

ТРОПОНИНЫ И ПАТОЛОГИИ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Обзор

© 2024 А.П. Богомолова^{1,2*}, И.А. Катруха^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

² HyTest Ltd., Турку, Финляндия; электронная почта: bogomolova.agnessa@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.05.2024

После доработки 19.11.2024

Принята к публикации 01.12.2024

Скелетная мускулатура составляет ~30–40% от общей массы тела человека и выполняет важнейшие функции, обеспечивая движение, дыхание, производство тепла, а также метаболизм глюкозы и белков. Повреждения скелетной мускулатуры оказывают негативное влияние на функционирование всего организма, приводят к ухудшению качества жизни и, в тяжёлых случаях, к летальному исходу. Ввиду этого своевременная диагностика и терапия нарушений функционирования скелетной мускулатуры является актуальной задачей современной медицины. Данный обзор посвящён скелетным изоформам тропонинов – белков, входящих в состав тонких филаментов мышечных волокон и участвующих в регуляции мышечного сокращения. Описаны биохимические свойства скелетных изоформ тропонинов, а также опыт их использования в качестве белков-маркеров повреждения скелетных мышц. В связи с тем, что удобным и чувствительным методом детекции белков-маркеров является иммунохимическое определение в биологических жидкостях, проанализированы факторы, способные оказывать влияние на иммунохимическую детекцию скелетных изоформ тропонинов, которые необходимо учитывать при разработке диагностических тест-систем. Помимо этого, показано, что некоторые мутации в этих белках могут приводить к развитию заболеваний: данные по известным на сегодняшний день мутациям представлены в обзоре. И, наконец, скелетные изоформы тропонинов рассмотрены как мишени для лекарственных средств, разрабатываемых для терапии заболеваний скелетных мышц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: скелетная мускулатура, тропонин, старение, миопатия, биомаркер, моноклональные антитела.

DOI: 10.31857/S0320972524120018 EDN: IGIUDM

ВВЕДЕНИЕ

У млекопитающих поперечно-полосатая мускулатура представлена двумя типами ткани – скелетной и сердечной. Скелетные мышцы составляют около 30–40% от общей массы тела и выполняют важнейшие функции, обеспечивая в т.ч. движение, дыхание и производство тепла [1, 2]. На них приходится основная доля метаболизма глюкозы, липидов и белков. Повреждения и патологии скелетной мускулатуры могут

оказывать значительное влияние на различные аспекты функционирования всего организма, приводить к ухудшению качества жизни и, в тяжёлых случаях, к летальному исходу.

Нарушения функционирования скелетных мышц могут быть вызваны механическими повреждениями, рабдомиолизом, миопатиями и другими заболеваниями, сопровождающимися мышечной атрофией. Наиболее частыми причинами механического повреждения скелетных мышц являются различные травмы,

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотный остаток; бсТнИ – быстрый скелетный ТнИ; бсТнС – быстрый скелетный ТнС; бсТнТ – быстрый скелетный ТнТ; мсТнИ – медленный скелетный ТнИ; мс/сТнС – медленный скелетный/сердечный ТнС; мсТнТ – медленный скелетный ТнТ; сТнИ – сердечный ТнИ; сТнТ – сердечный ТнТ; ТнИ – тропонин И; ТнС – тропонин С; ТнТ – тропонин Т.

* Адресат для корреспонденции.

в т.ч. синдром длительного сдавления, хирургическое вмешательство, повышенная физическая нагрузка [3]. Термин «миопатия» описывает любые заболевания скелетной мускулатуры различной этиологии. Данные патологии зачастую сопровождаются повреждениями структуры скелетной мышцы и развитием метаболических нарушений в ткани [4]. Миопатии разделяют на врождённые (наследуемые) и приобретённые (вторичные). Наследуемые миопатии включают в себя мышечные дистрофии (связаны с мутациями в генах белков сократительного аппарата, например, мышечная дистрофия Дюшенна и мышечная дистрофия Беккера); конгенитальные миопатии (например, немалиновая и коровая миопатии); метаболические миопатии (связаны с мутациями в генах различных ферментов, участвующих в метаболизме углеводов и липидов); митохондриальные миопатии (связаны с мутациями белков окислительного фосфорилирования митохондрий) и каналопатии [5–8]. Мышечные дистрофии – одни из наиболее распространённых и тяжёлых видов наследуемых миопатий, для некоторых из которых, например, мышечной дистрофии Дюшенна, характерна прогрессирующая мышечная слабость и атрофия, приводящая в итоге к смерти от сердечно-лёгочной недостаточности [9]. Среди приобретённых миопатий выделяют воспалительные миопатии (чаще всего аутоиммунной природы, такие как дерматомиозит и полимиозит); миопатии, ассоциированные с различными инфекциями (вызываемые бактериями, грибами или вирусами); токсические миопатии (вызванные в т.ч. отравлением наркотическими веществами или алкоголем, приёмом миотоксичных лекарственных препаратов, таких как статины, фибраты и др.); миопатии, ассоциированные с различными патологиями (ревматические и эндокринные заболевания, злокачественные опухоли и др.); идиопатические и эндокринные миопатии [10–13].

Ещё одной опасной патологией скелетных мышц является рабдомиолиз – процесс разрушения скелетной мышцы с высвобождением в кровоток внутриклеточных компонентов, в тяжёлых случаях угрожающий жизни. При разрушении более 100 г мышечной ткани концентрация миоглобина в крови достигает критических значений, и значительное количество белка осаждается в почечных канальцах. Данный процесс может спровоцировать острую почечную недостаточность, которая является основной причиной летальных исходов при рабдомиолизе [12, 14]. У детей основными факторами, приводящими к развитию данной патологии, являются вирусные миозиты, травмы, ревматические заболевания, физические упражнения высокой интенсивности и приём лекарственных препаратов [12].

У взрослых возникновение рабдомиолиза наиболее часто обусловлено злоупотреблением алкоголем или наркотическими веществами, приёмом лекарственных препаратов, травмами, злокачественным нейрореплетическим синдромом или обездвиженностью [5, 12].

Миопатии сопровождаются мышечной атрофией – потерей мышечной массы и силы, при которой катаболизм мышечных белков преобладает над анаболизмом. Помимо миопатий, и другие заболевания и патологии могут приводить к развитию мышечной атрофии. К ним относят хроническую сердечную недостаточность, хроническую обструктивную болезнь лёгких, рак, хронические почечные заболевания, болезнь Альцгеймера, инфекционные заболевания [15, 16]. Также к мышечной атрофии приводит обездвиживание и неиспользование мускулатуры, связанное, например, с параличом или длительной госпитализацией [3].

Отдельно стоит отметить саркопению (от греческих слов «sarx» (плоть) и «penia» (нехватка)) – потерю мышечной массы, происходящую при старении. При саркопении происходит уменьшение поперечной площади и числа мышечных волокон и накопление жировой и соединительной ткани в скелетной мышце, это процесс прогрессирующей и генерализованной потери мышечной массы и силы, который влечёт за собой низкую физическую работоспособность и, при длительном развитии, гериатрическую слабость [17]. Для этого состояния характерны повышенный риск болезненности, падений, ограничений в повседневной активности, плохой прогноз после хирургического вмешательства и, в конечном счёте, высокая смертность [16]. Распространённость саркопении достигает 13% среди людей 60–70 лет и 50% среди людей ≥ 80 лет [17]. Наличие диабета повышает риск развития саркопении в 2 раза и дальнейшей гериатрической слабости – в 1,5–4 раза [18]. Таким образом, актуальность этих проблем возрастает в связи с увеличением продолжительности жизни. На сегодняшний день для снижения прогрессирования саркопении используют коррекцию питания и физические упражнения, но при этом разрабатываются стратегии терапии, направленные на предотвращение мышечного повреждения [16–18].

Скелетная мускулатура – основной инсулин-зависимый потребитель глюкозы, поэтому потеря мышечной массы при саркопении может приводить к развитию инсулинорезистентности и, в конечном счёте, сахарному диабету 2 типа. Кроме того, формированию данных заболеваний может способствовать адипоз скелетной мышцы, наблюдаемый при саркопении [17, 19]. При саркопении и при сахарном диабете 2 типа могут развиваться функциональные нарушения,

для которых необходима диагностика и своевременное лечение. Таким образом, важным является мониторинг уменьшения массы скелетных мышц, особенно у людей с диабетом.

У человека выявлены три типа скелетных мышечных волокон: медленные, 1 типа, и быстрые (2А и 2Х типа; у других млекопитающих также есть волокна 2В типа) [20, 21]. Мышечные волокна 2А типа более устойчивы к утомлению, чем волокна 2Х типа, и содержат в своём составе больше ферментов окислительного метаболизма [22]. Состав мышцы зависит от выполняемой ею функции: мышцы, отвечающие за поддержание положения тела, в основном состоят из волокон медленного типа, в то время как мышцы, необходимые для движения, преимущественно состоят из волокон быстрого типа [21].

Развитие некоторых патологий может приводить к повреждению мышечных волокон только определённого типа. Так, при мышечной дистрофии Дюшенна повреждаются преимущественно быстрые мышечные волокна, наиболее сильно – волокна 2Х типа [23]. Мышечные повреждения, индуцированные приёмом статинов, затрагивают преимущественно волокна быстрого типа, в то время как приём фибратов – преимущественно волокна медленного типа [24, 25]. При интенсивных эксцентрических сокращениях также повреждаются волокна преимущественно быстрого типа [26]. Для многих патологических состояний, сопровождающихся мышечной атрофией, характерна не только атрофия определённого типа мышечных волокон, но и смена одних волокон на другие. Так, при денервации или обездвиженности конечности, при травме спинного мозга, при длительном постельном режиме обычно происходит смена медленных волокон на быстрые [27]. Обратный процесс, смена быстрых волокон на медленные, происходит при голодании, приёме глюкокортикоидов, кахексии и саркопении [27]. Помимо этого, для мышечных волокон быстрого и медленного типа показана разная способность к регенерации после повреждения. Так, на крысах было показано, что если мышцы, состоящие преимущественно из волокон быстрого типа (например, *extensor digitorum*, разгибатель пальцев), регенерируют эффективно, то мышцы, состоящие преимущественно из волокон медленного типа (например, *soleus*, камбаловидная мышца), не регенерируют полностью, и на месте мышечной ткани развивается фиброз [28].

Широко применяемыми способами диагностики повреждений скелетной мускулатуры являются различные инструментальные методы: магнитно-резонансная томография, компьютерная томография, двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия [29]. Данные подходы

позволяют неинвазивно детектировать изменения в скелетных мышцах (отёк, замену на жировую и соединительную ткань, мышечную атрофию), определять конкретные участки повреждений и даже проводить количественную оценку изменений в структуре скелетной мускулатуры [30–34]. Однако недостатком инструментальных методов является необходимость наличия дорогостоящего оборудования и специализированных мест для проведения манипуляций. Альтернативой является определение концентрации в крови биомаркеров – белков скелетной мускулатуры, высвобождающихся в кровоток при повреждении мышечных волокон. Наиболее широко используемыми на данный момент маркерами повреждения скелетной мускулатуры, являются креатинкиназа, а также аспаратаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа и миоглобин [35]. В то же время необходимо отметить, что все вышеперечисленные белки не обладают специфичностью: помимо скелетной мускулатуры, они экспрессируются и в других тканях, что может снижать точность проводимой диагностики. В исследованиях, направленных на поиск и анализ новых маркеров повреждения скелетных мышц, выделяют такие белки, как связывающий жирные кислоты белок 3, лёгкие цепи миозина 3, ММ-изоформа креатинкиназы, а также скелетные изоформы тропонина И (ТнИ) [36]. Несмотря на то что все вышеперечисленные белки сравнимы или превосходят по чувствительности маркеры, используемые на сегодняшний день, среди них лишь один белок – скелетные изоформы ТнИ – специфичен для скелетной мускулатуры [9, 36, 37]. ТнИ вместе с тропонином Т (ТнТ) и тропонином С (ТнС) образует тропониновый комплекс, который участвует в регуляции мышечного сокращения [38, 39]. Изоформы ТнТ также специфичны для скелетной мускулатуры, однако мы не нашли данных, подтверждающих их использование в качестве маркера повреждения мышц. Возможность его использования как маркера требует дальнейшего изучения.

На протяжении многих лет скелетные тропонины привлекали внимание исследователей с точки зрения изучения регуляции мышечного сокращения. В данном обзоре мы описываем роль этих белков в развитии некоторых заболеваний скелетных мышц и рассматриваем возможность их применения для диагностики и терапии повреждений скелетной мускулатуры.

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРОПОНИНОВ

Тропонин И. ТнИ представлен в организме человека тремя изоформами: сердечной (сТнИ)

Таблица 1. Некоторые свойства скелетных изоформ ТНИ человека

Изоформы	Быстрый скелетный ТНИ (Uniprot P48788)	Медленный скелетный ТНИ (Uniprot P19237)
Ген	<i>TNNI2</i>	<i>TNNI1</i>
Хромосомный локус	11p15.5	1q32.1
Число экзонов	8	9
Число а.о.	182	187
Молекулярная масса (кДа)	21,3	21,7
Изоэлектрическая точка	8,9	9,6
Тканевая специфичность	быстрые скелетные мышечные волокна	медленные скелетные мышечные волокна, эмбриональные кардиомиоциты

и двумя скелетными, быстрой (бсТНИ) и медленной (мсТНИ). бсТНИ и мсТНИ экспрессируются в мышечных волокнах быстрого и медленного типа соответственно (табл. 1) [23, 40]¹. мсТНИ также экспрессируется в сердечной мышце в ходе эмбрионального развития и заменяется сТНИ в постнатальном периоде [41]. сТНИ экспрессируется только в сердечной мускулатуре после рождения [42, 43].

ТНИ препятствует взаимодействию миозина и актина в отсутствие Ca^{2+} . В присутствии Ca^{2+} ингибиторный домен ТНИ диссоциирует с поверхности актина, что способствует образованию актомиозинового комплекса [44, 45]. Основным отличием скелетных изоформ ТНИ и сТНИ является наличие в сердечной изоформе белка уникальной *N*-концевой последовательности длиной в 31 аминокислотный остаток (а.о., 2–32) (рис. 1). Фосфорилирование а.о. Ser23 и Ser24 в составе этого участка считают одним из способов регуляции мышечного сокращения [48]. Среди скелетных изоформ ТНИ структура была расшифрована только для бсТНИ. Наиболее высокое разрешение было получено методом рентгеноструктурного анализа для бсТНИ курицы в комплексе с ТнС и фрагментом ТнТ как в насыщенном Ca^{2+} состоянии (с разрешением в 3,00 Å), так и в отсутствие ионов Ca^{2+} (с разрешением в 7,00 Å) [46]. Структура бсТНИ была расшифрована для всей молекулы белка, за исключением её *C*-концевого участка.

