

**Курс лекций по дисциплине
«Структурные и функциональные особенности
поперечно-полосатых и гладких мышц»**



**Институт теоретической
и экспериментальной
биофизики РАН
(ИТЭБ РАН)**

Лекция № 8

**Титин (тайтин/коннектин) - гигантский эластичный белок
саркомерного цитоскелета, формирующий третий тип нитей**

Вопросы для мини-проверки

1. Почему актин называли «актином»?
2. Какие изоформы или классы актинов синтезируются в немышечных или мышечных клетках?
3. Что такое G-актин (Г-актин) и F-актин (Ф-актин)?
4. Что такое тредмиллинг?
5. Назовите не менее трёх актинсвязывающихся белков.
6. Сколько нитей F-актина в тонкой нити в саркомере поперечнополосатой мышцы?
7. В какой части саркомера расположена молекула альфа-актиниона?

Молекула G-актина несет прочно связанную АТФ, который при переходе в F-актин медленно гидролизует до АДФ – проявляет свойства АТФ-азы. Полимеризация сопровождается гидролизом АТФ, что не необходимо т.к. полимеризация идет и в присутствии негидролизующих аналогов АТФ

Полимеризация состоит из нескольких процессов: **нуклеация**, **элонгация**, **диссоциация**, **фрагментация**, **стыковка**. Эти процессы протекают одновременно.

Нуклеация – соединение трех G-актинов – инициация полимеризации.

Элонгация - наращивание цепи актина путем присоединения G-актина к (+)-концу F-актина.

Диссоциация - укорачивание цепи. Деполимеризация актина имеет одинаковую скорость с обоих концов

Фрагментация - в результате теплового движения F-актин может фрагментироваться.

Стыковка - отдельные фрагменты могут соединяться друг с другом конец в конец.

При концентрации $G > F$ – одновременно происходит полимеризация (+) и (-) конца.

Если $G < F$ – происходит полимеризация (+) и деполимеризация (-)-конца – **тредмиллинг** – движение F-актина за счет одновременного наращивания (+)-конца и диссоциации (-)-конца.

Тонкие нити (актиновые) (повторение)
Актин открыл Ф.Б. Штрауб в 1942 году.
Белок получил название за способность активировать гидролиз АТФ.

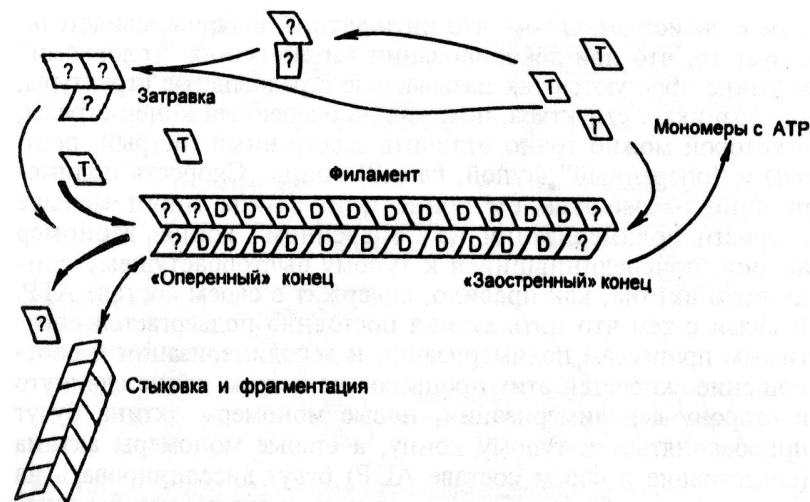


Рис. 106. Процесс полимеризации актина. Мономеры актина изображены в виде ромбов, содержащих в своем составе либо АТФ (Т), либо АДП (D). На начальной стадии мономеры актина подвергаются активации (изменяется форма ромба) и происходят так называемая нуклеация и формирование затравки. Далее наблюдается рост филамента, при этом скорость процесса полимеризации на «заостренном» конце, где преимущественно располагаются мономеры актина, содержащие в своем составе АДП, существенно меньше скорости полимеризации на «оперенном» (тупом) конце нити актина, где мономеры актина преимущественно содержат в своем составе АТФ [Фултон А., 1987].

Тредмиллинг – перемещение («путешествие») актиновых мономеров по нити.

«Шесть шагов»: учёные из 153 стран объявили чрезвычайную климатическую ситуацию на планете



Более **11 тыс. исследователей из 153 стран** подписали научную статью «Предупреждение учёных мира о климатическом кризисе», в которой говорится о чрезвычайной ситуации на планете. Документ содержит анализ основных причин изменения климата и программу спасения Земли от глобального потепления, состоящую **из шести основных пунктов**. Статья опубликована в журнале BioScience.

Главные авторы статьи — американские экологи Уильям Риппл и Кристофер Вулф из Орегонского университета. Они отметили, что с момента проведения в **Женеве Первой всемирной конференции по климату** прошло уже **40 лет**. И за это время неоднократно указывалось на растущую угрозу глобального потепления и звучали призывы к правительствам всех стран принять незамедлительные меры, чтобы остановить этот прсс.



А воз и ныне там!

Согласно данным, проанализированным учёными, за последние **10 лет** массовая вырубка лесов увеличилась на 50%, выбросы углекислого газа — на 18%, производство мяса на душу населения — на 11%. Также экологи отметили, что каждое десятилетие число глобальных стихийных бедствий и аномальных природных явлений росло на 44%, а толщина полярного льда уменьшалась в среднем на 4,84 м.

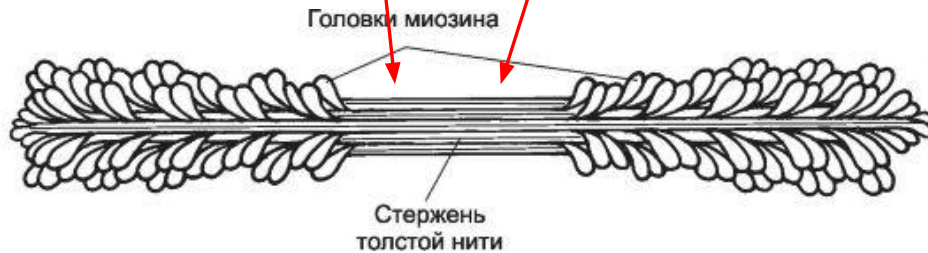
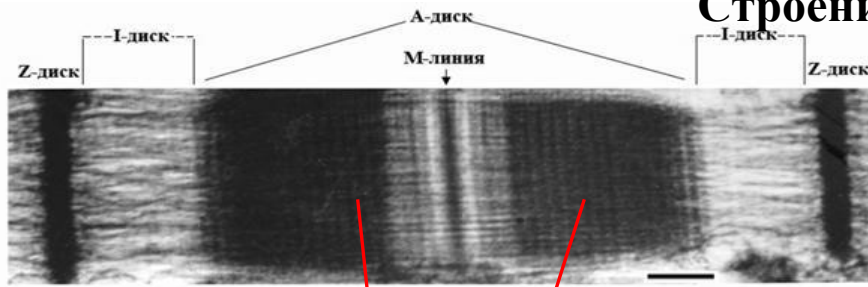
Учёные подчеркнули необходимость глобального пересмотра взаимоотношений человека и природы — **парниковый эффект может привести к цепной реакции и разрушению экосистем на суше и в Мировом океане.**

Учёные назвали шесть первоочередных задач («шесть шагов»), на решении которых необходимо сконцентрировать все силы. В своеобразную программу спасения планеты вошли:

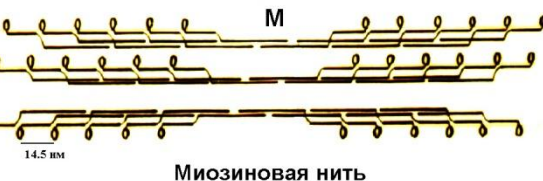
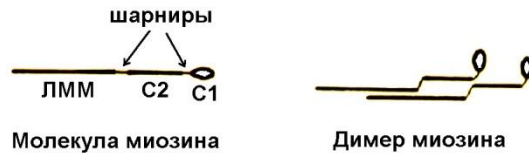
- реформа энергетического сектора и переход к возобновляемым источникам энергии,
- сокращение воздействия на атмосферу загрязняющих веществ,
- восстановление экосистем,
- охрана экосистем,
- реформа продовольственной политики (снижение потребления мяса и изменение рациона в пользу потребления пищи растительного происхождения),
- а также построение безуглеродной экономики и стабилизация численности населения Земли.

Строение миозина (Повторение)

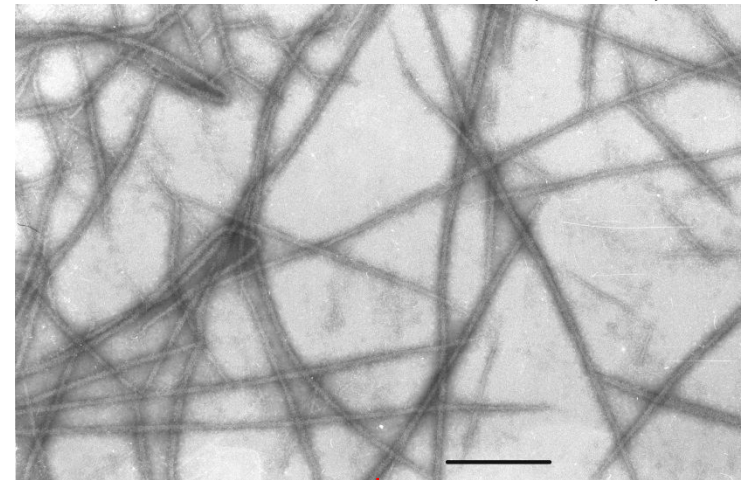
Нити миозина (in vitro)



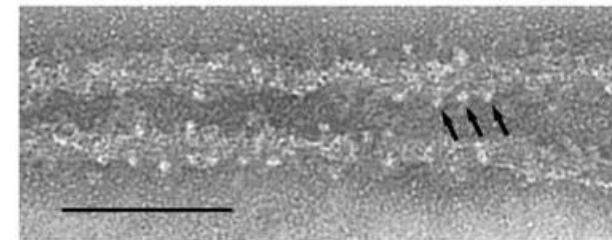
Толстая нить. Каждая миозиновая нить состоит из 300-400 молекул миозина и С-белка. Половина молекул миозина обращена головками к одному концу нити, а вторая половина - к другому. Гигантский белок тайтин (титин) связывает свободные концы толстых нитей с Z-линией.



