалось увеличение перед спячкой количества высокомолекулярных форм белков, что служит примером адаптации животных к условиям длительного сна. Также ещё одной немаловажной проблемой является усовершенствование методов выделения тайтина и небулина в интактной форме in vitro. В 2011 году методом Подлубной с соавт. [Способ выделения интактных молекул тайтина … , 2013] была проведена первая успешная попытка выделения N2B-изоформы тайтина [Chu, Gregorio, 2016], а 2013 году методом Сотериоу с соавт. [Soteriou, Gamage, Trinick, 1993] были выделены N2B- и N2BA-изоформы тайтина [Способ выделения интактных молекул тайтина … , 2013]. Но при применении данных методов некоторая часть белка не может быть выделена и деградирует.

Целью работы являлось выявление роли, функций и особенностей изоформ вышеприведённых белков в поперечно-полосатых мышцах позвоночных в различных условиях.

Основными задачами исследования являются:

– изучение структуры и особенностей изоформ тайтина и небулина и связанных с этим функций данных белков в поперечно-полосатых мышцах позвоночных;

– анализ процессов, происходящих с изоформами тайтина и небулином при патологиях (различные виды миастений), в условиях изменениния внешних условий (условия микрогравитации) и в условиях гибернации у зимоспящих позвоночных животных;

– рассмотрение причины происхождения данных процессов в изоформах тайтина и небулине и анализ уже имеющихся на данный момент способов нормализации их состояния после длительной гипокинезии (состояние недостаточной двигательной активности организма с ограничением темпа и объёма движений).

Тема исследования актуальна – изучение данных мышечных белков может помочь не только при диагностировании различных стадий развития патологий и замедления этого процесса, но и для развития возможности выдерживать длительное время в состоянии гибернации без сопутствующей атрофии мышц (например, во время космического полёта в отсутствие гравитации).

1 Аналитический обзор литературы

* 1. Общая характеристика тайтина, его основных изоформ и небулина

Тайтин (или коннектин) представляет собой гигантский эластичный белок поперечно-полосатых и гладких мышц позвоночных животных. Его молекулы длиной около 1 мкм и диаметром 3-4 нм перекрывают половину саркомера от М-линии до Z-линии, формируя третью филаментную систему в миофибриллах. На каждую половину саркомера приходится по шесть молекул тайтина, N-концы которых перекрываются в Z-линии, а С-концы в М-линии саркомера. В А-зоне саркомера (тёмном анизотропном участке саркомера, имеющем в своём составе толстые нити) тайтин связан с миозиновыми нитями. В I-диске саркомера (светлом изотропном участке саркомера, не имеющем в своём составе толстых нитей) некоторые участки тайтиновой молекулы могут взаимодействовать с тонкими нитями, однако большая часть молекулы тайтина в этой зоне проходит свободно, соединяя концы миозиновых нитей с Z-мембраной. Бóльшая часть (примерно 90 %) молекулы тайтина состоит из повторяющихся иммуноглобулин-подобных (IgC2) и фибронектин-подобных (FnIII) (подобных гликопротеину внеклеточного матрикса) доменов с β-складчатой структурой (конформация белка, стабилизирующаяся водородными связями между развёрнутыми полипептидными цепями). Кроме этих доменов тайтин содержит уникальные последовательности: киназный домен (АТФ-связывающий элемент третичной структуры белка), вблизи М-линии саркомера, фосфорилируемые участки в М-, I- и Z-зонах саркомера, а также эластичные N2A-, N2B- и PEVK-элементы в I-зоне саркомера. Период полураспада данного белка достаточно мал – примерно трое суток [Изменения изоформного состава тайтина … , 2012]. Тайтин является полифункциональным белком: является каркасом для сборки толстых нитей и саркомера; участвует в запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия как через связывание с белками тонких нитей, так и посредством изменения АТФазной активности и Са2+-чувствительности миозина [Вихлянцев, Подлубная, 2012] и актомиозина [Сезонные изменения изоформного состава … , 2015] (последние исследования показывают, что молекулярный механизм регулирования тайтином миозин-актинового взаимодействия основан не на движении молекулы миозина по направлению к актину за счёт сжатия молекулы тайтина, причиной является одновременно вызванные структурные перестройки внутри молекул актина и миозина, зависящия от деформации молекулы тайтина) [Titin strain contributes to the Frank-Starling law … , 2016]; выступает в роли механорецептора, объединяя сенсорные белки, улавливающие изменения растяжения в мыщцах [Вихлянцев, Подлубная, 2012]. Недавно открыта ещё одна функция тайтина: участие в работе саркомера наряду с актином и миозином за счёт фолдинга (свёртывания) и разворачивания in situ рабочего диапазона саркомера (складывание одного проксимального домена Ig тайтина может дать до 105 мкДж упругой энергии деформации, что больше, чем энергия сокращения миозина) [Work Done by Titin Protein Folding … , 2016]. Однако основная функция тайтина – поддержание высокоупорядоченной структуры саркомера – достигается за счёт наличия различных изоформ этого белка, создающих «биологическую пружину» из-за различной длины и расположения. Молекулы различных изоформ тайтина контролируют растяжение миофибрилл саркомера в физиологических пределах.