В молекуле ТНИ можно выделить несколько функциональных участков: ИТ-рука, ингибиторный домен, регуляторный домен и *C*-концевой участок. Для медленной скелетной изоформы примерные границы участков определены исходя из сходства последовательности мсТНИ с бсТНИ и сТНИ [46, 47]. ИТ-рука (~2–106 (а.о.) для бсТНИ; ~2–107 для мсТНИ; мсТНИ человека; нумерация может отличаться у различных видов животных) выполняет структурную функцию: она состоит из *N*-концевого участка, связывающего *C*-концевой домен ТнС (~2–40 бсТНИ и мсТНИ), и ТнТ-связывающего участка (~50–106 бсТНИ и ~50–107 мсТНИ). ИТ-рука образована двумя противоположно направленными α -спиралями: Н1 (~12–48 бсТНИ и мсТНИ) и Н2 (~58–103 бсТНИ; ~59–104 мсТНИ), соединённых линкером (~49–57 бсТНИ; ~49–58 мсТНИ). Ингибиторный домен (~107–115 бсТНИ; ~108–116 мсТНИ) в отсутствие ионов Ca^{2+} взаимодействует с актином, в то время как при повышении концентрации Ca^{2+} он диссоциирует от тонкого филамента (при этом также происходит смещение тропомиозина), и актин становится доступным для связывания миозином. Регуляторный домен (~116–131 бсТНИ; ~117–132 мсТНИ), который включает в себя α -спираль Н3 (~118–127 бсТНИ; ~119–128 мсТНИ, сТНИ), при повышении концентрации Ca^{2+} связывается с *N*-концевым доменом ТнС, что приводит к диссоциации ингибиторного домена ТНИ от актина, смещению тропомиозина и взаимодействию миозина с актином.

C-Концевой участок бсТНИ не удалось кристаллизовать в связи с его подвижностью. Согласно некоторым данным, полученным с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для быстрого скелетного тропонинового комплекса курицы, *C*-концевой участок не имеет вторичной структуры и находится в неупорядоченном состоянии, причём как в отсутствие, так и в присутствии Ca^{2+} [49, 50]. Согласно данным, полученным методом малоуглового нейтронного рассеяния, при низких концентрациях Ca^{2+} *C*-концевой участок бсТНИ представляет из себя удлинённую структуру, которая предположительно может быть суперскрученной спиралью или β -слоями, в то время как в присутствии Ca^{2+} участок приобретает компактную структуру [51]. Ещё одни результаты, полученные методом ЯМР, свидетельствуют о том, что *C*-концевой участок бсТНИ курицы имеет вторичную структуру, состоящую из α -спирали, двух β -слоёв и ещё двух α -спиралей [52–54]. Считается, что *C*-концевой участок взаимодействует с актином в отсутствие Ca^{2+} и таким образом участвует в ингибировании связывания актина и миозина [52, 55, 56].

¹ Для всех белков в этом обзоре нумерация начинается с *N*-концевого метионина.

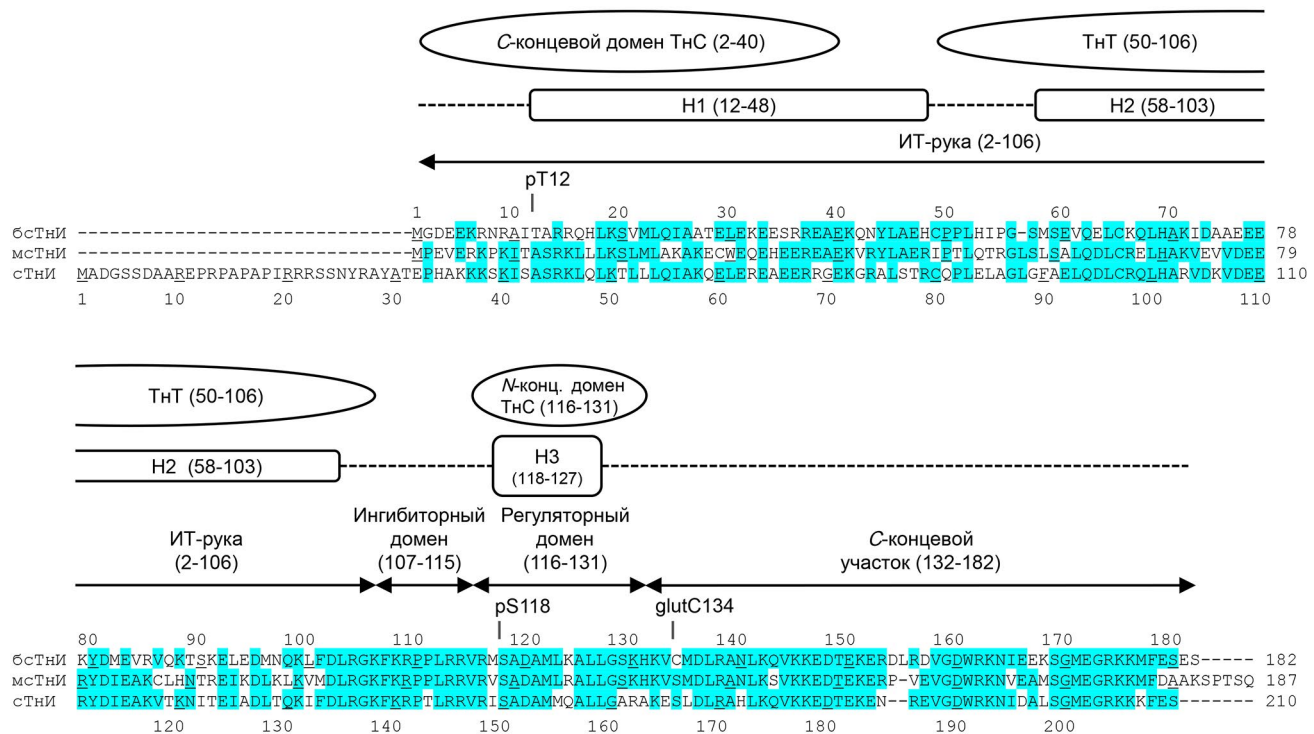


Рис. 1. Выравнивание трёх изоформ ТНИ человека: бсТНИ, мсТНИ и сТНИ. Аминокислотные последовательности белков из базы данных Uniprot: бсТНИ (TNNI2_HUMAN, P48788), мсТНИ (TNNI1_HUMAN, P19237), сТНИ (TNNI3_HUMAN, P19429). Выравнивание произведено в программе Clustal Omega. Голубым цветом отмечены совпадающие а.о. Прямоугольники обозначают границы α -спиралей (нумерация а.о. указана для последовательности бсТНИ). Стрелками отмечены сайты связывания ТnC и ТnТ. Над последовательностями указаны возможные участки фосфорилирования бсТНИ и мсТНИ (p) и глутатионилирования бсТНИ (glut) [44–47]

Тропонин Т. ТnТ, как и ТnИ, представлен в организме человека тремя изоформами: сердечной (сТnТ) и двумя скелетными, быстрой (бсТnТ) и медленной (мсТnТ) (табл. 2). бсТnТ и мсТnТ экспрессируются только в скелетных мышцах, в то время как сТnТ экспрессируется не только в сердце, но и в скелетной мускулатуре в ходе эмбрионального развития и в неонатальный период [57, 58].

Функция ТnТ заключается в прикреплении тропонинового комплекса к актиновому филаменту и в регуляции взаимодействия тропонинового комплекса с белками тонкого филамента [59]. В состав молекулы ТnТ входит N-концевой переменный участок и консервативные центральный и C-концевой участки (рис. 2). N-Концевой домен ТnТ переменен не только по аминокислотному составу, но и по длине, и разнообразию форм является результатом альтернативного сплайсинга. В составе консервативной части расположены две α -спирали, H1 (~162–188 для бсТnТ) и H2 (~196–240 для бсТnТ). H2 ТnТ образует суперскрученную спираль с H2 ТnИ, а своим C-концом взаимодействует с ТnC [46, 47, 60–62]. В состав консервативной части также входят два участка взаимодействия с тропомиозином, Тm1 и Тm2. Расположение Тm1 определено с достаточной точностью (~61–99

для бсТnТ; ~65–103 для мсТnТ), в то время как данные о локализации Тm2 противоречивы. Jin и Chong [60] считают, что Тm2 располагается между а.о. ~161–200 бсТnТ и ~165–204 мсТnТ, при этом в других работах предполагается, что Тm2 сформи-

Таблица 2. Некоторые свойства скелетных изоформ ТnТ человека

Изоформы	Быстрый скелетный ТnИ (Uniprot P45378)	Медленный скелетный ТnИ (Uniprot P13805)
Ген	<i>TNNT3</i>	<i>TNNT1</i>
Хромосомный локус	11p15.5	19q13.42
Число экзонов	19	14
Число а.о.	245–269	251–278
Молекулярная масса (кДа)	29,1–31,8	30–33
Изоэлектрическая точка	5,7–9	5,6–6,1
Тканевая специфичность	скелетные мышцы	скелетные мышцы

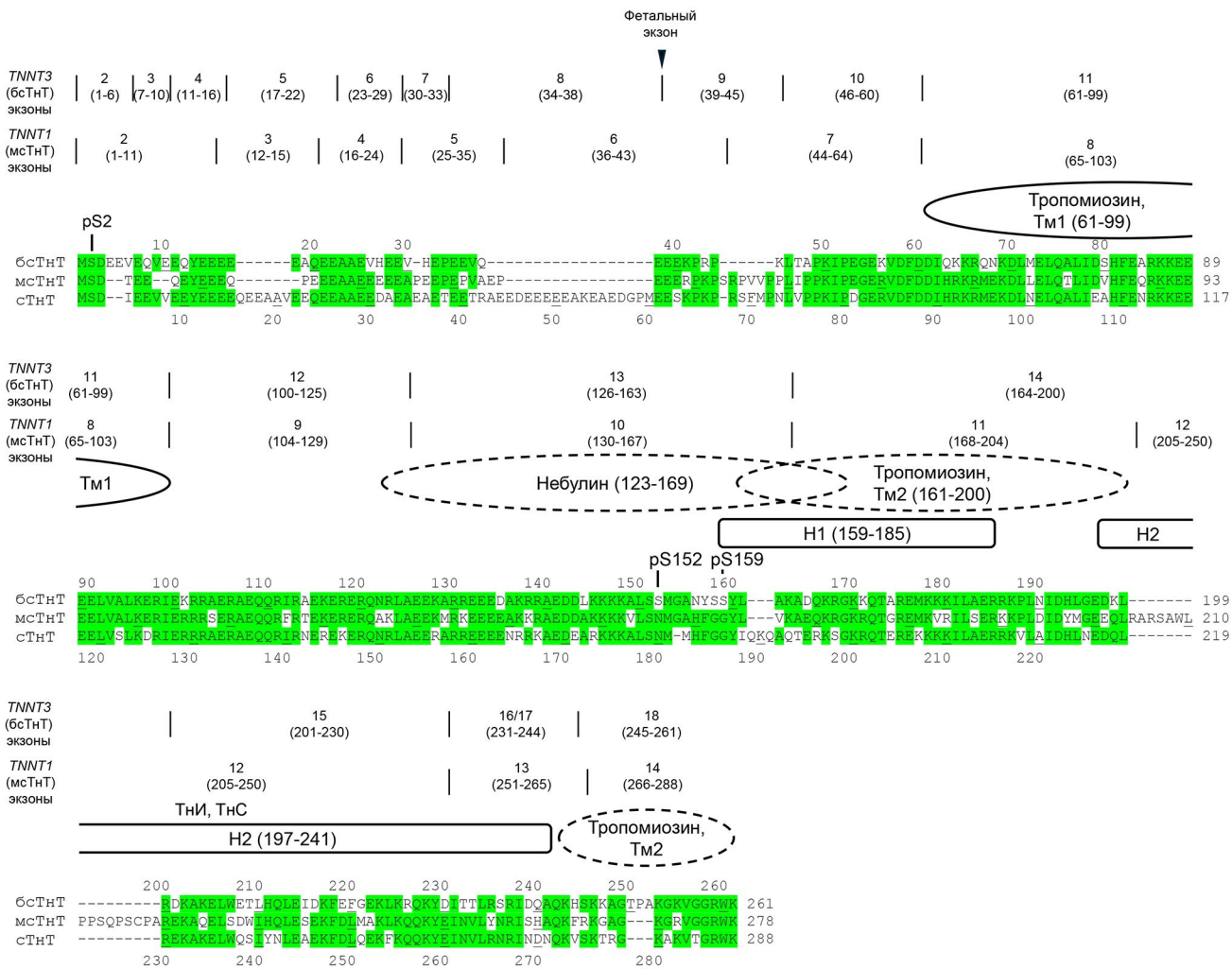


Рис. 2. Выравнивание трёх изоформ ТнТ человека: бсТнТ, мсТнТ и сТнТ. Последовательности белков взяты из базы данных Uniprot: бсТнТ (TNNT3_HUMAN, P45378-3), мсТнТ (TNNT1_HUMAN, P13805-1), сТнТ (TNNT2_HUMAN, P45379-6). Выбраны наиболее длинные сплайсоформы, представленные в организме взрослого человека (для бсТнТ и сТнТ – не содержащие фетальных экзонов). Выравнивание произведено в программе Clustal Omega. Зелёным цветом выделены идентичные а.о. Экзональная структура бсТнТ и мсТнТ приведена над выравниванием. Прямоугольники обозначают границы α -спиралей (нумерация а.о. указана для последовательности бсТнТ), над H2 отмечен участок взаимодействия с ТнИ и ТнС. Овалом со сплошной линией отмечен сайт взаимодействия с тропомииозином Тм1, овалами с пунктирной линией отмечены предполагаемые места связывания с тропомииозином Тм2 и возможный сайт связывания с небулином. Над последовательностями указаны возможные участки фосфорилирования бсТнТ [46, 47, 60, 63–66, 69, 70]

рован самыми С-концевыми остатками молекулы ТнТ [63–66]. Данные, полученные при исследованиях структуры тонких филаментов сердца методами криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) и криоэлектронной томографии (крио-ЭТ), позволяют предполагать, что сТнТ связывается сразу с двумя цепями тропомииозина. Тм2 ТнТ связывается с той же цепью тропомииозина, что и ТнИ, в то время как Тм1 взаимодействует с соседней нитью белка [67, 68]. Исследования структуры тонких филаментов сердца и скелетных мышц методами крио-ЭМ и крио-ЭТ показали, что бсТнТ, вероятно, взаимодействует с белком скелетных мышц небулином, который, как и тропомииозин, связывается

с актином по всей его длине. Структура ТнТ и небулина ещё не получена, однако предполагают, что участок R134–R179 бсТнТ мыши (соответствует R123–R169 бсТнТ человека) содержит в своём составе два сайта связывания с небулином [69].