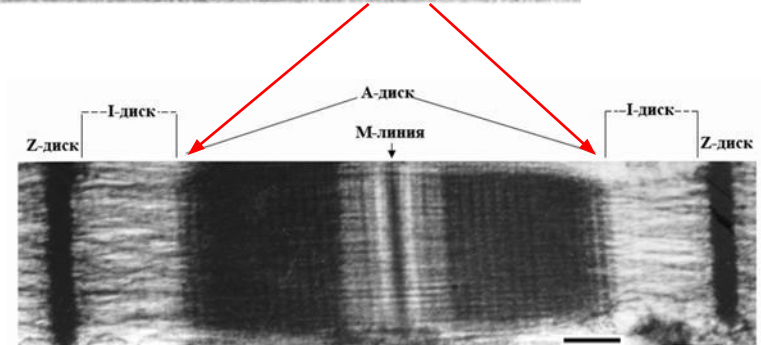
Схематическое изображение толстой нити (Harrington, 1971)



Нити миозина при большем увеличении



Головка размером 16,5x6,5x4 нм.



Толстые нити имеют диаметр 15 нм

Комплексы Ф-актина, ТНТ и ТМ (Повторение)

Нити Ф-актина

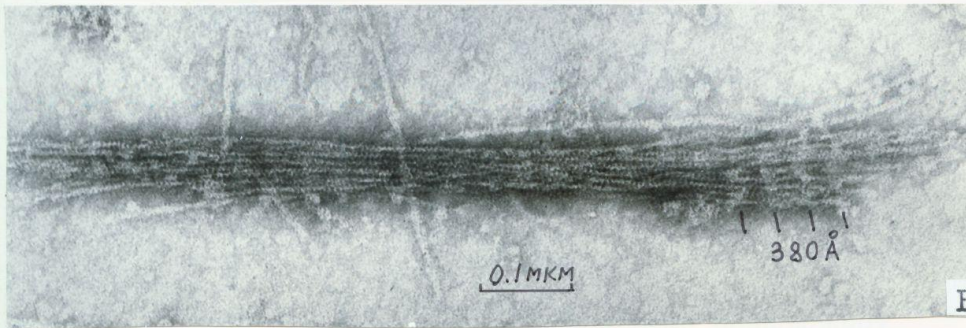
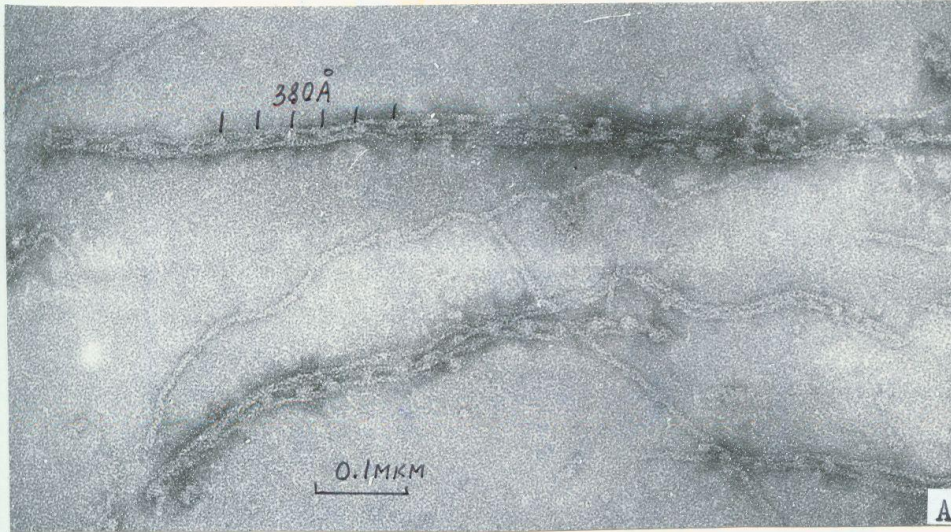


Рис.8 Микрофотографии паракристаллов ФА-ТМ-ТНТ (А) и ФА-ТМ-ТНТ (Б) комплексов /4/. Паракристаллы были получены, как описано (рис.6). Молярные отношения актина, тропомиозина и компонентов тропонина равны: А - 7:1:2.5; Б - 7:1:8. Стрелки указывают периодическое расположение тропонинов в паракристаллах (~ 380Å). Окрашивание I₂ раствором УА. Увеличение 150000х.

схема

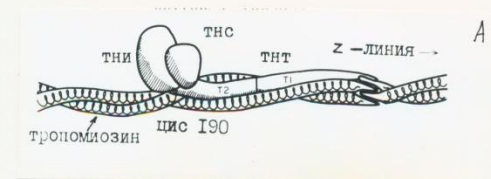


Рис.9 А - Схема расположения комплекса тропонина на тропомиозиновом тяжё (ТМ). ТНТ - тропонин-Т; ТНС - тропонин-С; ТНТ - тропонин-Т и его протеолитические фрагменты - Т₂ и Т₁. (Flicker et al., 1982). С - концевая часть ТНТ (фрагмент Т₂) связывается вблизи остатка цис-I90 тропомиозина. N-концевая часть ТНТ (фрагмент Т₁) располагается вдоль С-концевой половины тропомиозина. Б - Схема строения тонкой нити поперечно-полосатых мышц позвоночных (Payne, Rudnick, 1989).

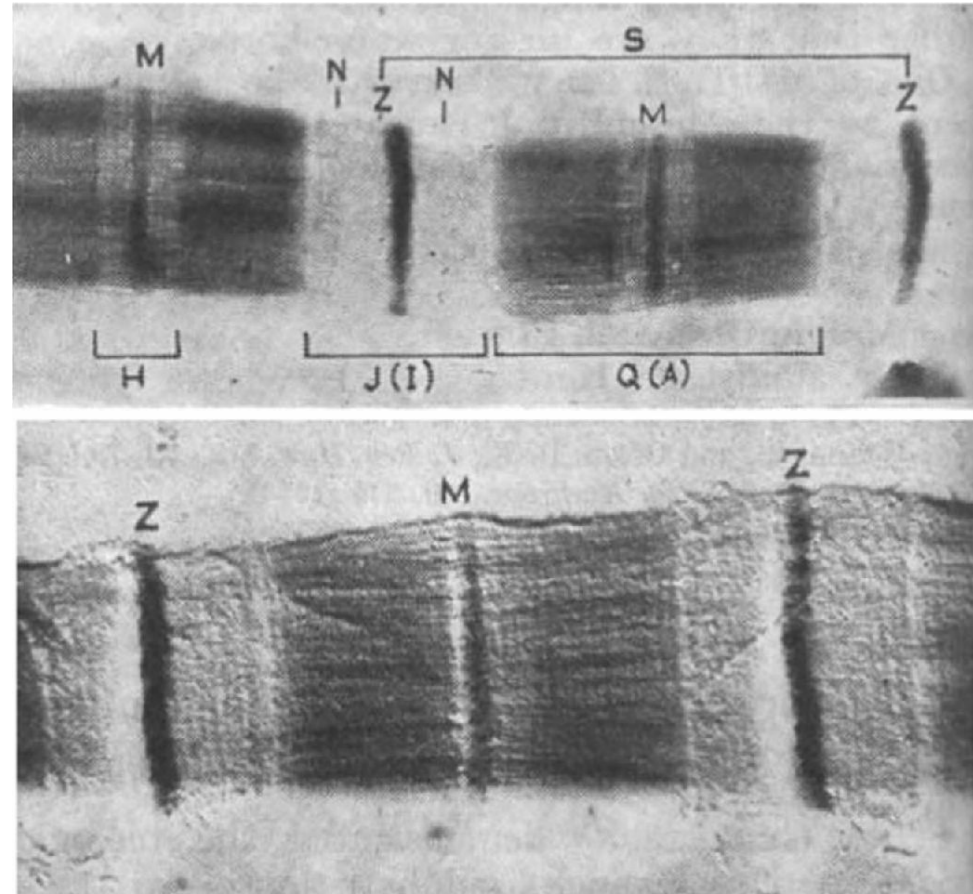
Итак, уже более 60 лет известно, что в саркомерах поперечно-полосатых мышц присутствуют два типа белковых нитей:

**Миозиновые (толстые) и
Актиновые (тонкие).**

Однако, практически сразу же после открытия саркомерной структуры мышц и появления гипотезы скользящих нитей, стали появляться научные данные, свидетельствующие о том, что в саркомере может быть третий тип нитей.