Когда тайтин был впервые открыт, были обнаружены две его формы различной молекулярной массы – тайтин-1 (α-коннектин) и тайтин-2 (β-коннектин) с массами молекул примерно 2800 кДа и 2100 кДа соответственно по последним результатам японских исследователей [Вихлянцев, Подлубная, 2012]. Тайтин-2 является протеолитическим фрагментом тайтина-1, то есть фактически не является изоформой тайтина.

Изоформный состав тайтина в организме позвоночных значительно изменяется в процессе онтогенеза [Колесник, 2013]. К известным на данный момент изоформам тайтина относят сейчас:

а) N2A-изоформа, которая отсутствует в сердечной мышце и имеет два варианта – длинный вариант (примерно 3700 кДа), имеющийся в медленных скелетных мышцах позвоночных, и короткий вариант (примерно 3400 кДа), находящийся главным образом в быстрых скелетных мышцах позвоночных;

б) N2B-изоформа (примерно 2970 кДа), синтезирующаяся также и в сердечной мышце;

в) N2BA-изоформа (примерно 3200-3350 кДа), также синтезирующаяся в сердечной мышце;

г) NT-изоформа – высокомолекулярная интактная изоформа тайтина, которая имеет несколько вариантов в зависимости от того, в какой мышце она находится, а именно: находящиеся в сердечной мышце – 3300-3400 кДа, в скелетной мышце – 3400-3700 кДа;

д) Т3300-изоформа (примерно 3300 кДа) – редкая изоформа тайтина, появляющаяся в некоторых случаях в поперечно-полосатых мышцах позвоночных в условиях микрогравитации [Вихлянцев, Подлубная, 2008].

Ген тайтина способен кодировать белки с большей, чем 3700 кДа, молекулярной массой, но эти изоформы белка пока ещё не открыты [Вихлянцев, Подлубная, 2008]. Кроме того, имеется предположение, что NT‑изоформы тайтина – это его интактные формы, а N2A-, N2B- и N2BA-изоформы тайтина являются лишь фрагментами его интактных форм [Виxлянцев, Подлубная, 2008].

Роль появления различных изоформ тайтина можно проследить на примере короткой N2B- и длинной N2BA-изоформ данного белка в миокарде позвоночных животных. Во время гибернации зимоспящих сусликов было зарегистрировано двукратное увеличение соотношения N2BA-/N2B-изоформ тайтина, выполняющих из-за различной длины и структуры роль «биологических пружин» разной жёсткости. Увеличение доли длинной N2BA-изоформы тайтина в сердечной мышце направлено на облегчение выброса более вязкой крови во время гибернации из камер сердца, так как увеличение длинной изоформы тайтина приводит к повышению эластичности миокарда [Карадулева, 2011]. Изменение соотношения изоформ тайтина, то есть увеличение экспрессии генов N2BA-изоформы в сравнении с экспрессией генов N2B-изоформы перед началом гибернации явно характеризует молекулярный механизм, ответственный за изменение жёсткости эластических нитей и, соответственно, саркомера и мышцы в целом [Сезонные изменения изоформного состава … , 2015].

Различные изоформы тайтина имеют различный аминокислотный состав, что было показано при исследовании взаимосвязи между статическим напряжением в мышцах и изменением изоформного состава тайтина в различных мышцах (поясничная, камбаловидная и сердечная кролика) [The increase in non-cross-bridge forces … , 2016]. При этом в кардиомиоцитах не наблюдалось статического напряжения при возбуждении, что подтвердило данную зависимость. Это объясняется тем, что Ca2+ связывается с богатым глутаматом PEVK-фрагментом тайтина, имеющим большой отрицательный заряд. Это приводит к уменьшению его длины, что является причиной увеличения жёсткости саркомера в частности и мышцы в целом. Так как различные изоформы тайтина имеют в своём составе различное содержание глутамата, то и статическое напряжение в различных мышцах проявляется по-разному [The increase in non-cross-bridge forces … , 2016]. Скорее всего, в сердечных изоформах тайтина наблюдается пониженное содержание глутамата в PEVK-фрагментах белка.