Ген *TNNT3*, кодирующий бсТнТ, содержит в своём составе 19 экзонов. Из них 8 экзонов – кодирующие *N*-концевые участки экзоны 4–8 и фетальный экзон, а также кодирующие *C*-концевой участок экзоны 16 и 17 (они же экзоны α и β) – могут подвергаться альтернативному сплайсингу [71]. Фетальный экзон, расположенный между экзонами 8 и 9, экспрессируется только в эмбриональных скелетных мышцах [70, 72].

Экспрессия экзонов 16 и 17 является взаимоисключающей, экзон 16 экспрессируется преимущественно во взрослом возрасте, в то время как экзон 17 – преимущественно в эмбриональных и неонатальных мышцах [73, 74]. В ходе эмбрионального развития и постнатальный период происходит смена экспрессии сплайсформ бсТнТ: высокомолекулярные формы сменяются низкомолекулярными, формы с кислой изоэлектрической точкой сменяются щелочными формами [75].

Во взрослых мышцах кролика методом вестерн-блоттинга была показана экспрессия пяти сплайсформ бсТнТ: доминирующих – ТнТ1f (самая длинная, содержит в своём составе все экзоны, кроме фетального), ТнТ2f, ТнТ3f – и, в меньшей степени, ТнТ2fa, ТнТ4f [72, 76, 77]. При этом важно отметить, что состав сплайсформ отличался в разных типах мышц. У взрослых крыс методом масс-спектрометрии было идентифицировано шесть сплайсформ бсТнТ, при этом их состав также отличался в разных мышцах [78]. Тем же методом были детектированы шесть сплайсформ бсТнТ у макак-резусов [79]. У взрослого человека методом масс-спектрометрии было идентифицировано только три сплайсформы бсТнТ (fsТнТ III, VI и VII), однако в этом исследовании авторы брали только два типа мышц, *tibialis anterior* и *vastus lateralis*, первая из которых содержит в своём составе преимущественно волокна медленного типа, в связи с чем часть сплайсформ бсТнТ могла быть не обнаружена [80].

Ген *TNNT1*, кодирующий мсТнТ, состоит из 14 экзонов. В отличие от бсТнТ, разнообразие форм, полученных в результате альтернативного сплайсинга мсТнТ, невелико. Методом вестерн-блоттинга для мышей и овец было показано наличие высокомолекулярной и низкомолекулярной форм мсТнТ [81]. Клонирование геномной кДНК мышцы позволило определить, что низкомолекулярная форма получается в результате делеции 11 а.о., которая образуется в результате альтернативного сплайсинга *N*-концевого экзона 5. Также было показано, что существуют две высокомолекулярные формы, различающиеся делецией одного а.о. в экзоне 6 [81, 82]. Клонирование геномной кДНК человека также выявило три сплайсформы мсТнТ: полноразмерную форму, форму с *C*-концевой делецией 16 а.о., образованной в результате альтернативного сплайсинга экзона 12, и форму с двумя делециями – вышеупомянутой *C*-концевой и *N*-концевой делецией 11 а.о. (экзон 5) [82–84]. На белковом уровне методом масс-спектрометрии в скелетных мышцах человека (*vastus lateralis* и *tibialis anterior*) были идентифицированы две сплайсформы мсТнТ – с одной и с двумя делециями [80].

Таблица 3. Некоторые свойства скелетных изоформ ТнС человека

Изоформы	Быстрый скелетный ТнС (Uniprot P02585)	Медленный скелетный/сердечный ТнС (Uniprot P63316)
Ген	<i>TNNC2</i>	<i>TNNC1</i>
Хромосомный локус	20q13.12	3p21.1
Число экзонов	6	6
Число а.о.	160	161
Молекулярная масса (кДа)	18,1	18,4
Изоэлектрическая точка	4,1	4,0
Тканевая специфичность	быстрые скелетные мышечные волокна	медленные скелетные мышечные волокна, кардиомиоциты

Тропонин С. В отличие от ТнИ и ТнТ, ТнС представлен в организме человека двумя изоформами: медленной скелетной/сердечной изоформой мс/сТнС и быстрой скелетной изоформой бсТнС, которые экспрессируются в сердечных/медленных скелетных и быстрых скелетных мышечных волокнах соответственно (табл. 3) [85].

ТнС – белок, обеспечивающий чувствительность тонкого филамента к концентрации ионов Ca^{2+} . При повышении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в результате распространения нервного импульса по мышечному волокну ТнС связывает Ca^{2+} , что приводит к изменению конформации тропонинового комплекса, смещению молекулы тропомиозина и развитию мышечного сокращения. ТнС состоит из короткого *N*-концевого участка и четырёх EF-рук – Ca^{2+} -связывающих доменов (рис. 3). Четыре EF-руки объединены попарно и образуют *N*-концевой и *C*-концевой домены, соединённые линкером. *N*-Концевые EF-руки (I и II) обладают низким сродством к Ca^{2+} , а *C*-концевые (III и IV) – высоким сродством. *C*-Концевые EF-руки постоянно заполнены ионами Ca^{2+} или Mg^{2+} , в то время как *N*-концевые с высокой селективностью связывают Ca^{2+} при повышении его концентрации во время распространения потенциала действия в мышечном волокне. В бсТнС все четыре EF-руки могут связывать Ca^{2+} , в то время как у мсТнС первая EF-рука утратила такую способность в результате инсерции одного а.о. и замен двух а.о. [47, 62, 86].

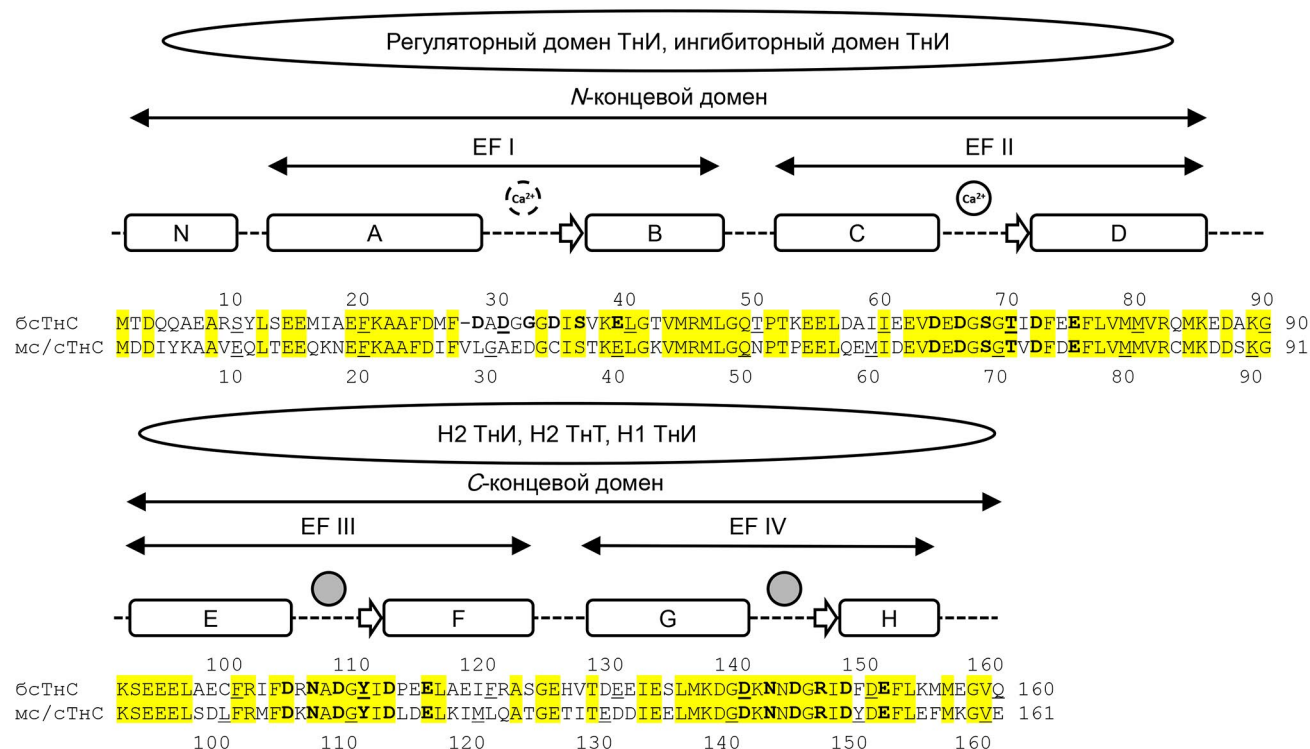


Рис. 3. Выравнивание двух изоформ ТnC человека: бсТnC и мс/сТnC. Последовательности взяты из базы данных Uniprot: бсТnC (TNNC2_HUMAN, P02585), мс/сТnC (TNNC1_HUMAN, P63316). Жёлтым цветом выделены идентичные а.о. Остатки, участвующие в связывании Ca^{2+} и Mg^{2+} , выделены жирным шрифтом. Прямоугольниками отмечены границы α -спиралей (N, A–H). Стрелками указаны N-концевой и C-концевой домены, а также EF-руки. Серыми кружками отмечены сайты связывания Ca^{2+} и Mg^{2+} ; незакрашенный кружок со сплошной линией указывает на сайт, специфичный к Ca^{2+} в обеих изоформах ТnC; кружком с пунктирной линией отмечен сайт, селективно связывающий Ca^{2+} в бсТnC (I EF-рука в мс/сТnC не связывает ионы) [46, 47, 62, 86–89]

Структура бсТnC была расшифрована методом рентгеноструктурного анализа для белка кролика [87], белка цыпленка [46] – как для свободного белка, так и для белка в составе тропонинового комплекса. Несмотря на то что мс/сТnC также экспрессируется в мышечных волокнах медленного типа, большая часть работ посвящена исследованию его структуры и роли в составе тропонинового комплекса сердца человека [47].

C-Концевой домен ТnC входит в состав ИТ-руки, взаимодействуя с другими тропонинами в области суперскрученной спирали (H2 ТНИ и H2 ТnT) и H1 ТНИ. N-Концевой и C-концевой глобулярные домены ТnC соединены центральным линкером [46, 47]. В то время как C-концевой домен всегда связывает ионы, N-концевой домен может переключаться между двумя состояниями: закрытой конформацией в отсутствие Ca^{2+} или открытой конформацией, которая формируется при связывании Ca^{2+} EF-рукой(ами). Связывание Ca^{2+} приводит к образованию гидрофобного кармана, который взаимодействует с регуляторным доменом ТНИ, что приводит к удалению ингибиторного домена ТНИ от молекулы актина и развитию мышечного сокращения [88, 89].

Функциональные различия изоформ тропонинов. Быстрые скелетные, медленные скелетные и сердечные волокна поперечно-полосатой мускулатуры по-разному реагируют на повышение концентрации Ca^{2+} . Медленные мышечные волокна обладают наибольшей чувствительностью к Ca^{2+} (другими словами, пороговая концентрация Ca^{2+} , необходимая для их сокращения, меньше), быстрые – наименьшей чувствительностью [21, 90, 91]. При этом наибольшая кооперативность сокращения (коэффициент Хилла) наблюдается у мышечных волокон быстрого типа, а минимальная – у медленных. Есть данные, свидетельствующие о том, что эти различия могут быть обусловлены изоформами тропонинов, экспрессирующимися в разных типах волокон. Так, при замене мс/сТnC на бсТnC в сердечных волокнах чувствительность к Ca^{2+} снижается, при этом замена бсТnC на мс/сТnC в быстрых скелетных волокнах приводила к повышению чувствительности к Ca^{2+} [90]. При замене быстрого скелетного тропонинового комплекса на сердечный в волокнах быстрого типа наблюдалось увеличение чувствительности к Ca^{2+} и снижение кооперативности сокращения [92].

Падение внутриклеточного pH (ацидоз) во всех типах поперечной-полосатой мускулатуры приводит к сократительной дисфункции, в том числе к уменьшению чувствительности к Ca^{2+} . В сердце опасное понижение внутриклеточного pH до значений 6,5 и ниже наблюдается при длительной ишемии и обусловлено накоплением продуктов метаболизма, в том числе лактата [93, 94]. В скелетных мышцах понижение pH было выявлено при интенсивных физических нагрузках, но, хотя понижение pH и влияет на мышцы, его эффект не столь существенный, как в сердце. У человека после физической нагрузки высокой интенсивности pH падает до ~6,5, при этом в среднем pH обычно снижается до ~6,8–6,9 [95–97]. Как и в случае чувствительности к Ca^{2+} , степень эффекта от понижения pH варьирует в зависимости от типа мышечных волокон: наиболее ярко он проявляется в сердечной мускулатуре и наименее – в скелетных волокнах медленного типа [98]. Эксперименты на выделенных мышечных волокнах показали, что при снижении pH с 7 до 6,5 наименьшее падение чувствительности к Ca^{2+} наблюдается у медленных мышечных волокон (у быстрых и сердечных падение больше и примерно одинаково по амплитуде) [90]. При этом дальнейшее понижение pH до 6,2 оказывает наиболее сильное действие на сердечные волокна, но не на скелетные.

Чувствительность сократительного аппарата к ацидозу во многом обусловлена тропониновым комплексом, а величина этого эффекта определяется в том числе различными изоформами тропонинов [99]. Так, эксперименты, проведенные на выделенных мышечных волокнах, показали, что замена бсТnC на мс/сТnC в быстрых мышечных волокнах приводит к увеличению чувствительности к pH, и, наоборот, замена мс/сТnC на бсТnC в медленных мышечных волокнах приводит к небольшому уменьшению чувствительности к закислению [100]. Последний эффект ещё более выражен при замене мс/сТnC на бсТnC в сердечных волокнах [99]. Таким образом, мс/сТnC увеличивает зависимость от pH, а бсТnC – уменьшает её. Другие авторы показали, что на чувствительность к pH влияют комбинации ТnC и ТnИ. Авторы выделяли сердечные волокна и заменяли ТnИ и ТnC на другие изоформы белков, вместе или по отдельности. В волокнах, содержащих сТnИ или бсТnИ, мс/сТnC обуславливает повышенную чувствительность к pH в сравнении с бсТnC. При этом замена сТnИ на мсТnИ приводит к снижению чувствительности к pH независимо от того, какая изоформа ТnC присутствует. Это позволило авторам сделать вывод о том, что ТnC в большей степени обуславливает чувствительность к pH в быстрых скелетных или сердечных волокнах, а ТnИ – в медленных ске-

летных волокнах [90]. Последнее хорошо согласуется с тем, что неонатальные кардиомиоциты, в которых экспрессируется мсТnИ, менее чувствительны к ацидозу, чем взрослые кардиомиоциты, экспрессирующие сТnИ [101]. Этот эффект также воспроизводился в трансгенных мышцах: при замене сТnИ на мсТnИ чувствительность к ацидозу снижалась [102]. Более поздние исследования показали, что данный эффект, вероятно, обусловлен наличием остатка His132 в составе мсТnИ (His131 у бсТnИ); в молекуле сТnИ на его месте расположен Ala163. Данный а.о. локализован в регуляторном домене ТnИ и участвует во взаимодействии с ТnC. Было показано, что при понижении pH электростатическое взаимодействие между остатком гистидина и остатками Glu15 и Glu19 в составе молекулы ТnC стабилизирует конформацию тропонинового комплекса, что приводит к сокращению мышцы [103–106].