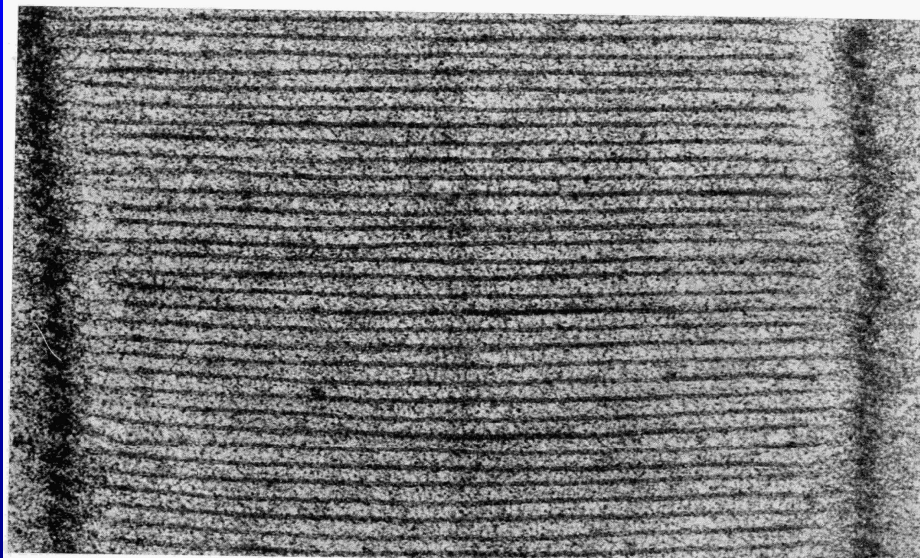
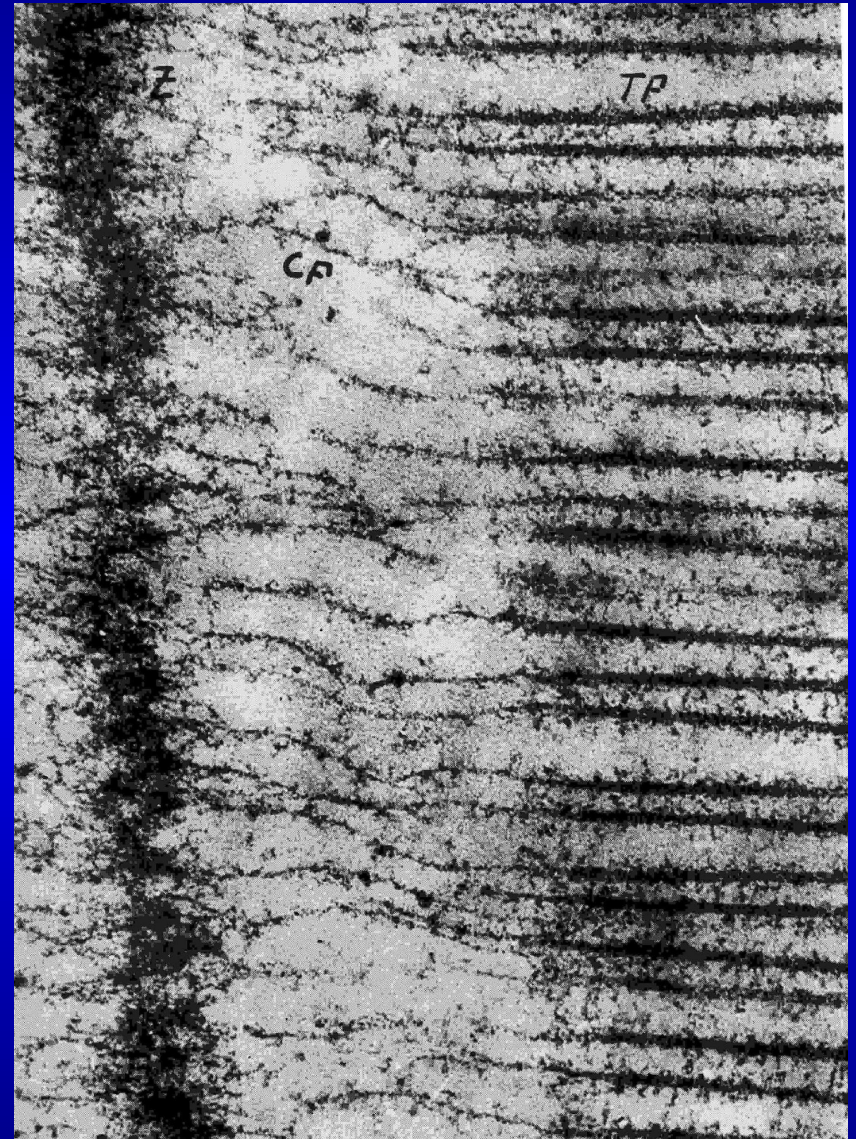
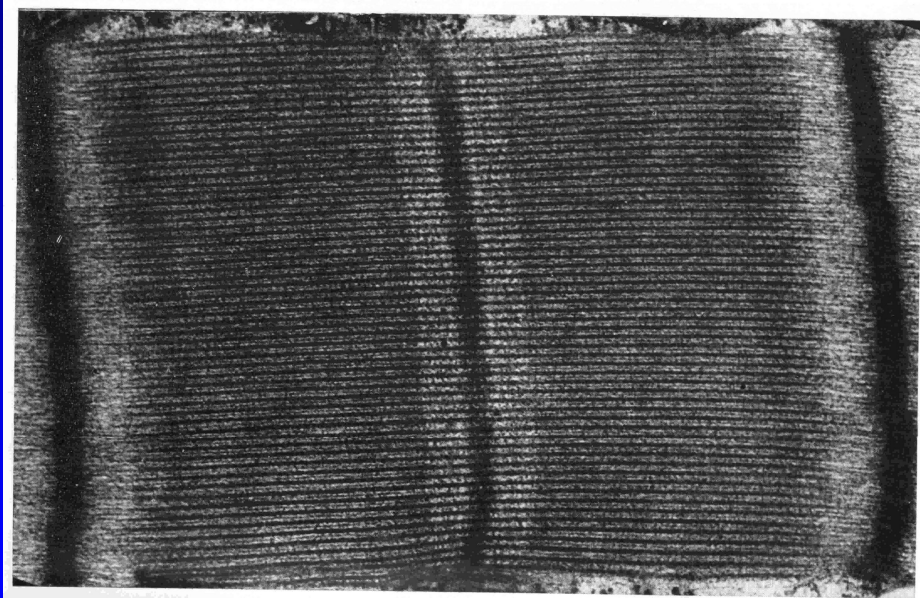
Первые ЭМ исследования ультраструктуры мышц

Early electron microscope images of a formalin-fixed skeletal muscle myofibril published by Draper and Hodge (1950). The top figure was negatively stained with phosphomolybdic acid. The lower fibril was imaged by a platinum shadow technique



ИЗ *An historical perspective of the discovery of titin filaments*
Cris dos Remedios & Darcy Gilmour

Визуализация третьего типа нитей в саркомере (близ Z-диска)



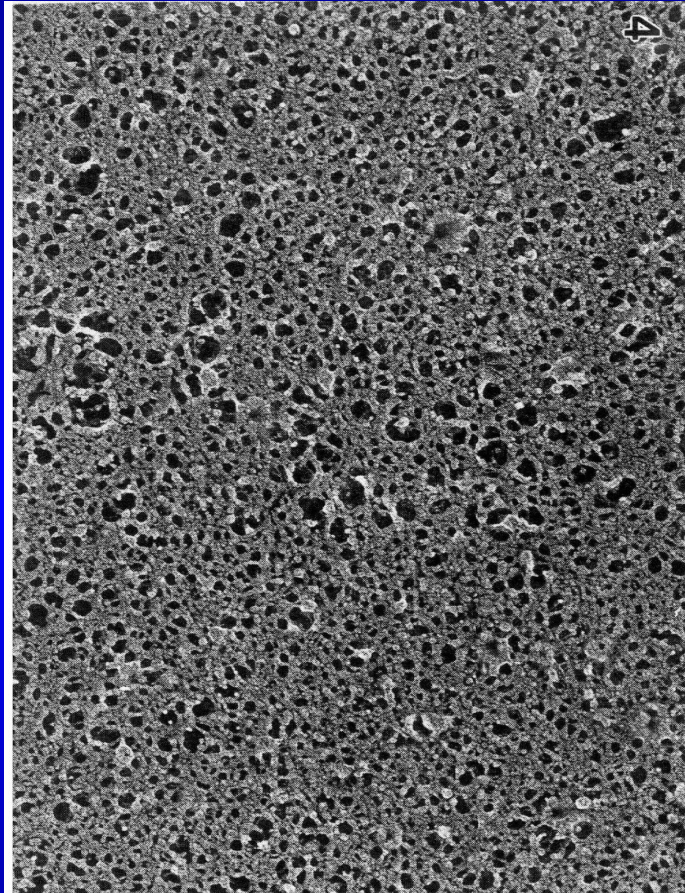
Саркомеры летательной мышцы пчелы (Trombitas & Tigyi-Sebes, 1974)

Названия третьего типа нитей:

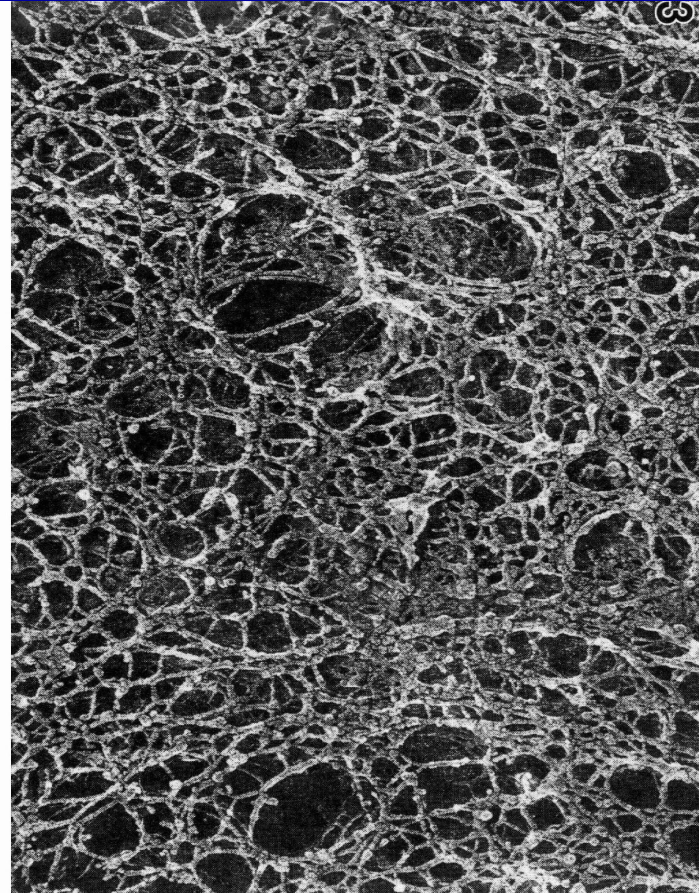
- «промежуточные» – видимые на микроснимках в промежутках между концами толстых и тонких нитей при больших степенях растяжения саркомеров (Sjostrand, 1962);
- «ОСТАТОЧНЫЕ» – нити, остающиеся после удаления миозина и актина из саркомеров (Guba et al., 1968; Remedios, 1978);
- «сверхтонкие» – нити, имеющие малый диаметр (~3-5 нм) (Huxley & Peachy, 1961; McNeill & Hoyle, 1967; Hoyle et al., 1968);
- «концевые филаменты» – тонкие нити, диаметром 4-5 нм, видимые на концах изолированных толстых нитей (Trinick, 1981, 1984);
- «G-нити» и «коннектиновые» нити – соединяющие концы толстых нитей с Z-диском (Auber & Couteaux, 1963; Trombitas & Tigyí-Sebes, 1974; Locker & Leet, 1976).