Небулин – большой белок в саркомерах скелетных мышц, расположенный вдоль тонкой нити актина. Изоформ не имеет, но входит в семейство белка небулина, в котором, кроме него имеются ещё четыре белка: N-RAP, nebulette, lasp-1 и lasp-2 [Chu, Gregorio, Pappas, 2016]. Его С-конец прикреплён к Z-диску, а N-конец находится вблизи заострённого конца тонкого филамента. Ген небулина содержит 183 экзона, которые кодируют этот белок с максимальной массой примерно 900 кДа. Большая часть небулина состоит из примерно 35 остатков аминокислот, которые имеют высокое сродство к актину и могут определить минимальную длину тонкой нити [Deleting exon 55 from the nebulin gene … , 2013]. Функции этого белка многочисленны:

– стабилизация актиновых нитей (косвенно – путём стабилизации тропомиозина, который сам по себе ингибирует деполимеризацию актина),

– регулирование их длины (при перемещении С-конца небулина по Z-диску саркомера),

– защита молекул актина от излишнего напряжения, вызванного сокращением (за счёт сжимающего усилия – небулин является эластичным белком и в растянутом виде может защитить молекулу актина от перерастяжения) [Chu, Gregorio, Pappas, 2016],

– поддержание структуры Z-диска саркомера,

– роль в сборке и организации миофибрилл [Chu, Gregorio, Pappas, 2016],

– участие в Ca-зависимом механизме передачи импульса, усиление взаимодействия между актином и миозином (через посредство белка десмина) [Chu, Gregorio, Pappas, 2016].

– образование нити актина после стимуляции инсулиноподобным фактором роста-1 (IGF-1, белок из семейства инсулиноподобных факторов роста, отвечающий за эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма) в скелетных мышцах (SH3 домен небулина (аминокислотная последовательность в составе белка, связывающаяся с короткими аминокислотными последовательностями, богатыми пролином) взаимодействует с белком синдрома Вискотта-Олдрича (N-WASP)). Взаимодействие "небулин-N-WASP" также играют существенную роль в развитии возрастной естественной гипертрофии мышц [Expression of multiple nebulin isoforms … , 2012].

Результаты исследований позволили сделать предположение об участии небулина в регуляции мышечного сокращения на уровне отдельных поперечных мостиков миозина [Вихлянцев, 2011]. Дефицит небулина в мышцах является причиной значительного снижения такого важного физиологического показателя, как удельная сила мышц, и исследования в этой области свидетельствуют о том, что при этом снижается доля поперечных мостиков миозина и укороченных тонких нитей актина, что и является причиной данного процесса [Nebulin deficiency in adult muscle … , 2015].

Таким образом, оба белка участвуют в стабилизации структуры саркомера, взаимодействуя с актином и миозином, являясь одновременно полифункциональными белками.

1.2 Изучение изоформного состава тайтина и небулина в условиях микрогравитации

В результате изучения состояния изоформ тайтина in vivo в условиях микрогравитации было обнаружено уменьшение содержания тайтина и увеличение уровня его фосфорилирования (примерно 1,3-1,35 раз) [Изменения изоформного состава тайтина … , 2012], главным образом, в Т2-участке его молекулы. Данный феномен приводит к увеличению протеолиза интактных форм тайтина при участии кальпаина по убиквитин-протеосомному пути и, соответственно, уменьшению содержания интактного тайтина-1 в поперечно-полосатых мышцах, а, следовательно, к уменьшению сродства тайтина к актину и/или миозину и соответственному уменьшению количества актино-миозиновых взаимодействий. Это приводит к снижению ATФазной активности актомиозина (белковый комплекс, состоящий из актина и миозина, характеризующийся энзиматической активностью АТФазы) [Изменения изоформного состава тайтина … , 2012], т.е. ведёт к их атрофии вследствие нарушения саркомерной структуры и сократительной способности мышц [О роли фосфорилирования тайтина … , 2015]. Причиной снижения ATФазной активности может также служить усиление связывания FnIII-подобных доменов Т2-фрагмента молекул тайтина с С1-фрагментом молекул миозина (субфрагмент-1 молекулы миозина, представленный стержневой частью и головкой молекулы), результатом чего возможно увеличение количества прижатых к стволу толстой нити миозиновых мостиков [Изменения изоформного состава тайтина … , 2012]. По результатам последних исследований было отмечено, что тайтин более восприимчив к действию кальпаина в растянутом состоянии. Возможно, индукция протеазы происходит в результате ишемии-реперфузии (синдром, возникающий вследствие возобновления кровотока в ишемизированном участке миокарда) из-за перенасыщения мышц Ca2+ [Beckendorf, Linke, 2015]. Атрофия волокон m. soleus человека и крысы в условиях гравитационной разгрузки приводила также и к снижению содержания небулина [Вихлянцев, 2011].