Три изоформы ТnТ отличаются значениями своих изоэлектрических точек, при этом изоформа бсТnТ, экспрессирующаяся у взрослых, является наиболее щелочной. Помимо этого, в ходе развития наблюдается смена сплайсоформ бсТnТ от более кислых к более щелочным вариантам, что в конечном счёте приводит к экспрессии щелочных сплайсоформ во взрослом возрасте. Данные различия обусловлены вариабельностью N-концевого домена [107]. Однако существует уникальная кислая сплайсоформа бсТnТ, экспрессирующаяся в некоторых типах мышц у взрослых куриц [107]. Было показано, что эти мышцы обладают меньшей чувствительностью к Ca^{2+} , а также большей устойчивостью к ацидозу в сравнении с мышцами, которые экспрессируют щелочные сплайсоформы бсТnТ [108]. Полученные данные согласуются с тем фактом, что при экспрессии бсТnТ в сердце трансгенных мышей снижалась устойчивость сердечной мышцы к ацидозу [109].

СКЕЛЕТНЫЕ ТРОПОНИНЫ КАК МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Одним из наиболее чувствительных и специфичных подходов для детекции и определения концентрации маркеров, в том числе скелетных изоформ ТnИ, является иммунный анализ типа «сэндвич» [110]. В большинстве случаев метод основан на использовании двух антител, распознающих различные эпитопы на поверхности антигена: антитело подложки и детекторное антитело, которое может быть конъюгировано с различными метками. Насколько нам известно, на сегодняшний день нет зарегистрированных для клинического применения тест-систем, детектирующих скелетные изоформы ТnИ,

и во всех опубликованных работах использовались системы, предназначенные только для научно-исследовательских целей.

В ряде исследований были определены концентрации скелетных изоформ ТнИ у здоровых людей. Средние значения базальных концентраций варьировали от $1,74 \pm 0,27$ нг/мл до $2,5 \pm 0,9$ нг/мл при их определении одним и тем же методом в разных работах [111–114]. В ещё одном исследовании концентрация скелетных изоформ ТнИ у здоровых была ниже предела обнаружения (ПрО), равного 1,2 нг/мл [115]. В работе, где определяли концентрацию бсТнИ, его базальная концентрация оказалась ниже ПрО метода, который составлял 2,4 нг/мл [9, 116]. Необходимы дальнейшие исследования, однако имеющиеся данные позволяют предположить, что средний уровень скелетных изоформ ТнИ в здоровой популяции ниже 1–2 нг/мл.

При повреждении скелетной мускулатуры нарушается целостность мембраны мышечного волокна, и внутриклеточные белки попадают в кровоток. Показано, что уровень скелетных изоформ ТнИ растёт при повреждениях скелетной мускулатуры различной этиологии. Так, их концентрация повышена у больных с рабдомиолизом [117, 118]; после интенсивных физических нагрузок: например, после триатлона [113], бега [119], эксцентрических сокращений [26, 120–122]; при травмах опорно-двигательного аппарата и мягких тканей, в том числе после хирургического вмешательства [114, 119]. Также наблюдается рост концентрации скелетных изоформ ТнИ у больных с воспалительными миопатиями, например, полимиозитом и дерматомиозитом [115, 119, 123]. Концентрация скелетных изоформ ТнИ коррелирует с клинической картиной при мышечных дистрофиях (Дюшенна, Беккера и пояснично-конечностной мышечной дистрофии), и поэтому возможно использование данного параметра для оценки степени тяжести заболевания и мониторинга ответа на терапию [9].

Одним из потенциальных приложений скелетных изоформ ТнИ как биомаркера является определение миотоксичности лекарственных препаратов, при использовании которых происходит разрушение мышечных волокон и высвобождение тропонина в кровоток [36, 37, 124, 125]. Возможность такого применения была показана на крысах, а также с использованием 3D мышечной ткани человека *in vitro* [126, 127].

Наличие изоформ, специфичных для различных типов скелетных волокон, предоставляет дополнительные возможности для диагностики. Как было описано в предыдущем разделе, при ряде повреждений/заболеваний скелетной мускулатуры может затрагиваться определённый тип

мышечных волокон. Например, при эксцентрических сокращениях повреждаются волокна преимущественно быстрого типа, и при этом именно бсТнИ, а не мсТнИ высвобождается в кровоток [26, 121, 122]. Для некоторых мышечных дистрофий также показано повышение концентрации бсТнИ, но не мсТнИ [128].

Максимальные концентрации скелетных изоформ ТнИ достигали 500 нг/мл через 6 ч после прохождения триатлона (4 км плавания, 120 км езды на велосипеде, 30 км бега), при этом средняя концентрация составила $62,2 \pm 139$ нг/мл [113]. Также высокие концентрации детектировали через 6 ч после скоростного спуска: медиана составляла 27,3 нг/мл (интерквартильный размах 8,5–43 нг/мл), в то время как более низкие концентрации были выявлены через 6 ч после бега с увеличением скорости: 6,6 нг/мл (3,7–9 нг/мл), и после эксцентрических сокращений четырёхглавой мышцы бедра: 6,8 нг/мл (3,1–14,9 нг/мл) [26]. Средние концентрации скелетных изоформ ТнИ в пределах 24 ч после травмы составили: $15,3 \pm 2,4$ нг/мл после травмы опорно-двигательного аппарата и $10,4 \pm 1,8$ нг/мл после травмы мягких тканей [114]. Максимальная концентрация скелетных изоформ ТнИ у больных с воспалительными миопатиями составила 516 нг/мл, а медиана – 8,6 нг/мл (интерквартильный размах 3,2–33,5 нг/мл) [115].

Исследований, посвящённых использованию скелетных ТнТ в качестве возможных маркеров мышечного повреждения, пока не опубликовано, но мы предполагаем, что, по аналогии с сердечными тропонинами И и Т, которые являются маркерами повреждения сердечной мускулатуры, скелетные изоформы ТнТ также могут быть потенциальными удобными маркерами для диагностики повреждений скелетной мышцы.

Ряд авторов также предлагает использовать бсТнС в качестве маркера повреждения скелетной мускулатуры [129]. Однако детекция ТнС будет обладать меньшей специфичностью, чем детекция скелетных изоформ ТнИ или ТнТ, так как бсТнС экспрессируется только в мышечных волокнах быстрого типа, а с/мсТнС – в волокнах медленного типа и в сердечной ткани.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИММУНОХИМИЧЕСКУЮ ДЕТЕКЦИЮ СКЕЛЕТНЫХ ТРОПОНИНОВ

На взаимодействие антител со скелетными изоформами тропонинов могут оказывать влияние различные факторы: гомология с другими изоформами тропонинов, присутствие сплайс-форм, посттрансляционные модификации, протеолиз, связывание аутоантител и экранирование

белками тропонинового комплекса. Подобные воздействия могут значительно искажать результаты проводимых измерений и должны быть учтены как при исследовании свойств данных белков, так и при разработке иммунохимических систем.

Сходство изоформ. Степень сходства изоформ составляет ~60% и для ТнИ, и для ТнТ (при сравнении наиболее длинных сплайсоформ, экспрессирующихся у взрослых людей: P45378-3 для бсТнТ, P13805-1 для мсТнТ и P45379-6 для сТнТ) (рис. 1 и 2), поэтому одна из проблем, возникающая при иммунохимической детекции скелетных тропонинов – перекрёстное взаимодействие антител с сердечной изоформой белка или со второй скелетной изоформой (в случае дифференцированного определения медленной или быстрой скелетной изоформы тропонина), что может снижать специфичность определения целевого маркера. Высокая степень гомологии тропонинов значительно уменьшает количество эпитопов, к которым возможно получить антитела для специфического определения отдельных изоформ белка. Наиболее консервативными как для ТнИ, так и для ТнТ являются С-концевые участки молекул, наиболее вариабельными – N-концевые.

Альтернативный сплайсинг ТнТ. Как уже было описано выше, скелетные изоформы ТнТ, особенно бсТнТ, представлены в мышцах человека несколькими сплайсоформами. Для выявления наибольшего количества форм белка предпочтительнее использовать антитела, специфичные к участкам, кодируемым экзонами 1–3 и 9–15. Для бсТнТ следует избегать использования антител, взаимодействующих с N-концевыми а.о. 11–38, а также с С-концевым участком 232–244 а.о., который может отличаться у разных сплайсоформ (нумерация а.о. указана для последовательности P45378-3). В случае мсТнТ следует избегать использования антител, распознающих а.о. 25–35 и 205–220 (нумерация указана для самой длинной сплайсоформы P13805-1), которые имеют отличия в разных сплайсоформах.

Фосфорилирование ТнИ и ТнТ. Фосфорилирование меняет заряд белка и может оказывать значительное влияние на взаимодействие антител и антигена.

Фосфорилирование ТнИ. Показано, что бсТнИ кролика может быть фосфорилирован *in vitro* киназой фосфоорилазы, 3'5'-сАМР-зависимой протеинкиназой, Ca^{2+} -фосфолипид-зависимой протеинкиназой, а бсТнИ человека – АМР-активируемой протеинкиназой (АМРК) [130–134]. Были определены остатки, которые подвергаются фосфорилированию: Thr12 и Ser118 для бсТнИ кролика и Ser118 для белка человека [131, 132, 134]. Так как в последовательности бсТнИ чело-

века так же, как и в бсТнИ кролика, присутствует остаток Thr12, не исключена возможность фосфорилирования белка человека и по данному остатку. Также было показано, что фосфорилирование *in vitro* ингибируется при взаимодействии с ТнС, что согласуется с данными по структуре тропонинового комплекса: оба выявленных остатка расположены в участках взаимодействия с ТнС [46, 130]. Фосфорилирование мсТнИ *in vitro* не было описано, однако последовательность мсТнИ включает один а.о., гомологичный сайту фосфорилирования бсТнИ: Ser118 (мсТнИ) (рис. 1).

Было показано, что изолированный из скелетных мышц кролика бсТнИ присутствует в частично фосфорилированной форме, причём степень фосфорилирования может зависеть от метода выделения белка [130, 131, 135]. Методом масс-спектрометрии в экстракте мышц человека (*vastus lateralis* и *tibialis anterior*) и экстракте мышц крысы (7 видов мышц) бсТнИ был детектирован в нефосфорилированном виде, при этом мсТнИ присутствовал как в фосфорилированной, так и в нефосфорилированной формах [78, 80]. Методом масс-спектрометрии экстракта мышц макак-резусов фосфорилированных форм скелетных ТнИ обнаружено не было [79]. Учитывая приведённые выше данные, можно предположить, что доля фосфорилированных форм скелетных ТнИ в крови будет незначительной, и, следовательно, данная модификация не окажет значительного влияния на распознавание антигена при помощи антител.

Фосфорилирование ТнТ. *In vitro* было показано, что бсТнТ, выделенный из скелетных мышц кролика, является субстратом для различных киназ: киназы фосфоорилазы, 3'5'-сАМР-зависимой протеинкиназы, казеинкиназы 2, Ca^{2+} -фосфолипид-зависимой протеинкиназы [59, 130, 132, 133, 136–140]. Для бсТнТ кролика были выявлены три участка фосфорилирования: Ser2, Ser152 и Ser159 (они указаны для P45372-3 Uniprot). Ser2 также присутствует в бсТнТ человека, а Ser152 и Ser159 входят в состав последовательности Ala-Leu-Ser-SerP-Met-Gly-Ala-Asn-Tyr-Ser-SerP-Tyr, которая у бсТнТ человека полностью соответствует белку кролика. Исходя из этого, можно предположить возможность фосфорилирования по данным остаткам и для бсТнТ человека [132].

In vivo было показано, что выделенный из скелетных мышц кролика бсТнТ присутствует в фосфорилированной форме [130, 132]. Более того, такой белок фосфорилирован лишь по одному из трёх сайтов, выявленных *in vitro*: Ser2. Эти результаты согласуются с данными масс-спектрометрии белков, экстрагированных из мышечной ткани человека и различных видов животных.

Для бсТнТ человека, крысы, макаки-резуса, выделенных из нескольких типов мышц, идентифицировали нефосфорилированные и монофосфорилированные формы (различных сплайс-форм) бсТнТ [78–80], при этом Ser2 был единственным сайтом фосфорилирования, определённым *in vivo*.

Данные по фосфорилированию мсТнТ *in vitro* отсутствуют. Однако в составе мсТнТ есть остаток Ser2, гомологичный Ser2 в составе бсТнТ и сТнТ, для которых показано фосфорилирование как *in vitro*, так и *in vivo* [141, 142]. Высокая вероятность фосфорилирования Ser2 мсТнТ в мышечной ткани человека подтверждена методом масс-спектрометрии [80]. Аналогичным методом обнаружили, что в скелетных мышцах человека и крысы мсТнТ представлен преимущественно фосфорилированной форме, а в мышцах макаки-резуса – в фосфорилированной и нефосфорилированной формах [78–80].

Таким образом, можно предположить, что бсТнТ и мсТнТ попадают в кровоток в частично фосфорилированной форме. Однако в связи с тем, что сайт фосфорилирования расположен в N-концевой части молекул, он, вероятно, не будет оказывать значительного влияния на распознавание скелетных изоформ ТнТ антителами.

Глутатионилирование ТнИ. Lamb et al. показали на выделенных мышечных волокнах крысы и человека, что бсТнИ, но не мсТнИ, может подвергаться глутатионилированию [143–145]. Данная модификация затрагивает один из остатков цистеина – Cys134. Это согласуется с результатами масс-спектрометрических исследований: для скелетной мускулатуры макаки-резуса и крысы было показано наличие двух протеоформ бсТнИ: с глутатионом и без, что подтверждает наличие базового уровня глутатионилирования именно для бсТнИ [78, 79].