Электронные микрофотографии коннектина

(Maruyama et al., 1977; Sawada et al., 1983)



Увеличение 53000



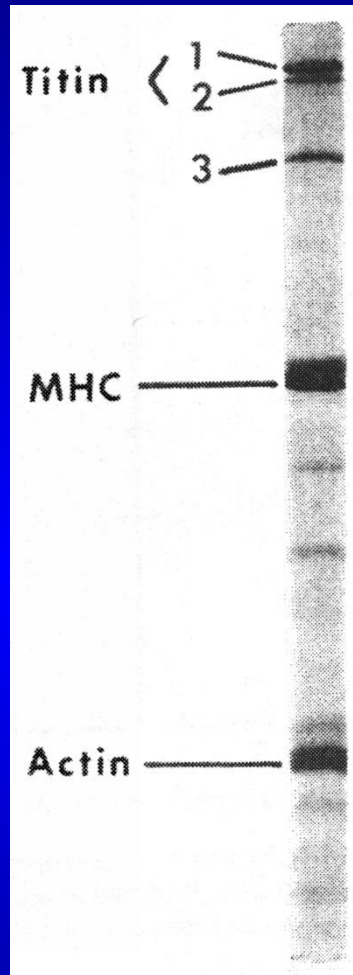
Увеличение 68000

Коннектин был изолирован из скелетных мышц крысы, кролика, курицы, лягушки, сердечной мышцы коровы, из гладких мышц курицы и поперечно-полосатых мышц рака.

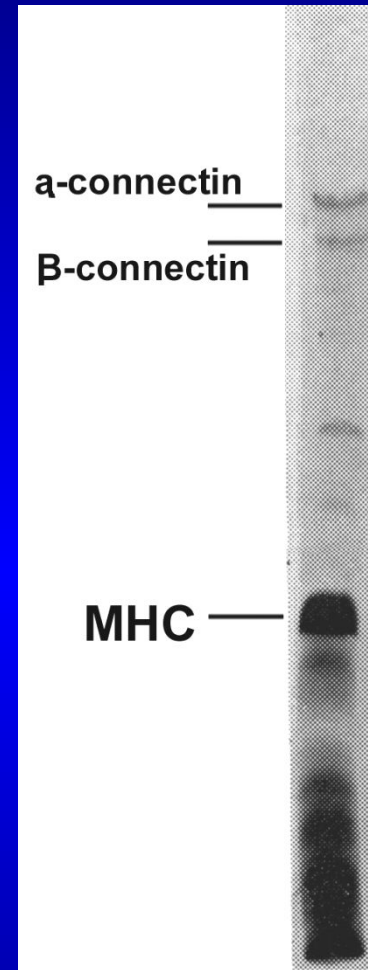
Электрофоретическое открытие титина (коннектина)

Wang et al.,
1979

T1 - 1400 кДа
T2 - 1200 кДа



m. psoas кролика грудная мышца цыплёнка

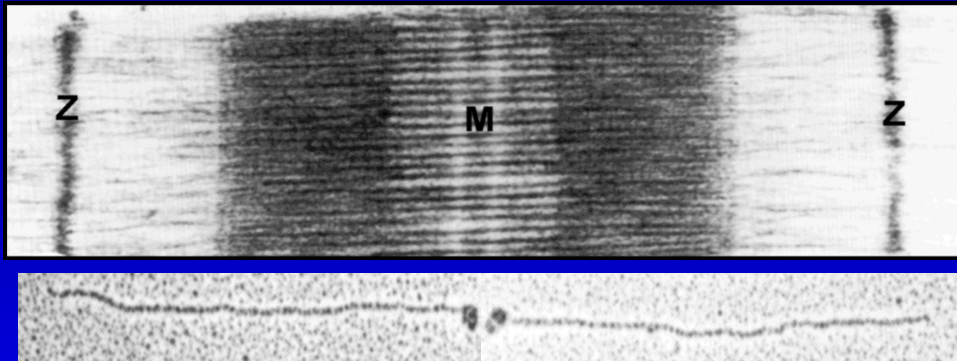


Maruyama
et al., 1981

α - 2800 кДа
β - 2100 кДа
(Maruyama et al, 1984)

ДСН-гель-электрофорез проведён в крупнопористых 3-4%
полиакриламидных гелях

Титин – «Титаник» среди белков



Титин/тайтин

-Титин – самый большой из известных на сегодняшний день белков

-Первооткрыватели:

К. Maruyama и К. Wang

-Длина молекулы более 1 мкм

-Содержит 300 глобулярных доменов

- М.в. около 4 МДа,

-Ген титина содержит 363 экзона, которые кодируют **38138** аминокислотных остатков.



Титаник

-Титаник - крупнейший в мире пассажирский пароход на момент своей постройки

Создатели:

Томас Эндрюс и Джозев Брюс Исмей

-Длина около 300 м,

- ширина 30 м

- водоизмещение 52310 тонн

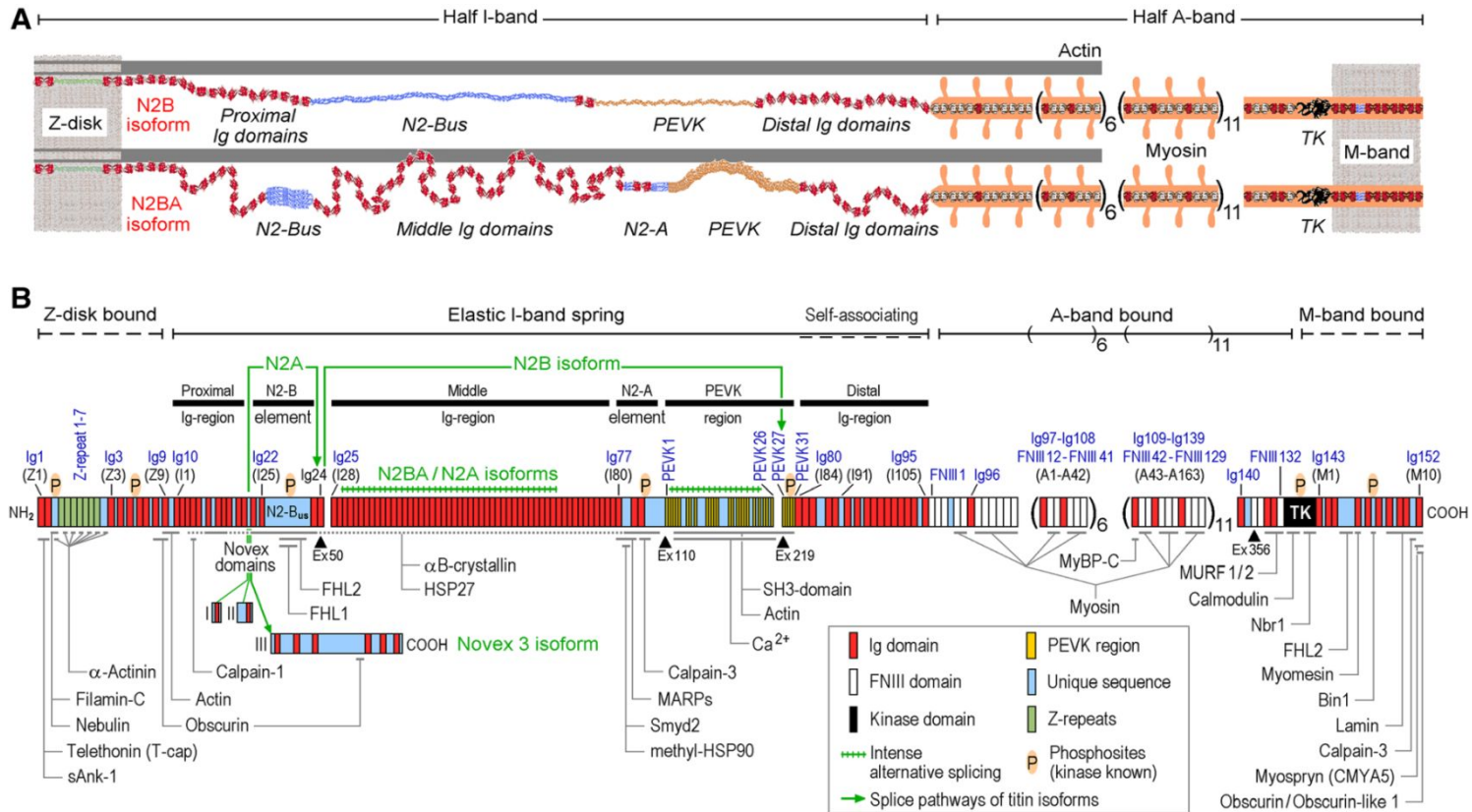
-На Титанике были установлены паровые машины суммарной мощностью **38390 л.с.**

Титин – полифункциональный белок, взаимодействующий со многими белками в саркомере.