Было обнаружено, что снижение содержания тайтина-1 на 15 % и небулина на 40 % не сопровождается нарушениями саркомерной структуры в m. gastrocnemius мышей (после 30-суточного космического полёта) [Вихлянцев, 2011].

1.3 Изучение изоформного состава тайтина в условиях гибернации у зимнеспящих позвоночных

При исследовании содержания различных изоформ тайтина во время гибернации у зимоспящих сусликов было выявлено уменьшение содержания в мышцах N2A-, N2B- и N2BA-изоформ тайтина с одновременным сохранением постоянства количества высокомолекулярных NT-изоформ белка [Виxлянцев, Каpадулева, Подлубная, 2008; Вихлянцев, Подлубная, 2006]. Полученные данные показали ключевую роль именно высокомолекулярных форм тайтина в поддержании упорядоченной структуры саркомеров мышц во время зимней спячки животных [И. М. Вихлянцев, 2011]. Уменьшение же содержания более низкомолекулярных форм коннектина объясняется, скорее всего, расщеплением их для поставки глюкогенных аминокислот для процесса глюкогенеза в период гибернации [Сезонные изменения изоформного состава … , 2015]. Во время пробуждения и в первые часы выхода из спячки наблюдалось увеличение Т2-фрагментов, N2BA- и N2B-изоформ тайтина в миокарде позвоночных, при этом содержание интактных форм не изменилось вследствие увеличения скорости обновления интактных форм тайтина, сопровождающегося увеличением и их фрагментов [Виxлянцев, Каpадулева, Подлубная, 2008]. Таким образом, учитывая важную роль высокомолекулярных форм тайтина в поддержании структуры саркомера, можно представить процесс поддержания неизменного количества интактного тайтина в виде эволюционного приспособления зимнеспящих животных к длительному гибернационному периоду и получения возможности быстрого перехода к активной деятельности после долгого сна, что является одним из доказательств важности данного белка.

1.4 Изучение изоформного состава тайтина и небулина при патологиях мышечной системы

Изменение содержания изоформ тайтина и небулина у позвоночных наблюдалось и при различных патологиях мышечной системы, таких, как:

а) синдром «ригидного человека» (заболевание неясной этиологии, характеризующееся прогрессирующей ригидностью (резким повышением тонуса анатомических структур и их сопротивляемости деформированию) и болезненными мышечными спазмами в аксиальной (осевой) мускулатуре и проксимальных (расположенных ближе к центру) отделах конечностей и связанное с гиперактивностью двигательных единиц);

б) дилатационная миопатия (заболевание миокарда, характеризующееся развитием дилатации (растяжения) полостей сердца, с возникновением систолической дисфункции, но без увеличения толщины стенок);

в) гипертрофия сердечной мышцы;

г) постинсультная мышечная спастичность (состояние повышенного мышечного тонуса);

д) алкогольная миопатия и алкогольная кардиомиопатия;

е) миастения (аутоиммунное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся патологически быстрой утомляемостью поперечно-полосатых мышц).

Во всех вышеперечисленных случаях наблюдалось снижение в несколько раз количества тайтина и небулина, прежде всего, его NT-изоформ тайтина (NT-изоформ – примерно в 2-3 раза, а N2B- и N2BA-изоформ – примерно в 1,5-2 раза) [Изменения экспрессии гена и содержания тайтина … , 2008].

К примеру, у людей, страдающих синдромом «ригидного человека» наблюдалось снижение высокомолекулярных форм тайтина примерно в 4-5 раз по сравнению с N2A-изоформой тайтина с одновременным увеличением примерно в 2-3 раза Т2-фрагментов тайтина [Виxлянцев, Подлубная, 2008]. А в случае патологического процесса, называемого «гипогравитационным мышечным синдромом» не происходило существенных изменений в количестве N2A-изоформ белка, но примерно в 1,5 раза уменьшилось содержание интактного тайтина с одновременным увеличением содержания Т2-фрагментов примерно в 3-5 раз [Виxлянцев, Подлубная, 2008]. Это ещё раз указывает на ключевую роль высокомолекулярных форм тайтина в поддержании структуры саркомеров. Имеющаяся возможность регистрировать изменения изовариантного состава тайтина в мышцах позвоночных животных даёт возможность прослеживать развитие различных стадий патологии, а также эффективность лекарственных препаратов, действие которых направлено на устранение той или иной патологии. У пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как миастения, часто имеются антитела, направленные на тайтин [Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity, 2013]. Причина данного явления пока не раскрыта. В одном из последних исследованиях при сильных нагрузках наблюдались однократные повреждения саркомера, что было связано с деградацией под действием кальпаина нитей саркомера, но в то же время возникала ответная реакция восстановления повреждённых волокон. Эта ответная реакция дополнительно усиливалась после многократных тренировок – это приводило к адаптивной перестройке мышц и увеличению экспрессии таких саркомерных белков, как тайтин, десмин и дистрофин [Krüger, Kötter, 2016].