Протеолиз ТнИ и ТнТ. сТнИ может подвергаться N- и C-концевому протеолизу: как в некротической ткани сердца, так и в крови детектируются различные протеолизированные формы сТнИ [146, 147]. Было обнаружено, что сТнИ может быть субстратом для ряда протеаз: металлопротеиназы-2, кальпаина 1 (μ -кальпаина) и кальпаина 2 (m -кальпаина) [148–151]. Исследования протеолиза сТнИ в крови больных с инфарктом миокарда показали наличие до 11 протеолитических фрагментов различной длины [147, 152]. Ввиду высокой гомологии возможен протеолиз и скелетных изоформ ТнИ. Протеолизированные бсТнИ и мсТнИ и их фрагменты были идентифицированы в крови больных, при этом было показано, что при разных типах повреждений/заболеваний количество этих фрагментов в крови варьирует [118]. На основании получен-

ных результатов авторы предполагают, что протеолиз происходит непосредственно в ткани, а в кровоток белки высвобождаются уже в протеолизированной форме. Однако необходимы дальнейшие исследования протеолиза скелетных изоформ ТнИ и локализации участков молекулы, в которых происходит расщепление молекул белка.

сТнТ также подвержен протеолитическому расщеплению. В апоптотических кардиомиоцитах было показано щепление сТнТ по N-концу под действием каспазы-3 с формированием фрагмента размером 25 кДа [153]. Ограниченный N-концевой протеолиз сТнТ под воздействием кальпаина 1 (μ -кальпаина) также наблюдали в ходе ишемии-реперфузии миокарда [148, 154]. В крови больных с инфарктом миокарда обнаружены как минимум 23 фрагмента сТнТ различной длины, и несколько участков протеолиза выявлены в N-концевой, центральной и C-концевой частях молекулы [155]. Для скелетных изоформ ТнТ подобные исследования ещё не были опубликованы. Для бсТнТ есть только данные по протеолитическому щеплению в мышце после сильной физической нагрузки [156]. Необходимо дальнейшее изучение форм скелетных изоформ ТнТ, присутствующих в кровотоке, и определение сайтов протеолиза.

Экранирование эпитопов в составе тропонинового комплекса. сТнИ и сТнТ присутствуют в крови больных с инфарктом миокарда в составе тройного тропонинового комплекса (ТнИ–ТнТ–ТнС), двойного тропонинового комплекса (ТнИ–ТнС) и протеолитических фрагментов ТнТ [152, 157, 158]. Несмотря на то что пока не получено экспериментальных данных о том, в каком виде скелетные тропонины высвобождаются в кровоток, можно предположить, что они будут присутствовать в крови в том числе в виде комплексов. Для иммунохимической детекции важно использовать такие антитела, которые распознают эпитопы, доступные для взаимодействия с антителами в составе всех представленных в крови форм белков. При формировании тройного комплекса C-концевые области скелетных ТнТ, ограниченные примерно 197–241 а.о. для бсТнТ и 202–261 для мсТнТ, могут быть экранированы ТнИ и ТнС. В случае скелетных изоформ ТнИ молекулами ТнТ и ТнС для взаимодействия с антителами может быть блокирована значительная часть последовательности белка: области, ограниченные примерно 2–40, 50–106, 116–131 а.о. для бсТнИ и 2–40, 51–107, 117–132 а.о. для мсТнИ. Таким образом, доступными для антител остаются небольшие участки аминокислотных последовательностей в центральных и C-концевых частях молекул ТнИ. Альтернативным подходом,

позволяющим использовать антитела, специфичные к заблокированным в комплексе участкам молекул ТнИ и ТнТ, является разрушение тропониновых комплексов, присутствующих в образце, под воздействием ЭДТА [115, 116, 157].

Связывание аутоантител. Одним из факторов, оказывающих влияние на иммунохимическую детекцию сердечных тропонинов, является наличие аутоантител, которые взаимодействуют с анализируемым белком в крови. Они могут интерферировать с антителами иммунохимических тест-систем и приводить к возникновению ложноотрицательных результатов. Показано, что примерно у 10% здоровых людей в крови присутствуют аутоантитела к сТнИ [159]. Также было выявлено, что такие аутоантитела обычно специфичны к конформационным эпитопам, которые формируются при связывании ТнИ и ТнТ [160]. Исследований о наличии аутоантител к скелетным изоформам ТнИ нет, однако, учитывая высокую степень гомологии, можно предположить, что подобные иммуноглобулины также могут присутствовать в крови некоторых больных.

Учитывая все описанные выше данные, можно заключить, что антитела, специфичные к С-концевым участкам ТнИ, могут демонстрировать перекрёстное взаимодействие с другими изоформами ТнИ, в то время как центральные участки молекул могут быть экранированы ТнС и ТнТ. Влияние посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование и глутатионилирование, можно считать незначительным, в то время как роль и степень протеолиза, а также влияния аутоантител требует дальнейшего изучения. Таким образом, наиболее перспективными сайтами для иммунохимической детекции скелетных изоформ ТнИ представляются центральные части молекулы, особенно те участки, которые не экранированы другими компонентами тропонинового комплекса.

В случае ТнТ N-концевая (11–38 а.о. для бсТнТ и 25–35 а.о. для мсТнТ) и С-концевая (231–244 а.о. для бсТнТ и 205–220 а.о. для мсТнТ) части молекулы подвергаются альтернативному сплайсингу, С-концевые части (а.о. ~197–241 для бсТнТ и мсТнТ) также могут быть экранированы ТнИ и ТнС. Влияние фосфорилирования можно считать незначительным, а роль и степень N- и С-концевого протеолиза требует дальнейшего изучения. Таким образом, наиболее перспективными для иммунохимического выявления можно считать центральные участки скелетных изоформ ТнТ.

МУТАЦИИ В СКЕЛЕТНЫХ ТРОПОНИНАХ КАК ИСТОЧНИКИ ПАТОЛОГИЙ СКЕЛЕТНОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Тропониновый комплекс играет важную роль в регуляции мышечного сокращения. Мутации в тропонинах могут приводить к изменению структуры и функциональности белка. На сегодняшний день выявлен ряд мутаций, ассоциированных с развитием таких заболеваний скелетных мышц, как артрогрипоз и конгенитальные миопатии.

Мутации в генах скелетных изоформ ТнИ. Показано, что мутации в гене *TNNI2* (бсТнИ) являются одной из причин дистального артрогрипоза. Это наследуемое по аутосомно-доминантному типу заболевание, при котором поражаются суставы и снижается подвижность дистальных отделов конечностей. Все выявленные до настоящего времени мутации *TNNI2* затрагивают только С-концевой участок молекулы: R156X (приводящая к экспрессии укороченной формы бсТнИ (1–156)), R162G, R162K, I165F, E167X, K168E, R174Q, R174W, K175N, K175X, K176X, F178C, F178L [161–172].

Для мсТнИ (*TNNI1*) в настоящий момент выявлены две патогенные мутации [170, 173]. Одна из них, K175X, расположена в той же области, что и у бсТнИ, и приводит к образованию укороченной формы мсТнИ [170]. Данная делеция ассоциирована с развитием проксимального артрогрипоза – также наследуемого по аутосомно-доминантному типу заболевания, при котором затрагиваются проксимальные суставы. Мутация в другой области мсТнИ, R37C, приводит к экспрессии мсТнИ в сердце до двух лет после рождения [173] и увеличивает риск внезапной детской смерти.

Мутации в генах скелетных изоформ ТнТ. Мутации в гене *TNNT3* (бсТнТ), так же как и в *TNNI2* (бсТнИ), приводят к развитию дистального артрогрипоза. Для *TNNT3* было обнаружено несколько замен, затрагивающих один и тот же а.о.: R66C, R66H, R66S [171, 174–177]². Стоит также выделить мутацию в гене *TNNT3* (бсТнТ), которая вызывает сразу два заболевания: дистальный артрогрипоз и немалиновую миопатию, поражающую мышечные волокна быстрого типа [178]. Эта мутация в интроне, приводящая к нарушению сплайсинга и понижению экспрессии бсТнТ, сопровождается компенсаторной гипертрофией мышечных волокон медленного типа.

Делеции в гене *TNNT1* (мсТнТ) ассоциированы с немалиновой миопатией, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу. Она проявляется в раннем детстве в виде дыхательной недостаточ-

² Стоит отметить, что при указании этой мутации авторы исследований используют последовательность бсТнТ, соответствующую R45378-2, которая на 3 а.о. короче используемой в этом обзоре последовательности R45378-3. Поэтому в статьях данная замена фигурирует как R63.

ности, атрофии мышечных волокон медленного типа и компенсаторной гипертрофии мышечных волокон быстрого типа. В конечном счёте немалиновая миопатия приводит к смерти в детском возрасте от дыхательной недостаточности. Были обнаружены делеции E180X (экспрессия укороченной формы мсТнТ 1–179) и S108X (экспрессия укороченной формы мсТнТ 1–107), делеция экзонов 8 и 14, а также экспрессия укороченной формы мсТнТ 1–203 [179–182]. Эти делеции затрагивают участки взаимодействия ТнТ с тропомиозином, а также сайты связывания с ТнИ и ТнС.

Было показано, что отсутствие участков связывания тропонинов с тропомиозином при делеции E180X препятствует формированию тропонинового комплекса и его встраиванию в тонкие филаменты [183]. Если мРНК мсТнТ (1–179) ещё детектируется в мышечных волокнах, то белковая молекула мсТнТ (1–179) быстро деградирует и уже не может быть обнаружена [184]. Данный факт объясняет рецессивность мутации: при наличии одной правильной копии гена полноразмерный мсТнТ экспрессируется и встраивается в тропониновый комплекс, а экспрессирующийся мутантный укороченный мсТнТ (1–179) не обладает цитотоксичностью, так как такой вариант мсТнТ сразу подвергается деградации [185].

Мутации в генах ТнС. Мутации в гене *TNNC2* (бсТнС) ассоциированы с конгенитальной миопатией, наследуемой по аутосомно-доминантному типу. Это замены D34Y и M79Y, которые расположены в I EF-руке и рядом со II EF-рукой соответственно. Они влияют на связывание с Ca^{2+} и регуляторным доменом ТнИ, поэтому при наличии данных мутаций происходит снижение чувствительности мышцы к Ca^{2+} [186, 187].

В связи с тем, что мс/сТнС экспрессируется не только в медленной скелетной, но и в сердечной мускулатуре, ряд мутаций в *TNNC1* (мс/сТнС), включая A8V, L29Q, A31S, C84Y, E134D, D145E, Q122AfsX30 (мутация со сдвигом рамки считывания), ассоциирован с кардиомиопатиями и сердечной дисфункцией [188–191]. У некоторых больных с кардиомиопатиями, вызванными данными заменами, также наблюдались патологии скелетной мускулатуры, однако исследований, посвящённых тому, какие именно мутации и каким образом влияют на скелетную мускулатуру, пока недостаточно [187, 192]. В экспериментах *in vitro* было показано, что все вышеперечисленные замены, за исключением C84Y, не оказывают влияния на фенотип и функционирование мышечных волокон медленного типа. C84Y, в свою очередь, повышает чувствительность к Ca^{2+} так же, как и в сердечных волокнах. Описанные различия во влиянии мутации на медленные и сердечные мышечные волокна могут быть обусловлены тем,

что в составе медленных мышечных волокон мс/сТнС образует комплекс с другими, медленными скелетными изоформами ТнТ и ТнИ, а не сердечными белками [193].

ТРОПОНИНЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Помимо источника патологий, скелетные тропонины могут выступать и в роли мишеней для лекарств, применяемых при лечении заболеваний скелетной мускулатуры. К такого рода заболеваниям относят периферические моторные нейропатии – боковой амиотрофический склероз (БАС), спинальную мышечную атрофию, заболевание Шарко–Мари–Тута – в ходе которых повреждаются моторные нейроны и нарушается передача нервных импульсов, и миастении гравис, при которой разрушаются нервно-мышечные синапсы. Нарушение иннервации скелетных мышц в конечном счёте приводит к мышечной слабости, инвалидности и высокой смертности. Одним из вероятных терапевтических подходов может быть увеличение чувствительности мышечных волокон к Ca^{2+} таким образом, чтобы достаточная активация достигалась даже при меньших концентрациях Ca^{2+} . Молекула из группы первых активаторов быстрого скелетного тропонина, СК-2017357 (тирасемтив), избирательно взаимодействует с быстрым скелетным тропониновым комплексом: связывание происходит в гидрофобном кармане, образованном N-концевым доменом бсТнС и регуляторным доменом бсТнИ [194]. Показано, что связывание тирасемтива увеличивает степень сродства низкоаффинных сайтов связывания бсТнС к Ca^{2+} , тем самым повышая чувствительность мышцы к Ca^{2+} [195]. Тирасемтив проявил себя многообещающе у больных с БАС, больных с миастенией гравис, и исследования даже дошли до третьей фазы клинических испытаний, однако были приостановлены в связи с выявлением побочных эффектов [196–202]. Сейчас разрабатывают и другие лекарственные средства из группы активаторов быстрого скелетного тропонина: СК-2127107, СК-2066260 и релдесемтив [203–206]. Наиболее успешно проявил себя релдесемтив – молекула второго поколения, полученная путём химической оптимизации тирасемтива и обладающая схожим механизмом действия [207, 208]. Релдесемтив дошёл до второй фазы клинических испытаний при терапии спинальной мышечной атрофии и до третьей – при терапии БАС, однако испытания на пациентах с БАС были прекращены в связи с отсутствием терапевтического эффекта [206, 209, 210]. Несмотря на то что мс/сТнС экспрессируется не только

в сердце, но и в мышечных волокнах медленного типа, исследования регуляторов чувствительности мс/сТнС к Ca^{2+} изучались в основном в контексте изучения функций сердца. Эти лекарственные молекулы влияют на чувствительность мышечных волокон Ca^{2+} путём изменения аффинности N-концевого домена мс/сТнС к Ca^{2+} . Один из наиболее широко изученных кальциевых сенситизаторов, левосимендан, связывается с гидрофобным карманом мс/сТнС и регуляторным доменом сТнИ – так же, как и тирасемтив [211]. Левосимендан (лицензирован в некоторых странах) и его аналоги предназначены для лечения тяжёлой хронической сердечной недостаточности.