Somerville LL, Wang K.
mere matrix of
striated muscle: in
vivo phosphorylation
of titin and nebulin in
mouse diaphragm
muscle

Arch Biochem Biophys.
1988
Apr;262(1):118-29.

Известно, что и
титин, и небулин
фосфорилируются
in vivo.

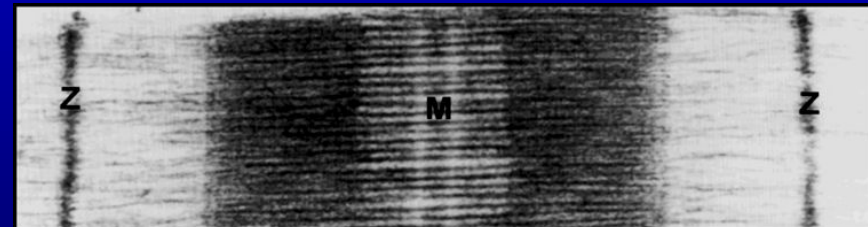


Domain structure of titin-isoforms and binding sites of titin ligands. A, Layout of titin-isoforms in the cardiac half-sarcomere, showing stiff N2B coexpressed with compliant N2BA. B, Domain structure of the canonical titin sequence (UniProtKB identifier Q8WZ42-1), main splicing pathways (green lines), and binding sites of known titin ligands. CMYA5, cardiomyopathy-associated protein-5; Ex, exon in genomic human titin sequence; FHL1 and 2, four-and-a-half-LIM-domain protein-1 and -2; FNIII, fibronectin type III-like domain; HSP27, heat shock protein-27; HSP90, heat shock protein-90; Ig, immunoglobulin-like domain; MARPs, muscle ankyrin repeat proteins; MURF1/2, muscle-specific RING-finger protein-1/-2; MyBP-C, myosin-binding protein-C; Nbr1, neighbor of BRCA1 gene-1; P, titin phosphosite (kinase known); PEVK, titin region rich in proline, glutamate, valine, and lysine; sANK-1, small ankyrin-1 isoform; Smyd2, SET and MYND domain-containing protein-2; and TK, titin kinase domain.

Proteomic databases list hundreds of potential phosphosites in titin searchable by web-based resources, for example, <http://gygi.med.harvard.edu/phosphomouse/index.php> or <http://cpr1.sund.ku.dk/cgi-bin/PTM.pl>.

Функции титина

- служит остовом для сборки миозиновых нитей и саркомера во время миофибриллогенеза;
 - регулирует длину миозинсодержащих нитей и отвечает за расположение их в центре саркомера;
 - вносит вклад в пассивное напряжение, развиваемое мышцей при растяжении;
 - участвует в регуляции мышечного сокращения.
- Кроме этого результаты недавно проведенных исследований позволяют сделать предположение, что титин может выполнять в саркомере роль сенсора натяжения (механосенсора, stretch sensor), участвуя тем самым в регуляции процессов внутриклеточной сигнализации, индуцируемых натяжением.



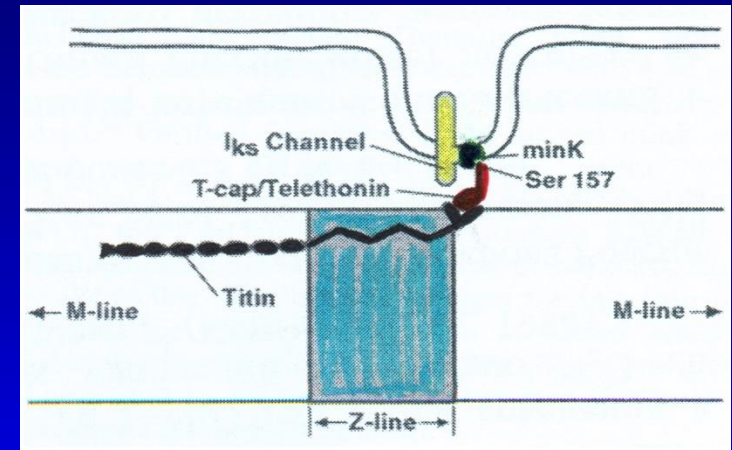
На основе связывания T-сар с LIM белком (CsRP3), участвующим в дифференцировке миоцитов (Knoll et al., 2002), предполагается участие Z-области титина в регуляции экспрессии белков.

Растяжение кардиомиоцита → Экспрессия натрийуретического пептида мозга (BNP) и предсердного натрийуретического фактора (ANF)

LIM ^{-/-} $\xrightarrow{\text{Растяжение кардиомиоцита}}$ Отсутствие экспрессии BNP и ANF

Кроме этого, показано, что нарушения в белковом комплексе LIM/телетонин/Z-домены титина, вызванные нокаутом гена, кодирующего LIM-белок, приводили к развитию дилатационной кардиомиопатии у мышей (Hoshijima, 2006).

Предполагается, что пассивное натяжение, развиваемое титином при растяжении саркомера, регулирует ток калия в клетке (Furukawa et al., 2001).



Обнаружено связывание телетонина с миостатином (мышечным ростовым фактором) и кальсарцином-3 (calsarcin-3), участвующим в регуляции мышечного роста. Полагают, что телетонин может регулировать секрецию миостатина (Nicholas et al., 2002). Функциональная роль титина в этих взаимодействиях неясна.

Область титиновой молекулы в Z-диске саркомера имеет фосфорилируемые участки (Gregorio et al., 1999). Предполагается, что их фосфорилирование может иметь значение для сборки Z-диска во время миогенеза.

«Антимиостатиновый» бык

Миостатин —
белок, который
подавляет рост и
дифференцировку
мышечной ткани.



Исследуются блокаторы действия миостатина через
миостатиновые рецепторы.

Функциональная роль титина в секреции и действии
миостатина неясна.

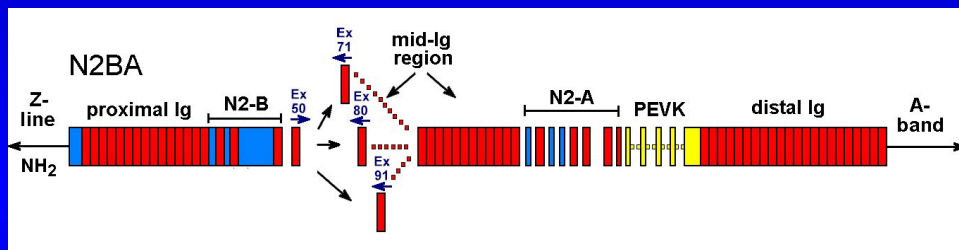
Эластичные элементы I-области титина

- иммуноглобулин-подобные домены (Ig C2)
- уникальные последовательности

N2A

N2B

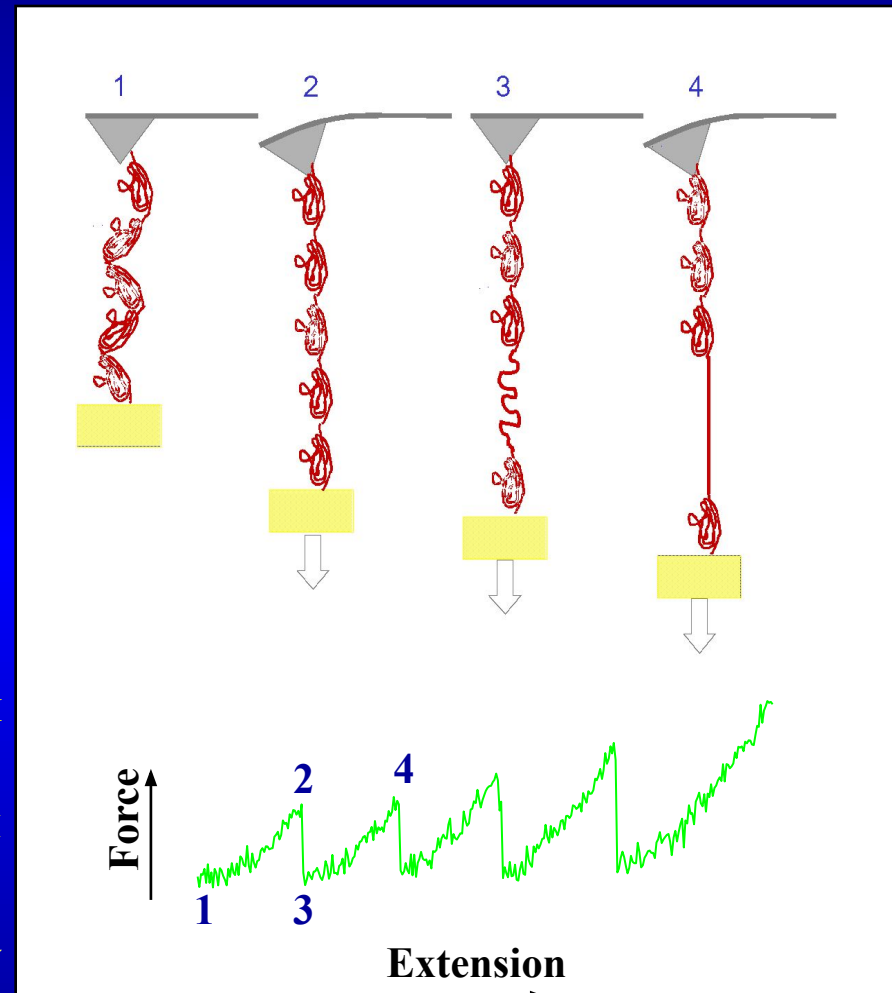
PEVK



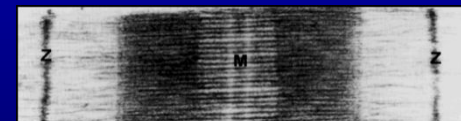
Функции I-области титина:

- Развитие «пассивной» силы при растяжении саркомера сверх длины покоя,
 - Развитие «возвратной» силы при сжатии саркомера короче длины покоя,
- Пассивная и возвратная сила титина регулируют перекрытие толстых и тонких нитей в саркомере, а также центрируют толстые нити в центре саркомера (Horowitz et al., 1986).