 Значительное изменение содержания небулина в мышцах позвоночных изменялось при:

 а) немалиновой миопатии (патология, обусловленная наличием в мышечных волокнах палочковидных или нитевидных включений);

 б) денервации мышц;

 в) дистальной миопатии [Expression of multiple nebulin isoforms … , 2012];

 г) центронуклеарной миопатии (наследственное заболевание, характеризующееся клиническими признаками врождённой миопатии и центральным расположением ядер в биоптате (материал, полученный путем биопсии) скелетных мышц) [Expression of multiple nebulin isoforms … , 2012].

 При немалиновой миопатии наблюдалось общее снижение количества небулина. Роль небулина в данном заболевании была продемонстрирована на опыте с лабораторными крысами. Когда в их мышцах наблюдался дефицит небулина ниже физиологического параметра, то происходило переключение работы быстрых (гликолитических) мышечных волокон на медленные (окислительные) для более эффективной генерации АТФ, т.е. происходил процесс атрофии быстрых скелетных мышц. Механизм данного переключения пока ещё не изучен [Nebulin deficiency in adult muscle … , 2015]. Исследования также показали, что заметное снижение количества небулина в скелетных мышцах наблюдалось при удалении экзона-55 из кодирующей синтез данного белка последовательности, что указывает на молекулярный механизм появления патологии [Deleting exon 55 from the nebulin gene … , 2013].

 После искусственно вызванной атрофией мышц денервации результаты показали снижение содержания небулина в зависимости от времени. В начале уровень небулина в денервированных мышцах заметно снизился примерно на 24,6 % и 40,2 % после денервации через 28 и 56 дней соответственно по сравнению с иннервированными мышцами. Соотношения "небулин / актин" и "небулин / тайтин" уменьшились, что наводит на мысль о сопутствующем снижении небулина в денервированных мышцах. Кроме того, анализ методом вестерн-блоттинга показал, что содержание небулина снизилось быстрее, чем тайтина на 28-й и 56-й дни. К тому же исследование действия электромагнитного поля на денервированные мышцы показало наличие в них разрушенных миофиламентов и дезорганизацию сократительного аппарата. В целом стало очевидно, что небулин более чувствителен к действию денервации, чем актин и тайтин. Снижение уровня небулина привело к распаду тонких нитей и укорочению саркомеров [Comparative decline of the protein profiles … , 2015].

При атрофии мышц эластичность снижалась, а тонус мышц возрастал по сравнению с нормой. Снижение эластичности сопровождалось низким содержанием тайтина и небулина в атрофированных мышцах. Пропорции T1 и T2 существенно не изменялись в атрофированных мышцах; тем не менее, жесткость значительно возрастала. Результаты показали, что чем выше степень атрофии мышц, тем меньше мышечная эластичность и относительное содержание изоформы IIb ГКГ в атрофированных мышцах. Повышенный мышечный тонус, который наблюдался в атрофированной мышце, может быть связан с изменениями в иннервации мышц, особенно в быстро сокращающихся мышечных волокнах. Ультраструктурные исследования показали, что в атрофированных мышцах нервно-мышечные синапсы разрушаются в быстросокращающихся волокнах. Содержание тайтина и небулина в атрофированной мышце уменьшалось больше, чем содержание ГКГ. Тем не менее, это объясняет снижение эластичности и повышенный тонус в атрофированных мышцах. Относительное содержание обеих изоформ тайтина и ГКГ снижалось до схожей степени в атрофированных мышцах. Таким образом, соотношение между тайтина и ГКГ осталось в атрофированной мышце таким же, как и у контрольной группы. Уменьшение соотношения между небулином и ГКГ в атрофированном мышцы показывает, что содержание небулина снизилось в большей степени, чем тайтина. Есть основания полагать, что снижение сократительного белка миозина и эластичных белков мышц, в том числе небулина, может уменьшить мышечную эластичность и генерацию напряжения. Это будет ухудшать способность атрофированных мышц сохранять и восстанавливать энергию упругой деформации [Glucocorticoid-induced alterations in titin … , 2013].