В отличие от вышеперечисленных лекарственных молекул, ингибитор тропонина W7 уменьшает чувствительность к Ca^{2+} и может быть использован для лечения метаболических кардиомиопатий, вызванных длительным алкалозом, или врождённых кардиомиопатий [212, 213]. W7 также связывается с гидрофобным карманом, образованным N-концевым доменом мс/сТнС и регуляторным доменом сТнИ, однако, в отличие от левосимендана, он сдвигает регуляторный домен сТнИ от его сайта связывания с мс/сТнС, тем самым снижая чувствительность мышцы к Ca^{2+} [213, 214].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патологии скелетной мускулатуры оказывают негативное влияние на функционирование всего организма. Они могут быть вызваны механическими повреждениями мышц, миопатиями и другими заболеваниями, сопровождающимися мышечной атрофией, а также рабдомиолизом. Определение концентрации белков-маркеров, которые высвобождаются в кровоток при повреждении мышечных волокон, является удобным методом диагностики и мониторинга таких патологий. Скелетные тропонины – потенциальные

маркеры дисфункции скелетных мышц, включая различные миопатии, травмы, повреждения, вызванные интенсивной физической нагрузкой, а также могут служить для оценки степени тяжести мышечных дистрофий и определения миотоксичности лекарств.

Структура и свойства тропонинов могут оказывать влияние на их детекцию в крови человека с использованием антител. К основным факторам, способным воздействовать на иммунохимическую детекцию данных белков в клинических образцах, можно отнести сходство аминокислотных последовательностей скелетных и сердечной изоформ ТнИ и ТнТ, альтернативный сплайсинг ТнТ, посттрансляционные модификации (фосфорилирование и глутатионилирование), протеолиз, экранирование эпитопов на поверхности ТнИ и ТнТ в составе тропонинового комплекса, а также связывание аутоантител. В связи с этим необходим тщательный отбор моноклональных антител для разработки иммунных анализов для достоверного количественного измерения уровней скелетных тропонинов.

Определённые мутации в скелетных тропонинах связаны с развитием артрогрипоза и конгенитальных миопатий. Кроме того, данные белки могут быть использованы в качестве мишеней для лечения таких заболеваний, как моторные нейропатии и миастения гравис.

Вклад авторов. А.П. Богомолова, И.А. Катруха – сбор и анализ данных, подготовка иллюстраций, написание основного текста рукописи, редактирование рукописи; И.А. Катруха – разработка концепции и руководство работой.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо проведённых авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yin, L., Li, N., Jia, W., Wang, N., Liang, M., Yang, X., and Du, G. (2021) Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments, *Pharmacol. Res.*, **172**, 105807, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>.
2. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., and Ross, R. (2000) Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr, *J. Appl. Physiol.*, **89**, 81-88, <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81>.
3. Kasper, C. E., Talbot, L. A., and Gaines, J. M. (2002) Skeletal muscle damage and recovery, *AACN Clin. Issues*, **13**, 237-247, <https://doi.org/10.1097/00044067-200205000-00009>.
4. Nagy, H., and Veerapaneni, K. D. (2023) Myopathy, in *StatPearls*, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL).
5. Nance, J. R., and Mammen, A. L. (2015) Diagnostic evaluation of rhabdomyolysis, *Muscle Nerve*, **51**, 793-810, <https://doi.org/10.1002/mus.24606>.
6. Cassandrini, D., Trovato, R., Rubegni, A., Lenzi, S., Fiorillo, C., Baldacci, J., Minetti, C., Astrea, G., Bruno, C., and Santorelli, F. M. (2017) Congenital myopathies: clinical phenotypes and new diagnostic tools, *Ital. J. Pediatr.*, **43**, 101, <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0419-z>.

7. Ahmed, S. T., Craven, L., Russell, O. M., Turnbull, D. M., and Vincent, A. E. (2018) Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies, *Neurotherapeutics*, **15**, 943-953, <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00674-4>.
8. Cohen, B. H. (2019) Mitochondrial and metabolic myopathies, *Continuum*, **25**, 1732-1766, <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000805>.
9. Burch, P. M., Pogoryelova, O., Goldstein, R., Bennett, D., Guglieri, M., Straub, V., Bushby, K., Lochmüller, H., and Morris, C. (2015) Muscle-derived proteins as serum biomarkers for monitoring disease progression in three forms of muscular dystrophy, *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 241-255, <https://doi.org/10.3233/jnd-140066>.
10. Dalakas, M. C. (2015) Inflammatory muscle diseases, *N. Engl. J. Med.*, **372**, 1734-1747, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1402225>.
11. Crum-Cianflone, N. F. (2008) Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis, *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 473-494, <https://doi.org/10.1128/cmr.00001-08>.
12. Torres, P. A., Helmstetter, J. A., Kaye, A. M., and Kaye, A. D. (2015) Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment, *Ochsner. J.*, **15**, 58-69.
13. Du Souich, P., Roederer, G., and Dufour, R. (2017) Myotoxicity of statins: Mechanism of action, *Pharmacol Ther.*, **175**, 1-16, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.029>.
14. Khan, F. Y. (2009) Rhabdomyolysis: a review of the literature, *Neth. J. Med.*, **67**, 272-283.
15. Fanzani, A., Conraads, V. M., Penna, F., and Martinet, W. (2012) Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **3**, 163-179, <https://doi.org/10.1007/s13539-012-0074-6>.
16. Jasuja, R., and LeBrasseur, N. K. (2014) Regenerating skeletal muscle in the face of aging and disease, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **93**, S88-96, <https://doi.org/10.1097/phm.0000000000000118>.
17. Sinclair, A. J., Abdelhafiz, A. H., and Rodríguez-Mañas, L. (2017) Frailty and sarcopenia - newly emerging and high impact complications of diabetes, *J. Diabetes Complications*, **31**, 1465-1473, <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.05.003>.
18. Jang, H. C. (2019) Diabetes and muscle dysfunction in older adults, *Ann. Geriatr. Med. Res.*, **23**, 160-164, <https://doi.org/10.4235/agmr.19.0038>.
19. Cleasby, M. E., Jamieson, P. M., and Atherton, P. J. (2016) Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities, *J. Endocrinol.*, **229**, R67-81, <https://doi.org/10.1530/joe-15-0533>.
20. Schiaffino, S., and Reggiani, C. (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.*, **77**, 493-501, <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>.
21. Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiol. Rev.*, **91**, 1447-1531, <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.
22. Murgia, M., Toniolo, L., Nagaraj, N., Ciciliot, S., Vindigni, V., Schiaffino, S., Reggiani, C., and Mann, M. (2017) Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging, *Cell Rep.*, **19**, 2396-2409, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.054>.
23. Murgia, M., Nogara, L., Baraldo, M., Reggiani, C., Mann, M., and Schiaffino, S. (2021) Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study, *Skelet. Muscle*, **11**, 24, <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00279-0>.
24. Westwood, F. R., Bigley, A., Randall, K., Marsden, A. M., and Scott, R. C. (2005) Statin-induced muscle necrosis in the rat: distribution, development, and fibre selectivity, *Toxicol. Pathol.*, **33**, 246-257, <https://doi.org/10.1080/01926230590908213>.
25. Bodié, K., Buck, W. R., Pieh, J., Liguori, M. J., and Popp, A. (2016) Biomarker evaluation of skeletal muscle toxicity following clofibrate administration in rats, *Exp. Toxicol. Pathol.*, **68**, 289-299, <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.03.001>.
26. Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Gebert, W., Rama, D., Calzolari, C., Artner-Dworzak, E., and Puschendorf, B. (1997) Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage, *J. Appl. Physiol.*, **83**, 1076-1082, <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.4.1076>.
27. Ciciliot, S., Rossi, A. C., Dyar, K. A., Blaauw, B., and Schiaffino, S. (2013) Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 2191-2199, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.016>.
28. Zimowska, M., Kasprzycka, P., Bocian, K., Delaney, K., Jung, P., Kuchcinska, K., Kaczmarek, K., Gladysz, D., Streminska, W., and Ciemerych, M. A. (2017) Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration, *Muscle Nerve*, **55**, 400-409, <https://doi.org/10.1002/mus.25246>.
29. Tosato, M., Marzetti, E., Cesari, M., Saveria, G., Miller, R. R., Bernabei, R., Landi, F., and Calvani, R. (2017) Measurement of muscle mass in sarcopenia: from imaging to biochemical markers, *Aging Clin. Exp. Res.*, **29**, 19-27, <https://doi.org/10.1007/s40520-016-0717-0>.
30. Mercuri, E., Clements, E., Offiah, A., Pichiecchio, A., Vasco, G., Bianco, F., Berardinelli, A., Manzur, A., Pane, M., Messina, S., Gualandi, F., Ricci, E., Rutherford, M., and Muntoni, F. (2010) Muscle magnetic resonance imaging

- involvement in muscular dystrophies with rigidity of the spine, *Ann. Neurol.*, **67**, 201-208, <https://doi.org/10.1002/ana.21846>.
31. Van De Vlekkert, J., Maas, M., Hoogendijk, J. E., De Visser, M., and Van Schaik, I. N. (2015) Combining MRI and muscle biopsy improves diagnostic accuracy in subacute-onset idiopathic inflammatory myopathy, *Muscle Nerve*, **51**, 253-258, <https://doi.org/10.1002/mus.24307>.
32. Willcocks, R. J., Rooney, W. D., Triplett, W. T., Forbes, S. C., Lott, D. J., Senesac, C. R., Daniels, M. J., Wang, D. J., Harrington, A. T., Tennekoon, G. I., Russman, B. S., Finanger, E. L., Byrne, B. J., Finkel, R. S., Walter, G. A., Sweeney, H. L., and Vandenborne, K. (2016) Multicenter prospective longitudinal study of magnetic resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort, *Ann. Neurol.*, **79**, 535-547, <https://doi.org/10.1002/ana.24599>.
33. Burakiewicz, J., Sinclair, C. D. J., Fischer, D., Walter, G. A., Kan, H. E., and Hollingsworth, K. G. (2017) Quantifying fat replacement of muscle by quantitative MRI in muscular dystrophy, *J. Neurol.*, **264**, 2053-2067, <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8547-3>.
34. Krššák, M., Lindeboom, L., Schrauwen-Hinderling, V., Szczepaniak, L. S., Derave, W., Lundbom, J., Befroy, D., Schick, F., Machann, J., Kreis, R., and Boesch, C. (2021) Proton magnetic resonance spectroscopy in skeletal muscle: experts' consensus recommendations, *NMR Biomed.*, **34**, e4266, <https://doi.org/10.1002/nbm.4266>.
35. Brancaccio, P., Lippi, G., and Maffulli, N. (2010) Biochemical markers of muscular damage, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **48**, 757-767, <https://doi.org/10.1515/cclm.2010.179>.
36. Goldstein, R. A. (2017) Skeletal muscle injury biomarkers: assay qualification efforts and translation to the clinic, *Toxicol. Pathol.*, **45**, 943-951, <https://doi.org/10.1177/0192623317738927>.
37. Burch, P. M., Greg Hall, D., Walker, E. G., Bracken, W., Giovanelli, R., Goldstein, R., Higgs, R. E., King, N. M., Lane, P., Sauer, J. M., Michna, L., Muniappa, N., Pritt, M. L., Vlasakova, K., Watson, D. E., Wescott, D., Zabka, T. S., and Glaab, W. E. (2016) Evaluation of the relative performance of drug-induced skeletal muscle injury biomarkers in rats, *Toxicol. Sci.*, **150**, 247-256, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv328>.
38. Katrukha, I. A. (2013) Human cardiac troponin complex. Structure and functions, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1447-1465, <https://doi.org/10.1134/S0006297913130063>.
39. Sheng, J. J., and Jin, J. P. (2016) TNNI1, TNNI2 and TNNI3: evolution, regulation, and protein structure-function relationships, *Gene*, **576**, 385-394, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.052>.
40. Dhoot, G. K., and Perry, S. V. (1979) Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle, *Nature*, **278**, 714-718, <https://doi.org/10.1038/278714a0>.
41. Sasse, S., Brand, N. J., Kyprianou, P., Dhoot, G. K., Wade, R., Arai, M., Periasamy, M., Yacoub, M. H., and Barton, P. J. (1993) Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure, *Circ. Res.*, **72**, 932-938, <https://doi.org/10.1161/01.res.72.5.932>.
42. Bodor, G. S., Porterfield, D., Voss, E. M., Smith, S., and Apple, F. S. (1995) Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue, *Clin. Chem.*, **41**, 1710-1715.
43. Dellow, K. A., Bhavsar, P. K., Brand, N. J., and Barton, P. J. (2001) Identification of novel, cardiac-restricted transcription factors binding to a CACC-box within the human cardiac troponin I promoter, *Cardiovasc. Res.*, **50**, 24-33, [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00204-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00204-8).
44. Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bulargina, T. V., and Gusev, N. B. (1999) Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning, *Biochemistry (Moscow)*, **64**, 969-985.
45. Gomes, A. V., Potter, J. D., and Szczesna-Cordary, D. (2002) The role of troponins in muscle contraction, *IUBMB Life*, **54**, 323-333, <https://doi.org/10.1080/15216540216037>.
46. Vinogradova, M. V., Stone, D. B., Malanina, G. G., Karatzaferi, C., Cooke, R., Mendelson, R. A., and Fletterick, R. J. (2005) Ca²⁺-regulated structural changes in troponin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5038-5043, <https://doi.org/10.1073/pnas.0408882102>.
47. Takeda, S., Yamashita, A., Maeda, K., and Maéda, Y. (2003) Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺-saturated form, *Nature*, **424**, 35-41, <https://doi.org/10.1038/nature01780>.
48. Howarth, J. W., Meller, J., Solaro, R. J., Trewhella, J., and Rosevear, P. R. (2007) Phosphorylation-dependent conformational transition of the cardiac specific N-extension of troponin I in cardiac troponin, *J. Mol. Biol.*, **373**, 706-722, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.035>.
49. Blumenschein, T. M., Stone, D. B., Fletterick, R. J., Mendelson, R. A., and Sykes, B. D. (2006) Dynamics of the C-terminal region of TnI in the troponin complex in solution, *Biophys. J.*, **90**, 2436-2444, <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.076216>.
50. Julien, O., Mercier, P., Allen, C. N., Fisette, O., Ramos, C. H., Lague, P., Blumenschein, T. M., and Sykes, B. D. (2011) Is there nascent structure in the intrinsically disordered region of troponin I? *Proteins*, **79**, 1240-1250, <https://doi.org/10.1002/prot.22959>.