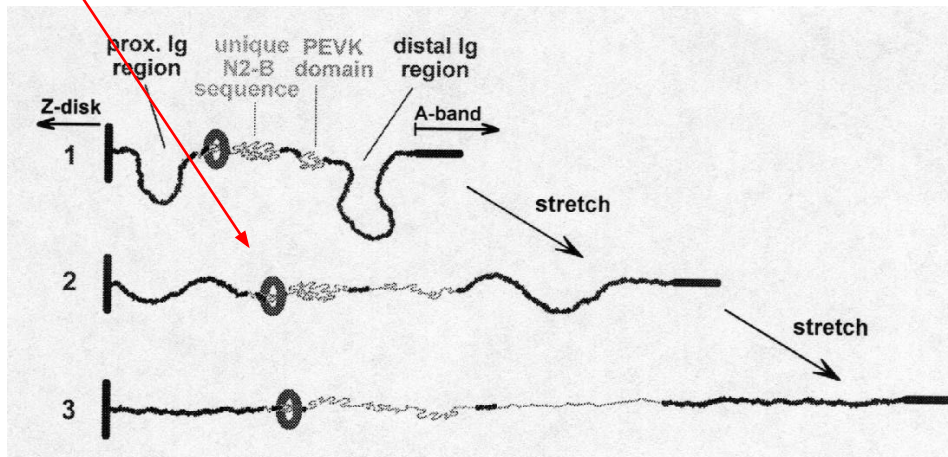
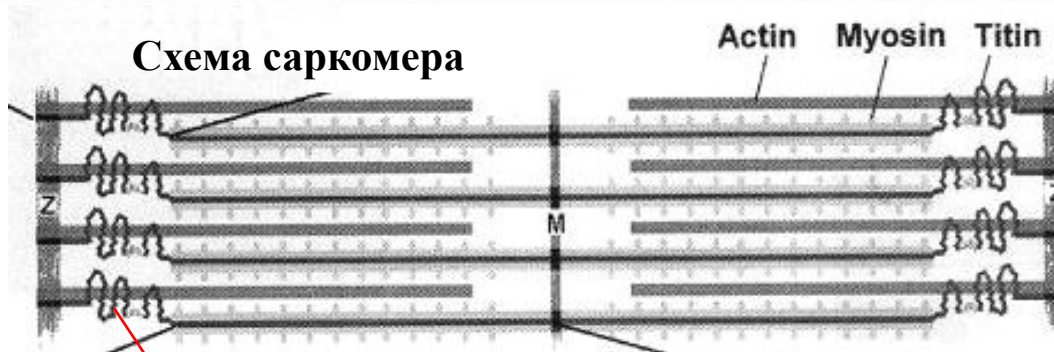
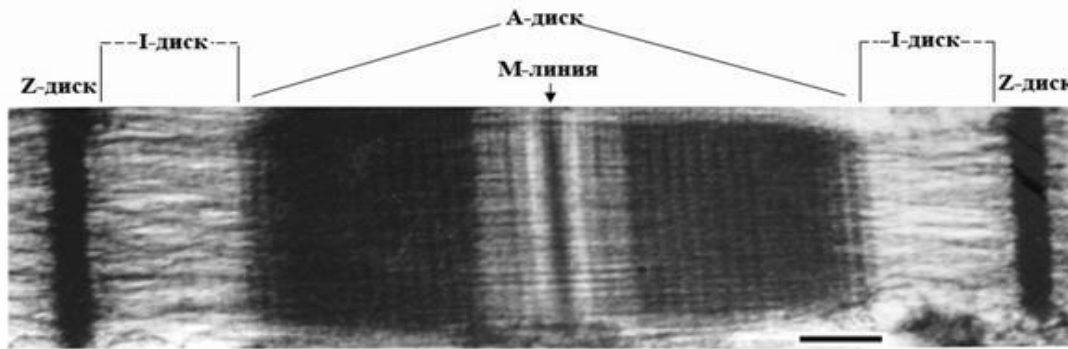
Развитие титином пассивного напряжения при растяжении



M. Carrion-Vazquez et al., 2000



Эластичные функции титина (продолжение)

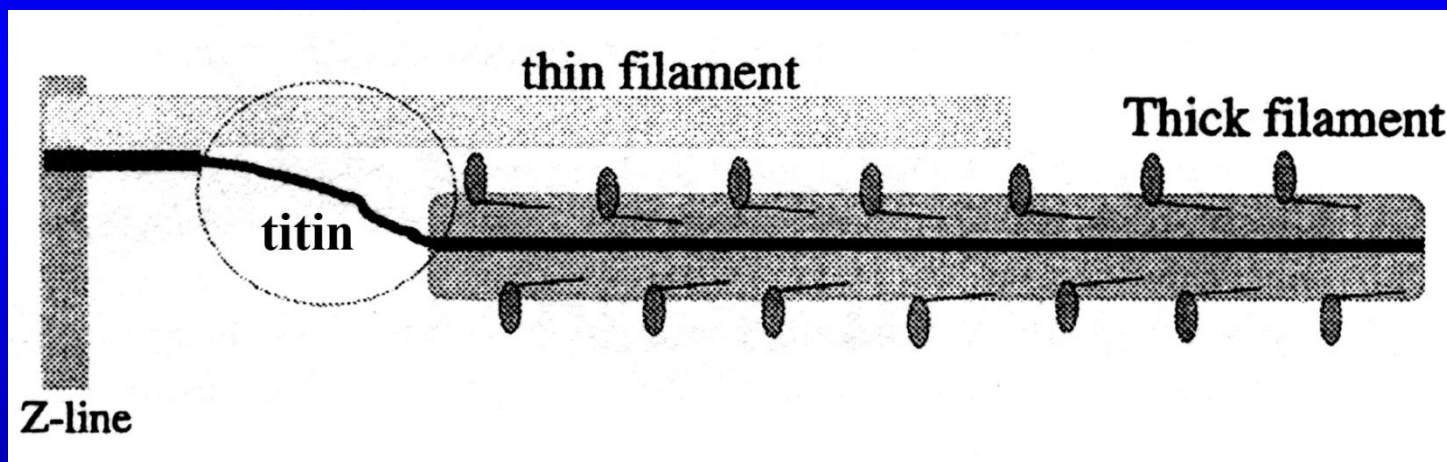


Функция эластичного саркомерного цитоскелета

- Титин вносит вклад в пассивное напряжение, развиваемое мышцей при растяжении и развивает возвратную силу при сокращении саркомера

Упруго-эластичные свойства I-области титина могут быть задействованы и в регуляции актин-миозинового взаимодействия при растяжении саркомера.

Полагают, что развитие пассивного натяжения I-областью титина при растяжении саркомера может модулировать актин-миозиновое взаимодействие, уменьшая расстояние между тонкими и толстыми нитями.

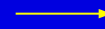


(Cazorla et al., 2000)

Однако при этом необходимо также, чтобы титин, связанный в саркомере с миозиновыми нитями, взаимодействовал и с нитями актина.

Участие I-области титина в процессах внутриклеточной сигнализации

Связывание I-области титина
с комплексом мышечных белков с
анкириновыми повторами (CARP,
ankrd-2, DARP);
с комплексом MAP-киназ
(mytogen-activated protein kinase)



Регуляция экспрессии
мышечных генов,
(Hoshijima, 2006)

Фосфорилирование
N2B/PEVK -
последовательностей титина
сердечной мышцы



Снижение/увеличение
пассивного натяжения,
развиваемого I-областью
титина при растяжении
саркомера
(Krüger et al., 2006).

Функции титина в А-диске и М-линии саркомера

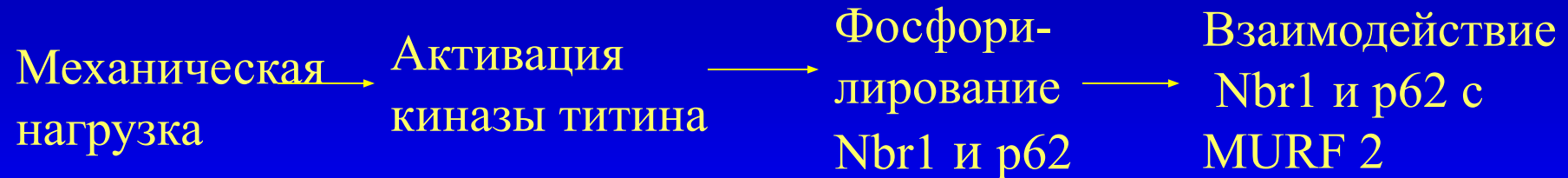


Эта часть молекулы титина нерастяжима и, предположительно, выполняет несколько важных функций:

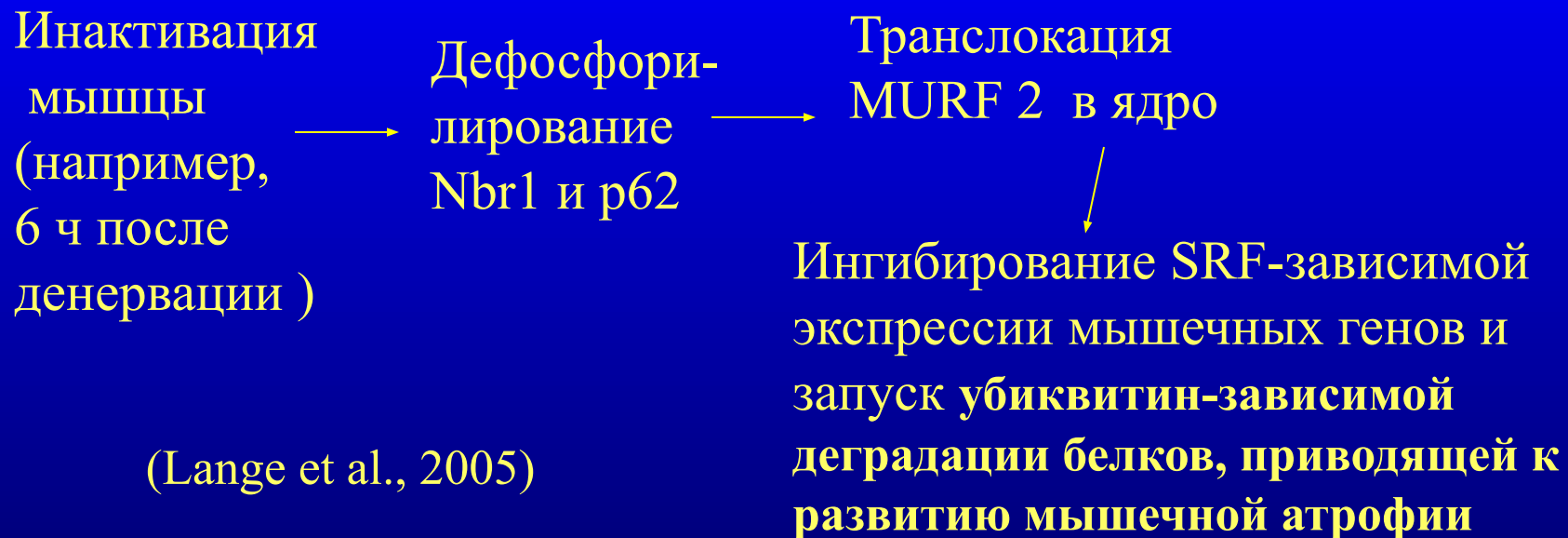
- служит остовом для сборки толстых нитей во время миофибрилlogenеза (Houmeida et al., 1995, Person et al., 2000);**
- Участвует в стабилизации структуры М-линии и всего саркомера (Agarkova et al., 2004);**
- Участвует в регуляции мышечного сокращения, изменяя ферментативные свойства миозина и его Ca^{2+} -чувствительность (Muhle-Goll et al., 2001; Podlubnaya et al., 2003; Вихлянцев, Подлубная 2003).**

Участие киназного домена титина в регуляции генной экспрессии и обмена белков

Активация белкового синтеза



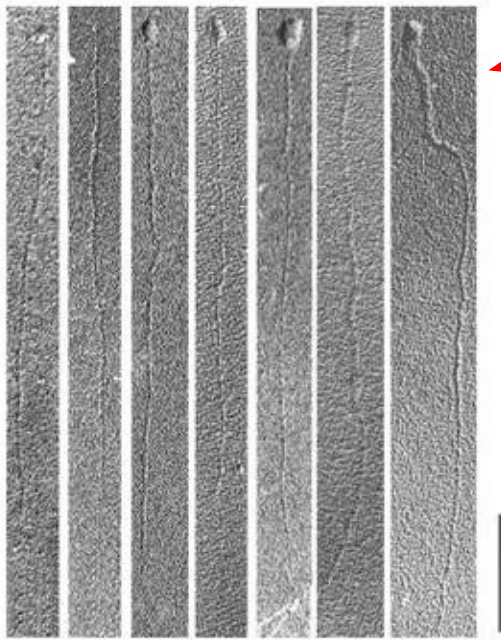
Ингибирование белкового синтеза



(Lange et al., 2005)

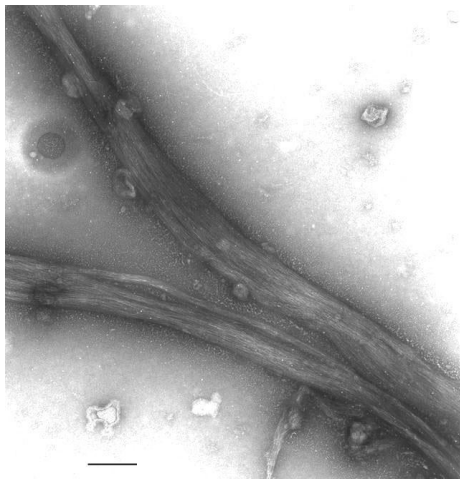
Наши ЭМ исследования титина

Выпрямленные молекулы титина



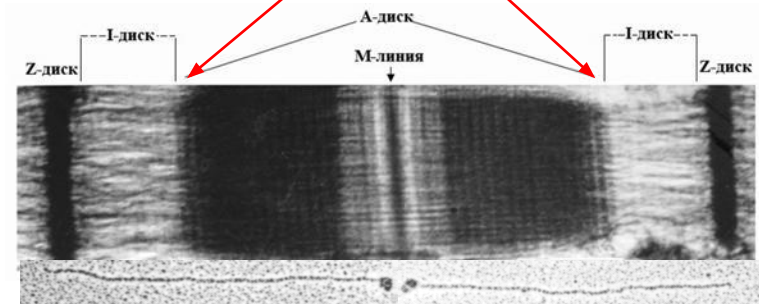
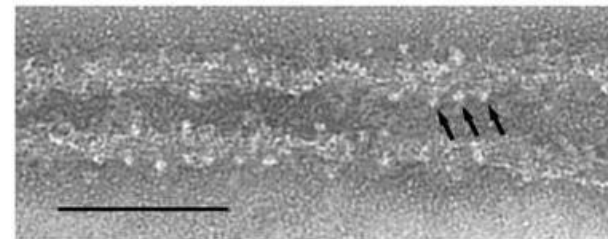
Электронные микрофотографии одиночных выпрямленных молекул титина скелетных мышц кролика (А) и активного суслика (Б) в растворе 0.5 М КСl, 10 мМ имидазол, 50 % глицерин, рН 7.0, полученных методом кругового оттенения платиной. Шкала 200 нм.

Агрегаты титина



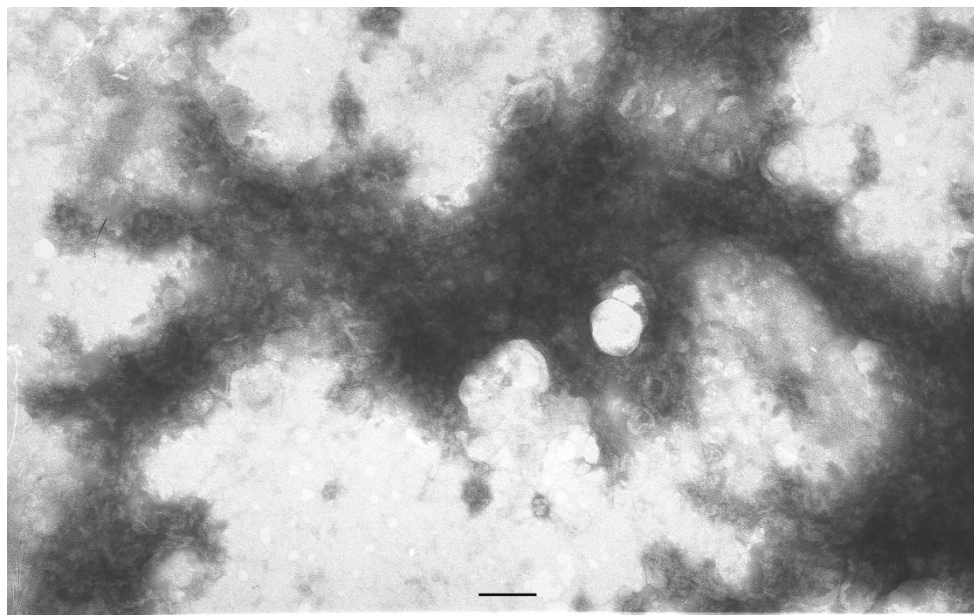
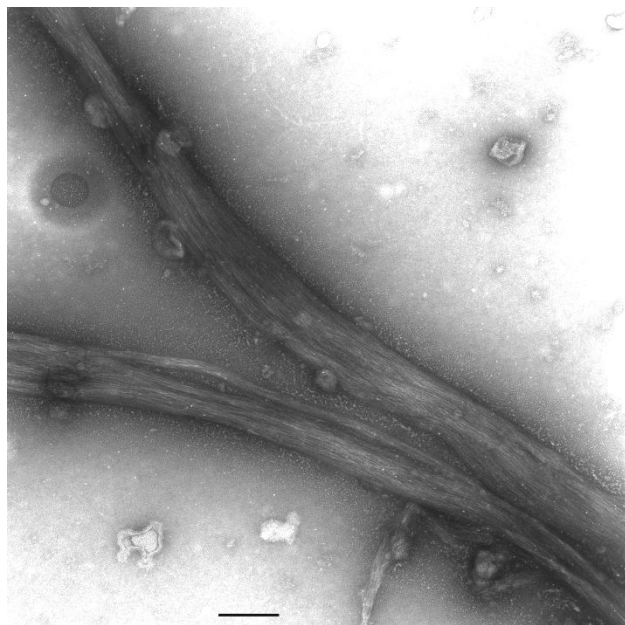
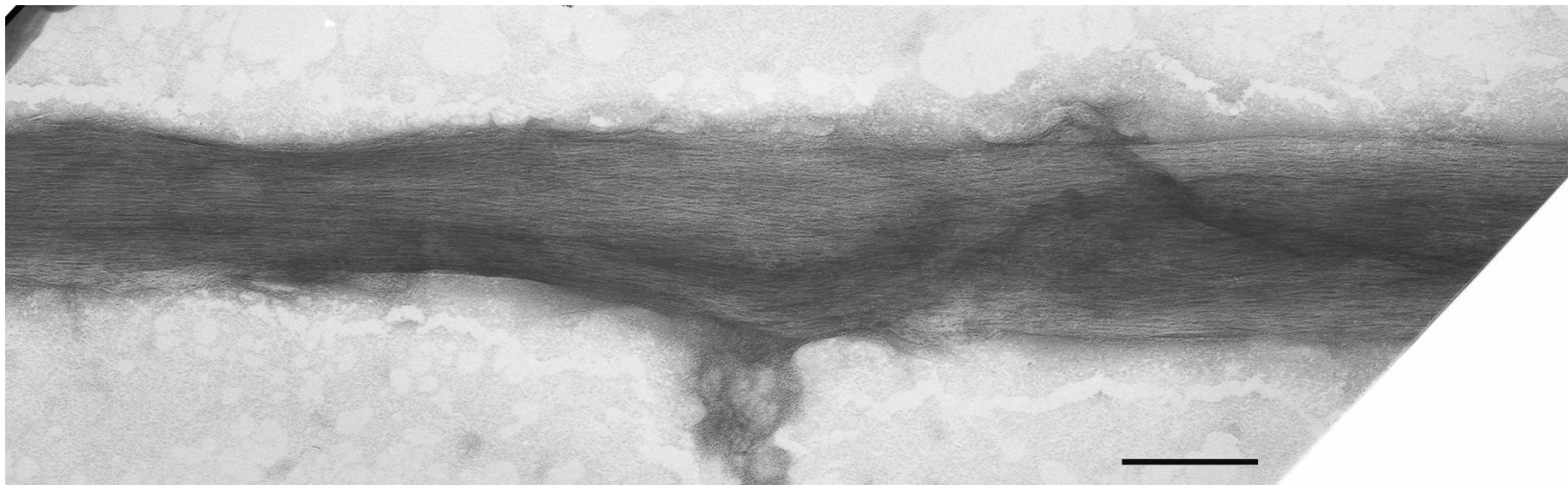
Шкала 200 нм