2 Материал и методы исследования

Во время проанализированных исследований использовались следующие методы:

1. Метод выделения интактных молекул тайтина Сотериоу с соавт., [Soteriou, Gamage, Trinick, 1993].

2. Метод выделения интактных молекул тайтина Подлубной с соавт. [Способ выделения интактных молекул тайтина, 2013]. Перед гомогенизацией мышечная ткань инкубировалась в течение 2-3-х недель при 4°С в Са2+-связывающем растворе для снижения активности Са2+-зависимых протеаз. После гомогенизации мышцы тайтин выделяли по методу Сотериоу с соавт.

3. Гель-электрофорез белков. Для электрофоретического тестирования высокомолекулярных изоформ тайтина использовали крупнопористый 1,9-2,3 % полиакриламидный гель с добавлением агарозы. Образцы сердечных мышц инкубировали в течение 40-60 минут при температуре 25-30˚С в солюбилизирующем растворе, содержащем 10 мМ трис-HCl, 1 % ДСН, 10 % глицерина, 6 мМ ЭДТА, 2 % β-меркаптоэтанола (или 75 мМ ДТТ), 8-10 мкг/мл ингибитора протеаз леупептина, 8-10 мкг/мл Е64, рН 6,8-7,0. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах геля размером 8 см на 10 см при силе тока 3-5 мА в течение первых 30-60 минут, после чего поднимали силу тока до 10-12 мА. Электродный буфер содержал: 0,192 М глицин, 0,025 М трис, 0,1 % ДСН рН 8,6. По окончании электрофореза гели фиксировали в течение 20-30 минут в растворе, содержащем 10 % этанола и 10 % уксусной кислоты. Затем гели окрашивали в течение 30-40 минут в растворе, содержащем по 0,1 % Кумасси G-250 и R-250, 45 % этанола и 10 % уксусной кислоты. Отмывку окрашенных гелей проводили в 7 % уксусной кислоте.

4. Вестерн-блоттинг. Проводили по методу, описанному в работе. Перенос белка из полиакриламидных гелей на нитроцеллюлозные мембраны (диаметра пор 0,45 мкм) после электрофореза проводили в трисглицин/метанольном буфере с добавлением ДСН при силе тока 0,8 мА на см2 в течение 48-72 часов при постоянном охлаждении. Неспецифическую сорбцию на мембранах блокировали 5 % раствором обезжиренного молока в фосфатном солевом буфере (ФСБ) в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве первичных антител использовали: АВ5 (к участку молекулы тайтина, расположенному около М-линии саркомера), ВD6 (к участку молекулы тайтина, расположенному на границе А-диска и I-области саркомера), 9D10 и Т11 (к участкам I-зоны тайтина, Z1 и Z2 (к N-концу молекулы тайтина, расположенному в Z-диске саркомера). В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, использовали антитела против IgG мышей («Sigma», США) или кролика («Имтек», Москва). Инкубацию как с первичными, так и вторичными антителами проводили в течение 1 часа в ФСБ с 0,05 % Твин-20. Белковые полосы выявили с помощью 3,3̍-диаминобензидина.

5. Метод обратной транскрипции. Сначала была приготовлена смесь общим объемом 11 мкл, состоящую из РНК и праймеров: суммарная РНК – 0,1-5 мкг; мРНК – 0,5 мкг; специфическая РНК – 0,5 нг; oligo(dT) праймеры – 0,5 мкг; random hexamer праймеры – 0,2 мкг; специфические праймеры – 15-20 пМ. Затем раствор был доведён деионизованной водой до 11 мкл. Раствор перемешали и инкубировали при 70˚С 5 минут и быстро перенесли на лед. Добавили следующие компоненты: 10 х реакционный буфер – 2 мкл, 10 мМ дНТФ – 2 мкл, ингибитор рибонуклеаз – 20 ед., деионизованной воды – до 19 мкл. Смесь инкубировали при 25˚С 5 минут. Добавили 200 ед. M-MuLV Reverse Transcriptase, инкубировали реакционную смесь, содержащую oligo(dT) и специфический праймер при 25˚С 60 минут. Реакция была остановлена нагреванием до 70˚С. Затем раствор был охлаждён.

6. Метод кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма исследуемых белков регистрировали на спектрополяриметре, используя кварцевые кюветы с оптической длиной 0,1 см. Спектры КД были измерены в области 200-250 нм.

7. Метод электронной микроскопии. Для приготовления электронно-микроскопических образцов использовали препараты белков с концентрациями 0,1 мг/мл. Каплю раствора или суспензию белка наносили на медные сетки, покрытые коллодиевой плёнкой, укреплённой углеродом. После удаления избытка суспензии полоской фильтровальной бумаги образцы окрашивали 2 % водным раствором уранилацетата.