51. King, W. A., Stone, D. B., Timmins, P. A., Narayanan, T., von Brasch, A. A., Mendelson, R. A., and Curmi, P. M. (2005) Solution structure of the chicken skeletal muscle troponin complex via small-angle neutron and X-ray scattering, *J. Mol. Biol.*, **45**, 797-815, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.090>.
52. Murakami, K., Yumoto, F., Ohki, S. Y., Yasunaga, T., Tanokura, M., and Wakabayashi, T. (2005) Structural basis for Ca^{2+} -regulated muscle relaxation at interaction sites of troponin with actin and tropomyosin, *J. Mol. Biol.*, **352**, 178-201, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.067>.
53. Wang, H., Chalovich, J. M., and Marriott, G. (2012) Structural dynamics of troponin I during Ca^{2+} -activation of cardiac thin filaments: a multi-site Förster resonance energy transfer study, *PLoS One*, **7**, e50420, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050420>.
54. Zhou, Z., Li, K. L., Rieck, D., Ouyang, Y., Chandra, M., and Dong, W. J. (2012) Structural dynamics of C-domain of cardiac troponin I protein in reconstituted thin filament, *J. Biol. Chem.*, **87**, 7661-7674, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281600>.
55. Galinska-Rakoczy, A., Engel, P., Xu, C., Jung, H., Craig, R., Tobacman, L. S., and Lehman, W. (2008) Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin, *J. Mol. Biol.*, **379**, 929-935, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.062>.
56. Galinska, A., Hatch, V., Craig, R., Murphy, A. M., Van Eyk, J. E., Wang, C. L., Lehman, W., and Foster, D. B. (2010) The C terminus of cardiac troponin I stabilizes the Ca^{2+} -activated state of tropomyosin on actin filaments, *Circ. Res.*, **106**, 705-711, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.210047>.
57. Saggin, L., Gorza, L., Ausoni, S., and Schiaffino, S. (1990) Cardiac troponin T in developing, regenerating and denervated rat skeletal muscle, *Development*, **110**, 547-554, <https://doi.org/10.1242/dev.110.2.547>.
58. Anderson, P. A., Malouf, N. N., Oakeley, A. E., Pagani, E. D., and Allen, P. D. (1991) Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle, *Circ. Res.*, **69**, 1226-1233, <https://doi.org/10.1161/01.res.69.5.1226>.
59. Perry, S. V. (1998) Troponin T: genetics, properties and function, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **19**, 575-602, <https://doi.org/10.1023/a:1005397501968>.
60. Jin, J. P., and Chong, S. M. (2010) Localization of the two tropomyosin-binding sites of troponin T, *Arch. Biochem. Biophys.*, **500**, 144-150, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.001>.
61. Wei, B., and Jin, J. P. (2016) TNNT1, TNNT2, and TNNT3: isoform genes, regulation, and structure-function relationships, *Gene*, **582**, 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.006>.
62. Marston, S., and Zamora, J. E. (2020) Troponin structure and function: a view of recent progress, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41**, 71-89, <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09513-1>.
63. Morris, E. P., and Lehrer, S. S. (1984) Troponin-tropomyosin interactions. Fluorescence studies of the binding of troponin, troponin T, and chymotryptic troponin T fragments to specifically labeled tropomyosin, *Biochemistry*, **23**, 2214-2220, <https://doi.org/10.1021/bi00305a018>.
64. Tanokura, M., Tawada, Y., Ono, A., and Ohtsuki, I. (1983) Chymotryptic subfragments of troponin T from rabbit skeletal muscle. Interaction with tropomyosin, troponin I and troponin C, *J. Biochem.*, **93**, 331-337, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134185>.
65. Franklin, A. J., Baxley, T., Kobayashi, T., and Chalovich, J. M. (2012) The C-terminus of troponin T is essential for maintaining the inactive state of regulated actin, *Biophys. J.*, **102**, 2536-2544, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.037>.
66. Oda, T., Yanagisawa, H., and Wakabayashi, T. (2020) Cryo-EM structures of cardiac thin filaments reveal the 3D architecture of troponin, *J. Struct. Biol.*, **209**, 107450, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107450>.
67. Yamada, Y., Namba, K., and Fujii, T. (2020) Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism, *Nat. Commun.*, **11**, 153, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14008-1>.
68. Risi, C. M., Pepper, I., Belknap, B., Landim-Vieira, M., White, H. D., Dryden, K., Pinto, J. R., Chase, P. B., and Galkin, V. E. (2021) The structure of the native cardiac thin filament at systolic Ca^{2+} levels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, <https://doi.org/10.1073/pnas.2024288118>.
69. Wang, Z., Grange, M., Pospich, S., Wagner, T., Kho, A. L., Gautel, M., and Raunser, S. (2022) Structures from intact myofibrils reveal mechanism of thin filament regulation through nebulin, *Science*, **375**, eabn1934, <https://doi.org/10.1126/science.abn1934>.
70. Briggs, M. M., Maready, M., Schmidt, J. M., and Schachat, F. (1994) Identification of a fetal exon in the human fast troponin T gene, *FEBS Lett.*, **350**, 37-40, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00729-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00729-2).
71. Wilkinson, J. M., Moir, A. J., and Waterfield, M. D. (1984) The expression of multiple forms of troponin T in chicken-fast-skeletal muscle may result from differential splicing of a single gene, *Eur. J. Biochem.*, **143**, 47-56, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08337.x>.
72. Briggs, M. M., and Schachat, F. (1993) Origin of fetal troponin T: developmentally regulated splicing of a new exon in the fast troponin T gene, *Dev. Biol.*, **158**, 503-509, <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1208>.

73. Medford, R. M., Nguyen, H. T., Destree, A. T., Summers, E., and Nadal-Ginard, B. (1984) A novel mechanism of alternative RNA splicing for the developmentally regulated generation of troponin T isoforms from a single gene, *Cell*, **38**, 409-421, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90496-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90496-3).
74. Wang, J., and Jin, J. P. (1997) Primary structure and developmental acidic to basic transition of 13 alternatively spliced mouse fast skeletal muscle troponin T isoforms, *Gene*, **193**, 105-114, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00100-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00100-5).
75. Wang, J., and Jin, J. P. (1998) Conformational modulation of troponin T by configuration of the NH₂-terminal variable region and functional effects, *Biochemistry*, **37**, 14519-14528, <https://doi.org/10.1021/bi9812322>.
76. Moore, G. E., Briggs, M. M., and Schachat, F. H. (1987) Patterns of troponin T expression in mammalian fast, slow and promiscuous muscle fibres, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **8**, 13-22, <https://doi.org/10.1007/BF01767260>.
77. Briggs, M. M., McGinnis, H. D., and Schachat, F. (1990) Transitions from fetal to fast troponin T isoforms are coordinated with changes in tropomyosin and alpha-actinin isoforms in developing rabbit skeletal muscle, *Dev. Biol.*, **140**, 253-260, [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90075-t](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90075-t).
78. Melby, J. A., Jin, Y., Lin, Z., Tucholski, T., Wu, Z., Gregorich, Z. R., Diffey, G. M., and Ge, Y. (2020) Top-down proteomics reveals myofilament proteoform heterogeneity among various rat skeletal muscle tissues, *J. Proteome Res.*, **19**, 446-454, <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00623>.
79. Jin, Y., Diffey, G. M., Colman, R. J., Anderson, R. M., and Ge, Y. (2019) Top-down mass spectrometry of sarcomeric protein post-translational modifications from non-human primate skeletal muscle, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **30**, 2460-2469, <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02139-0>.
80. Chen, Y. C., Sumandea, M. P., Larsson, L., Moss, R. L., and Ge, Y. (2015) Dissecting human skeletal muscle troponin proteoforms by top-down mass spectrometry, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 169-181, <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9404-6>.
81. Jin, J. P., Chen, A., and Huang, Q. Q. (1998) Three alternatively spliced mouse slow skeletal muscle troponin T isoforms: conserved primary structure and regulated expression during postnatal development, *Gene*, **214**, 121-129, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00214-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00214-5).
82. Huang, Q. Q., Chen, A., and Jin, J. P. (1999) Genomic sequence and structural organization of mouse slow skeletal muscle troponin T gene, *Gene*, **229**, 1-10, [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00051-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00051-7).
83. Gahlmann, R., Troutt, A. B., Wade, R. P., Gunning, P., and Kedes, L. (1987) Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16122-16126.
84. Samson, F., Mesnard, L., Mihovilovic, M., Potter, T. G., Mercadier, J. J., Roses, A. D., and Gilbert, J. R. (1994) A new human slow skeletal troponin T (TnTs) mRNA isoform derived from alternative splicing of a single gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 841-847, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994>.
85. Gahlmann, R., Wade, R., Gunning, P., and Kedes, L. (1988) Differential expression of slow and fast skeletal muscle troponin C. Slow skeletal muscle troponin C is expressed in human fibroblasts, *J. Mol. Biol.*, **201**, 379-391, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90145-3).
86. Houdusse, A., Love, M. L., Dominguez, R., Grabarek, Z., and Cohen, C. (1997) Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily, *Structure*, **5**, 1695-1711, [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00315-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00315-8).
87. Mercier, P., Ferguson, R. E., Irving, M., Corrie, J. E., Trentham, D. R., and Sykes, B. D. (2003) NMR structure of a bifunctional rhodamine labeled N-domain of troponin C complexed with the regulatory "switch" peptide from troponin I: implications for in situ fluorescence studies in muscle fibers, *Biochemistry*, **42**, 4333-4348, <https://doi.org/10.1021/bi027041n>.
88. Potter, J. D., and Gergely, J. (1974) Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction, *Biochemistry*, **13**, 2697-2703, <https://doi.org/10.1021/bi00710a007>.
89. Sia, S. K., Li, M. X., Spyrapoulos, L., Gagné, S. M., Liu, W., Putkey, J. A., and Sykes, B. D. (1997) Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain, *J. Biol. Chem.*, **272**, 18216-18221, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18216>.
90. Morimoto, S., Harada, K., and Ohtsuki, I. (1999) Roles of troponin isoforms in pH dependence of contraction in rabbit fast and slow skeletal and cardiac muscles, *J. Biochem.*, **126**, 121-129, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022412>.
91. Brotto, M. A., Biesiadecki, B. J., Brotto, L. S., Nosek, T. M., and Jin, J. P. (2006) Coupled expression of troponin T and troponin I isoforms in single skeletal muscle fibers correlates with contractility, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, C567-576, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00422.2005>.
92. Piroddi, N., Tesi, C., Pellegrino, M. A., Tobacman, L. S., Homsher, E., and Poggesi, C. (2003) Contractile effects of the exchange of cardiac troponin for fast skeletal troponin in rabbit psoas single myofibrils, *J. Physiol.*, **552**, 917-931, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.051615>.

93. Yan, G. X., and Kleber, A. G. (1992) Changes in extracellular and intracellular pH in ischemic rabbit papillary muscle, *Circ. Res.*, **71**, 460-470, <https://doi.org/10.1161/01.res.71.2.460>.
94. Jennings, R. B., and Reimer, K. A. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia, *Annu. Rev. Med.*, **42**, 225-246, <https://doi.org/10.1146/annurev.me.42.020191.001301>.
95. Sahlin, K., Harris, R. C., Nylinde, B., and Hultman, E. (1976) Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise, *Pflugers Arch.*, **367**, 143-149, <https://doi.org/10.1007/bf00585150>.
96. Bangsbo, J., Madsen, K., Kiens, B., and Richter, E. A. (1996) Effect of muscle acidity on muscle metabolism and fatigue during intense exercise in man, *J. Physiol.*, **495 (Pt 2)**, 587-596, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021618>.
97. Allen, D. G., Lamb, G. D., and Westerblad, H. (2008) Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms, *Physiol. Rev.*, **88**, 287-332, <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007>.
98. Donaldson, S. K., Hermansen, L., and Bolles, L. (1978) Differential, direct effects of H⁺ on Ca²⁺-activated force of skinned fibers from the soleus, cardiac and adductor magnus muscles of rabbits, *Pflugers Arch.*, **376**, 55-65, <https://doi.org/10.1007/bf00585248>.
99. Metzger, J. M., Parmacek, M. S., Barr, E., Pasyk, K., Lin, W. I., Cochrane, K. L., Field, L. J., and Leiden, J. M. (1993) Skeletal troponin C reduces contractile sensitivity to acidosis in cardiac myocytes from transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9036-9040, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9036>.
100. Metzger, J. M. (1996) Effects of troponin C isoforms on pH sensitivity of contraction in mammalian fast and slow skeletal muscle fibres, *J. Physiol.*, **492 (Pt 1)**, 163-172, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021298>.
101. Solaro, R. J., Kumar, P., Blanchard, E. M., and Martin, A. F. (1986) Differential effects of pH on calcium activation of myofilaments of adult and perinatal dog hearts. Evidence for developmental differences in thin filament regulation, *Circ. Res.*, **58**, 721-729, <https://doi.org/10.1161/01.res.58.5.721>.
102. Wolska, B. M., Vijayan, K., Arteaga, G. M., Konhilas, J. P., Phillips, R. M., Kim, R., Naya, T., Leiden, J. M., Martin, A. F., de Tombe, P. P., and Solaro, R. J. (2001) Expression of slow skeletal troponin I in adult transgenic mouse heart muscle reduces the force decline observed during acidic conditions, *J. Physiol.*, **536**, 863-870, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00863.x>.
103. Robertson, I. M., Holmes, P. C., Li, M. X., Pineda-Sanabria, S. E., Baryshnikova, O. K., and Sykes, B. D. (2012) Elucidation of isoform-dependent pH sensitivity of troponin i by NMR spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **287**, 4996-5007, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301499>.
104. Pineda-Sanabria, S. E., Robertson, I. M., Li, M. X., and Sykes, B. D. (2013) Interaction between the regulatory domain of cardiac troponin C and the acidosis-resistant cardiac troponin I A162H, *Cardiovasc. Res.*, **97**, 481-489, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs348>.
105. Robertson, I. M., Pineda-Sanabria, S. E., Holmes, P. C., and Sykes, B. D. (2014) Conformation of the critical pH sensitive region of troponin depends upon a single residue in troponin I, *Arch. Biochem. Biophys.*, **552-553**, 40-49, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.003>.
106. Pineda-Sanabria, S. E., Robertson, I. M., and Sykes, B. D. (2015) Structure and dynamics of the acidosis-resistant A162H mutant of the switch region of troponin I bound to the regulatory domain of troponin C, *Biochemistry*, **54**, 3583-3593, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00178>.
107. Ogut, O., and Jin, J. P. (1998) Developmentally regulated, alternative RNA splicing-generated pectoral muscle-specific troponin T isoforms and role of the NH2-terminal hypervariable region in the tolerance to acidosis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 27858-27866, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.27858>.
108. Ogut, O., Granzier, H., and Jin, J. P. (1999) Acidic and basic troponin T isoforms in mature fast-twitch skeletal muscle and effect on contractility, *Am. J. Physiol.*, **276**, C1162-1170, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.5.C1162>.
109. Nosek, T. M., Brotto, M. A., and Jin, J. P. (2004) Troponin T isoforms alter the tolerance of transgenic mouse cardiac muscle to acidosis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 178-184, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.014>.
110. Shen, J., Li, Y., Gu, H., Xia, F., and Zuo, X. (2014) Recent development of sandwich assay based on the nanobiotechnologies for proteins, nucleic acids, small molecules, and ions, *Chem. Rev.*, **114**, 7631-7677, <https://doi.org/10.1021/cr300248x>.
111. Larue, C., Defacque-Lacquement, H., Calzolari, C., Le Nguyen, D., and Pau, B. (1992) New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin I: epitopic analysis with synthetic peptides, *Mol. Immunol.*, **29**, 271-278, [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90109-b](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90109-b).
112. Larue, C., Calzolari, C., Bertinchant, J. P., Leclercq, F., Grolleau, R., and Pau, B. (1993) Cardiac-specific immunoassay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction, *Clin. Chem.*, **39**, 972-979.
113. Rama, D., Margaritis, I., Orsetti, A., Marconnet, P., Gros, P., Larue, C., Trinquier, S., Pau, B., and Calzolari, C. (1996) Troponin I immunoassays for detection of muscle damage applied to monitoring a triathlon, *Clin. Chem.*, **42**, 2033-2035.