Нити миозина

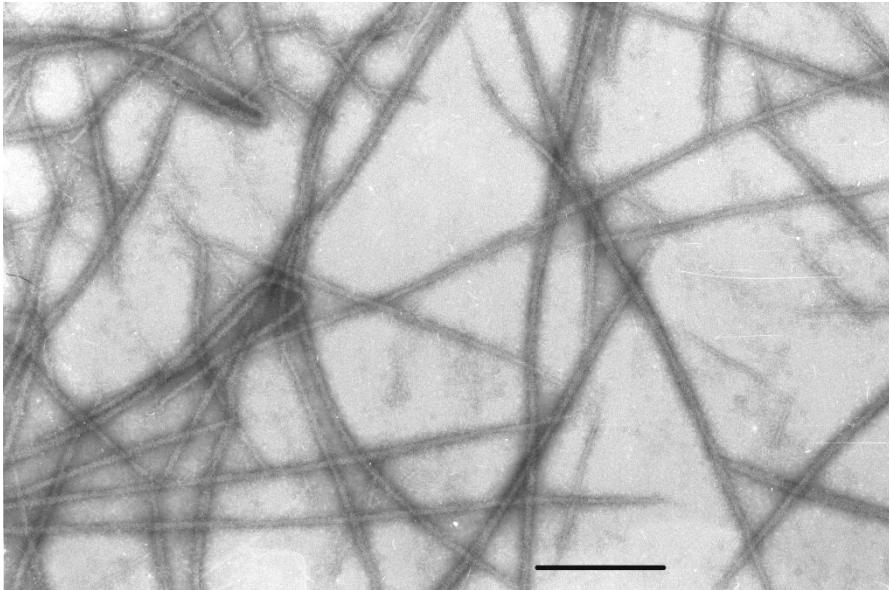


Вихлянцеv, 2005

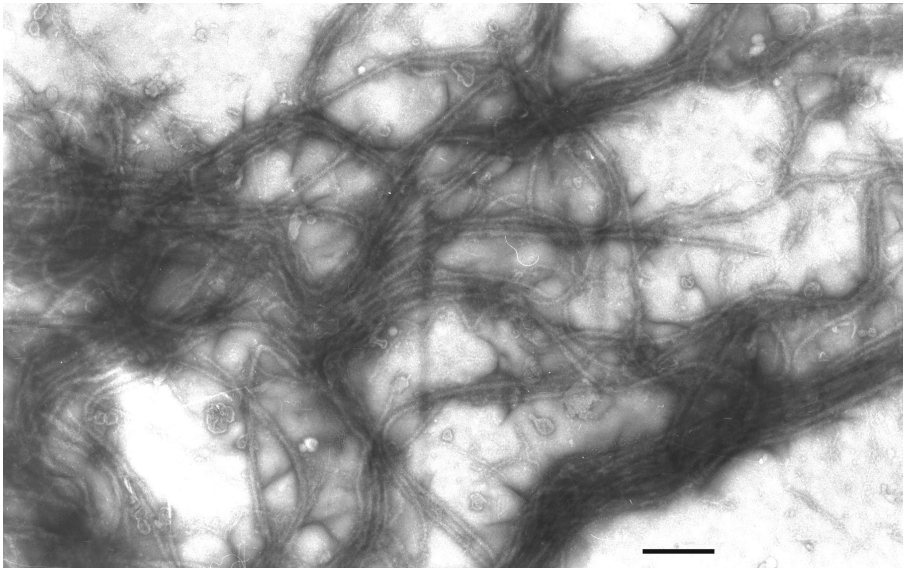
**Агрегаты титина скелетных мышц в растворе
0.1 М KCl, 10 мМ имидазол, рН 7.0. Шкала 200 нм**



Связывание титина с нитями миозина



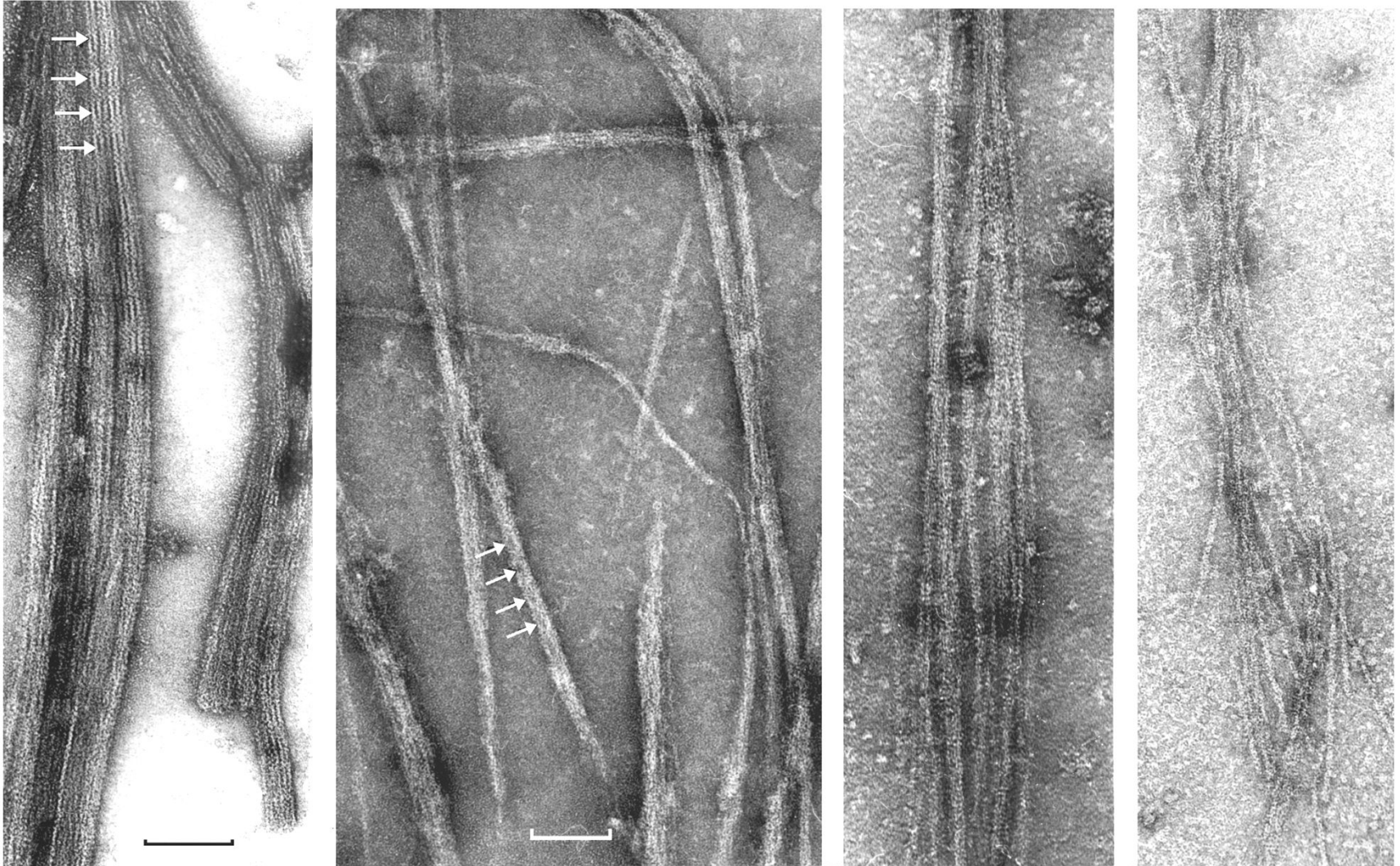
Контрольные нити миозина



**Нити миозина
в присутствии титина**

Наши исследования взаимодействия титина с актином

Взаимодействие паракристаллов Ф-актина (картинка слева) с титином скелетных мышц кролика в растворе 50 мМ $MgCl_2$, 5 мМ имидазол-HCL, pH 7.0. Шкала 100 нм.



**Благодарю за
внимание!**