8. Метод ионообменной хромотографии на ДЕАЕ-сефадексе [Starr, Offer, 1982].

9. Метод иммуногистохимии. Иммуногистохимическое окрашивание поперечных срезов скелетных мышц человека и мышей проводили по описанной ранее методике. Замороженные срезы (6 мкм) фиксировали (10 мин, 20-25 °С) в охлажденном ацетоне. Для уменьшения внутренней активности пероксидазы на образцы наносили (30 мин, 22 °С) 0,03 % Н2O2. Для блокирования неспецифического связывания используемых антител с другими антигенами на срезы ткани наносили (60 мин, 22°С) 2,5 % сыворотку лошади [Analysis of CD97 Expression and Manipulation…, 2008].

10. Метод флуоресцентной микроскопии. Исследуемые образцы окрашивались 1 % водным раствором тиофлавина и исследовались с помощью люминесцентного микроскопа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

 Белки поперечно-полосатых мышц тайтин (коннектин) и небулин играют жизненно важную роль в саркомерах мышц, участвуя в поддержании его целостной структуры и в актино-миозиновом взаимодействии. Именно они разрушаются в первую очередь при патологических процессах. При этом происходит их фосфорилирование, с чем связана активация убихинон-протеосомного пути деградации выше приведённых белков. Поиск и применение деактиваторов данного пути разрушения тайтина (коннектина) и небулина, а также дальнейшее изучение механизмов регулирования этого процесса у зимоспящих позвоночных животных являются ключевыми моментами всего исследования.

 В ходе работы были сделаны следующие выводы:

 – Тайтин (коннектин) и небулин являются высокомолекулярными белками поперечно-полосатых мышц позвоночных. Основная функция тайтина – поддержание упругой структуры саркомера, в результате чего этот белок имеет несколько различных по длине изоформ (N2A-, N2B-, N2BA- и NT-изоформы), создающий «биологические пружины» в саркомере для поддержания данной функции. Основная функция небулина – стабилизация актиновых нитей.

 – В условиях микрогравитации и при патологиях мышечной системы, связанных с их атрофией, наблюдается деградация белков тайтина и небулина и как следствие увеличение низкомолекулярных изоформ тайтина как продуктов деградации. В условиях гибернации у зимнеспящих позвоночных животных зафиксировано поддержание организмом в поперечно-полосатых мышцах неизменного количества интактных форм данных белков как приспособление к длительному гибернационному периоду.

 – Деградация тайтина и небулина проходит под действием их убиквитин-протеосомного фосфорилирования, но запускается эта система расщепления белков посредством белка кальпаина, что указывает на тесную связь кальпаиновой и убиквитин-протеосомной систем деградации тайтина и небулина. На данный момент было изучены и запатентованы в качестве способа профилактики и снижения деструкции белков скелетных мышц при их атрофии природный ингибитор кальпастатин и искусственный ингибитор PD150606.

 Исследования в этом направлении могут помочь в диагностировании и лечении различных видов миопатий и других патологий мышечной системы и преодолении состояния атрофии мышц после их длительного бездействия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Вихлянцев И. М. , Подлубная З. А. Изоформный состав тайтина в мышцах при патологических процессах // Биофизика. 2008. Т.53. №6. С. 1058-1065.

2 Вихлянцев И. М., Подлубная З. А. Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих: факты и предположения // Успехи биологической химии. 2012. Т.2. С. 239-280.

3 Вихлянцев И. М., Подлубная З. А. Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих: факты и предположения // Успехи биологической химии. 2012. Т.2. С. 239-280.

4 Виxлянцев И.М., Каpадулева Е.В., Подлубная З.А. Сезонные изменения изоформного состава тайтина в мышцах зимнеспящих сусликов // Биофизика. 2008. Т. 53. № 6. С. 1066-1072.

5 Изменение экспрессии гена и содержания тайтина (коннектина) в поперечно-полосатых мышцах хронически алкоголизированных крыс / Грицына Ю.В. [и др.] // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 6. С. 996-1003.

6 Изменения изоформного состава тайтина и тяжёлых цепей миозина скелетных мышц монгольской песчанки (Meriones unguiculatus) после 12-суточного космического полёта / Окунева А.Д. [и др.] // Биофизика. 2012. Т. 57. № 5. С. 756-763.

7 Карадулева Е.В. Исследование тайтина в миокарде зимоспящих сусликов в течение годового цикла и спонтанно-гипертензированных крыс при развитии гипертрофии: автореф. дис. канд. биол. наук. Москва, 2011. 25 c.

8 Колесник М.Ю. Особенности экспрессии регуляторного белка тайтина и коллагена I типа в миокарде спонтанно гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Патологiя. 2013. № 2 (28). С. 31-35.

9 О роли фосфорилирования тайтина в развитии мышечной атрофии / Салмов Н. Н. [и др.] // Биофизика. 2015. Т.60. №4. С. 829-832.

10 Полиморфизм тайтина скелетных мышц при экстремальных условиях зимней спячки и микрогравитации: диагностическая ценность изоформ тайтина для выбора подходов к коррекции «гипогравитационного мышечного синдрома» / Вихлянцев И.М. [и др.] // Доклады Академии наук. 2006. Т. 407. № 5. С. 692-694.

11 Сезонные изменения изоформного состава гигантских белков толстых и тонких нитей и степени фосфорилирования тайтина (коннектина) в поперечно-полосатых мышцах медведей (Ursidae, Mammalia) / Салмов Н. Н. [и др.] // Биохимия. 2015. Т.80. №3. С.412-426.

12 Способ выделения интактных молекул тайтина (коннектина) из сердечной мышцы млекопитающего / Вихлянцев И.М. и др. // Биохимия. 2013. Т. 78. №5. С. 600-609.

13 Способ профилактики снижения деструкции цитоскелетных белков скелетных мышц при их атрофии, вызванной гипокинезией и/или гравитационной разгрузкой: пат. 2517576 Рос. Федерация: МПК A61K 31/192 A61P 21/00 / Т. Л. Немировская, Ю. Н. Ломоносова; заявитель и патентообладатель ГНЦ РФ – ИМБП РАН. № 2013110043/15; заявл. 06.03.13; опубл. 27.05.14. Бюл. №15. 13 с.

14 Analysis of CD97 Expression and Manipulation: Antibody Treatment but Not Gene Targeting Curtails Granulocyte Migration / Veninga H. [et al.] // The Journal of Immunology. 2008. V. 181. № 9. P. 6574-6583.

15 Beckendorf L., Linke W. A. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity // Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2015. V.36. Issue 1. P.25-36.

16 Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma / Linette G. P. [et al.] // Blood. 2013. V. 122. № 6. P. 863-871.

17 Chu M., Gregorio C. C., Pappas C. T. Nebulin, a multi-functional giant // Journal of Experimental Biology. 2016. №219. P. 146-152.

18 Comparative decline of the protein profiles of nebulin in response to denervation in skeletal muscle / Weia J.-H. [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015. V. 466. Issue 1. P. 95-102.

19 Deleting exon 55 from the nebulin gene induces severe muscle weakness in a mouse model for nemaline myopathy / Ottenheijm C. A. C. [et al.] // Brain. A Journal of Neurology. 2013. № 136 (6). P. 1718-1731.

20 Expression of multiple nebulin isoforms in human skeletal muscle and brain / Laitila J. [et al.] // Muscle & Nerve. 2012. V. 46. Issue 5. P. 730-737.

21 Glucocorticoid-induced alterations in titin, nebulin, myosin heavy chain isoform content and viscoelastic properties of rat skeletal muscle / Aru M. [et al.] // Advances in Biological Chemistry. 2013. V. 3. № 1. P. 70-75.

22 Krüger M., Kötter S. Titin. A Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling // Frontiers in physiology. 2016. V.7. P. 76-79.

23 Nebulin deficiency in adult muscle causes sarcomere defects and muscle-type-dependent changes in trophicity: novel insights in nemaline myopathy / Li F. [et al.] // Human Molecular Genetics. 2015. №24 (18). P. 5219-5233.

24 Soteriou A., Gamage M., Trinick, J. A survey of interactions made by the giant protein titin / Journal Cell Science. 1993. V. 14. P. 119-123.

25 Starr R., Offer G. Preparation of C-protein, H-protein, X-Protein and phosphofructokinase // In: Methods in enzymology. 1982. V. 85. P. 130-138.

26 The increase in non-cross-bridge forces after stretch of activated striated muscle is related to titin isoforms / Cornachione A. S. [et al.] // American Journal of Physiology – Cell Physiology. 2016. V. 310. № 1. P.19-26.

27 Titin strain contributes to the Frank-Starling law of the heart by structural rearrangements of both thin- and thick-filament proteins / Ait-Moua Y. [et al.] // PNAS. 2016. V. 113. № 8. P. 2306-2311.

28 Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction / Rivas-Pardo J. A. [et al.] // Cell Reports. 2016. V. 14. Issue 6. P. 1339-1347.