114. Onuoha, G. N., Alpar, E. K., Dean, B., Tidman, J., Rama, D., Laprade, M., and Pau, B. (2001) Skeletal troponin-I release in orthopedic and soft tissue injuries, *J. Orthop. Sci.*, **6**, 11-15, <https://doi.org/10.1007/s007760170018>.
115. Bamberg, K., Mehtälä, L., Arola, O., Laitinen, S., Nordling, P., Strandberg, M., Strandberg, N., Paltta, J., Mali, M., Espinosa-Ortega, F., Pirilä, L., Lundberg, I. E., Savukoski, T., and Pettersson, K. (2020) Evaluation of a new skeletal troponin I assay in patients with idiopathic inflammatory myopathies, *J. Appl. Lab. Med.*, **5**, 320-331, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfz016>.
116. Sun, D., Hamlin, D., Butterfield, A., Watson, D. E., and Smith, H. W. (2010) Electrochemiluminescent immunoassay for rat skeletal troponin I (Tnni2) in serum, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **61**, 52-58, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.09.002>.
117. Simpson, J. A., Labugger, R., Hesketh, G. G., D'Arsigny, C., O'Donnell, D., Matsumoto, N., Collier, C. P., Iscoe, S., and Van Eyk, J. E. (2002) Differential detection of skeletal troponin I isoforms in serum of a patient with rhabdomyolysis: markers of muscle injury? *Clin. Chem.*, **48**, 1112-1114.
118. Simpson, J. A., Labugger, R., Collier, C., Brison, R. J., Iscoe, S., and Van Eyk, J. E. (2005) Fast and slow skeletal troponin I in serum from patients with various skeletal muscle disorders: a pilot study, *Clin. Chem.*, **51**, 966-972, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.042671>.
119. Takahashi, M., Lee, L., Shi, Q., Gawad, Y., and Jackowski, G. (1996) Use of enzyme immunoassay for measurement of skeletal troponin-I utilizing isoform-specific monoclonal antibodies, *Clin. Biochem.*, **29**, 301-308, [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(96\)00016-1](https://doi.org/10.1016/0009-9120(96)00016-1).
120. Sorichter, S., Mair, J., Koller, A., Calzolari, C., Huonker, M., Pau, B., and Puschendorf, B. (2001) Release of muscle proteins after downhill running in male and female subjects, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **11**, 28-32, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0838.2001.011001028.x>.
121. Chapman, D. W., Simpson, J. A., Iscoe, S., Robins, T., and Nosaka, K. (2013) Changes in serum fast and slow skeletal troponin I concentration following maximal eccentric contractions, *J. Sci. Med. Sport*, **16**, 82-85, <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2012.05.006>.
122. Chen, T. C., Liu, H. W., Russell, A., Barthel, B. L., Tseng, K. W., Huang, M. J., Chou, T. Y., and Nosaka, K. (2020) Large increases in plasma fast skeletal muscle troponin I after whole-body eccentric exercises, *J. Sci. Med. Sport*, **23**, 776-781, <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.01.011>.
123. Kiely, P. D., Bruckner, F. E., Nisbet, J. A., and Daghir, A. (2000) Serum skeletal troponin I in inflammatory muscle disease: relation to creatine kinase, CKMB and cardiac troponin I, *Ann. Rheum. Dis.*, **59**, 750-751, <https://doi.org/10.1136/ard.59.9.750>.
124. Vassallo, J. D., Janovitz, E. B., Wescott, D. M., Chadwick, C., Lowe-Krentz, L. J., and Lehman-McKeeman, L. D. (2009) Biomarkers of drug-induced skeletal muscle injury in the rat: troponin I and myoglobin, *Toxicol. Sci.*, **111**, 402-412, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp166>.
125. Tonomura, Y., Matsushima, S., Kashiwagi, E., Fujisawa, K., Takagi, S., Nishimura, Y., Fukushima, R., Torii, M., and Matsubara, M. (2012) Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats, *Toxicology*, **302**, 179-189, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.012>.
126. Madden, L., Juhas, M., Kraus, W. E., Truskey, G. A., and Bursac, N. (2015) Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs, *Elife*, **4**, e04885, <https://doi.org/10.7554/eLife.04885>.
127. Khodabukus, A., Kaza, A., Wang, J., Prabhu, N., Goldstein, R., Vaidya, V. S., and Bursac, N. (2020) Tissue-engineered human myobundle system as a platform for evaluation of skeletal muscle injury biomarkers, *Toxicol. Sci.*, **176**, 124-136, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa049>.
128. Barthel, B. L., Cox, D., Barbieri, M., Ziemba, M., Straub, V., Hoffman, E. P., and Russell, A. J. (2021) Elevation of fast but not slow troponin I in the circulation of patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy, *Muscle Nerve*, **64**, 43-49, <https://doi.org/10.1002/mus.27222>.
129. Traa, W. A., Strijkers, G. J., Bader, D. L., and Oomens, C. W. J. (2019) Myoglobin and troponin concentrations are increased in early stage deep tissue injury, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **92**, 50-57, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.12.026>.
130. Perry, S. V., and Cole, H. A. (1974) Phosphorylation of troponin and the effects of interactions between the components of the complex, *Biochem. J.*, **141**, 733-743, <https://doi.org/10.1042/bj1410733>.
131. Moir, A. J., Wilkinson, J. M., and Perry, S. V. (1974) The phosphorylation sites of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit, *FEBS Lett.*, **42**, 253-256, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80739-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80739-8).
132. Moir, A. J., Cole, H. A., and Perry, S. V. (1977) The phosphorylation sites of troponin T from white skeletal muscle and the effects of interaction with troponin C on their phosphorylation by phosphorylase kinase, *Biochem. J.*, **161**, 371-382, <https://doi.org/10.1042/bj1610371>.

133. Mazzei, G. J., and Kuo, J. F. (1984) Phosphorylation of skeletal-muscle troponin I and troponin T by phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase and its inhibition by troponin C and tropomyosin, *Biochem. J.*, **218**, 361-369, <https://doi.org/10.1042/bj2180361>.
134. Sancho Solis, R., Ge, Y., and Walker, J. W. (2011) A preferred AMPK phosphorylation site adjacent to the inhibitory loop of cardiac and skeletal troponin I, *Protein Sci.*, **20**, 894-907, <https://doi.org/10.1002/pro.623>.
135. Cole, H. A., and Perry, S. V. (1975) The phosphorylation of troponin I from cardiac muscle, *Biochem. J.*, **149**, 525-533, <https://doi.org/10.1042/bj1490525>.
136. Gusev, N. B., Dobrovolskii, A. B., and Severin, S. E. (1978) Skeletal muscle troponin and phosphorylation: a site of troponin T, that is phosphorylated by specific protein kinase [in Russian], *Biokhimiia*, **43**, 365-372.
137. Risnik, V. V., Dobrovolskii, A. B., Gusev, N. B., and Severin, S. E. (1980) Phosphorylase kinase phosphorylation of skeletal-muscle troponin T, *Biochem. J.*, **191**, 851-854, <https://doi.org/10.1042/bj1910851>.
138. Gusev, N. B., Dobrovolskii, A. B., and Severin, S. E. (1980) Isolation and some properties of troponin T kinase from rabbit skeletal muscle, *Biochem J.*, **189**, 219-226, <https://doi.org/10.1042/bj1890219>.
139. Zemskova, M. A., Shur, S. A., Skolysheva, L. K., and Vul'fson, P. L. (1991) Interaction of phosphorylase kinase with thin filament proteins of rabbit skeletal muscles [in Russian], *Biokhimiia*, **56**, 100-108.
140. Katrukha, I. A., and Gusev, N. B. (2013) Enigmas of cardiac troponin T phosphorylation, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **65**, 156-158, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.017>.
141. Gusev, N. B., Barskaya, N. V., Verin, A. D., Duzhenkova, I. V., Khuchua, Z. A., and Zheltova, A. O. (1983) Some properties of cardiac troponin T structure, *Biochem. J.*, **213**, 123-129, <https://doi.org/10.1042/bj2130123>.
142. Zhang, J., Guy, M. J., Norman, H. S., Chen, Y. C., Xu, Q., Dong, X., Guner, H., Wang, S., Kohmoto, T., Young, K. H., Moss, R. L., and Ge, Y. (2011) Top-down quantitative proteomics identified phosphorylation of cardiac troponin I as a candidate biomarker for chronic heart failure, *J. Proteome Res.*, **10**, 4054-4065, <https://doi.org/10.1021/pr200258m>.
143. Lamb, G. D., and Westerblad, H. (2011) Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle, *J. Physiol.*, **589**, 2119-2127, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199059>.
144. Mollica, J. P., Dutka, T. L., Merry, T. L., Lamboley, C. R., McConell, G. K., McKenna, M. J., Murphy, R. M., and Lamb, G. D. (2012) S-glutathionylation of troponin I (fast) increases contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity in fast-twitch muscle fibres of rats and humans, *J. Physiol.*, **590**, 1443-1463, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224535>.
145. Dutka, T. L., Mollica, J. P., Lamboley, C. R., Weerakkody, V. C., Greening, D. W., Posterino, G. S., Murphy, R. M., and Lamb, G. D. (2017) S-nitrosylation and S-glutathionylation of Cys134 on troponin I have opposing competitive actions on Ca^{2+} sensitivity in rat fast-twitch muscle fibers, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **312**, C316-C327, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2016>.
146. Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Filatov, V. L., Esakova, T. V., Kolosova, O. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Bulargina, T. V., Trifonov, I. R., Gratsiansky, N. A., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L. M., and Gusev, N. B. (1998) Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection, *Clin. Chem.*, **44**, 2433-2440.
147. Katrukha, I. A., Kogan, A. E., Vylegzhanina, A. V., Kharitonov, A. V., Tamm, N. N., Filatov, V. L., Bereznikova, A. V., Koshkina, E. V., and Katrukha, A. G. (2018) Full-size cardiac troponin I and its proteolytic fragments in blood of patients with acute myocardial infarction: antibody selection for assay development, *Clin. Chem.*, **64**, 1104-1112, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.286211>.
148. Di Lisa, F., De Tullio, R., Salamino, F., Barbato, R., Melloni, E., Siliprandi, N., Schiaffino, S., and Pontremoli, S. (1995) Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation, *Biochem. J.*, **308** (Pt 1), 57-61, <https://doi.org/10.1042/bj3080057>.
149. Wang, W., Schulze, C. J., Suarez-Pinzon, W. L., Dyck, J. R., Sawicki, G., and Schulz, R. (2002) Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury, *Circulation*, **106**, 1543-1549, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000028818.33488.7b>.
150. Gao, W. D., Atar, D., Liu, Y., Perez, N. G., Murphy, A. M., and Marban, E. (1997) Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium, *Circ. Res.*, **80**, 393-399.
151. Mahmud, Z., Zahran, S., Liu, P. B., Reiz, B., Chan, B. Y. H., Roczkowsky, A., McCartney, C. E., Davies, P. L., Li, L., Schulz, R., and Hwang, P. M. (2019) Structure and proteolytic susceptibility of the inhibitory C-terminal tail of cardiac troponin I, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1863**, 661-671, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.008>.
152. Katrukha, I. A., and Katrukha, A. G. (2021) Myocardial injury and the release of troponins I and T in the blood of patients, *Clin. Chem.*, **67**, 124-130, <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa281>.
153. Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R. J., and Hajjar, R. J. (2002) Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6252-6256, <https://doi.org/10.1073/pnas.092022999>.
154. Zhang, Z., Biesiadecki, B. J., and Jin, J. P. (2006) Selective deletion of the NH2-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage, *Biochemistry*, **45**, 11681-11694, <https://doi.org/10.1021/bi060273s>.

155. Katrukha, I. A., Riabkova, N. S., Kogan, A. E., Vylegzhanina, A. V., Mukharyamova, K. S., Bogomolova, A. P., Zabolotskii, A. I., Koshkina, E. V., Bereznikova, A. V., and Katrukha, A. G. (2023) Fragmentation of human cardiac troponin T after acute myocardial infarction, *Clin. Chim. Acta*, **542**, 117281, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117281>.
156. Feng, H. Z., Wang, Q., Reiter, R. S., Lin, J. L., Lin, J. J., and Jin, J. P. (2013) Localization and function of Xina in mouse skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **304**, C1002-1012, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00005.2013>.
157. Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M. E., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L. M., and Gusev, N. B. (1997) Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex, *Clin. Chem.*, **43**, 1379-1385.
158. Vylegzhanina, A. V., Kogan, A. E., Katrukha, I. A., Koshkina, E. V., Bereznikova, A. V., Filatov, V. L., Bloshchitsyna, M. N., Bogomolova, A. P., and Katrukha, A. G. (2019) Full-size and partially truncated cardiac troponin complexes in the blood of patients with acute myocardial infarction, *Clin. Chem.*, **65**, 882-892, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.301127>.
159. Adamczyk, M., Brashear, R. J., and Mattingly, P. G. (2009) Circulating cardiac troponin-I autoantibodies in human plasma and serum, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1173**, 67-74, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04617.x>.
160. Vylegzhanina, A. V., Kogan, A. E., Katrukha, I. A., Antipova, O. V., Kara, A. N., Bereznikova, A. V., Koshkina, E. V., and Katrukha, A. G. (2017) Anti-cardiac troponin autoantibodies are specific to the conformational epitopes formed by cardiac troponin I and troponin T in the ternary troponin complex, *Clin. Chem.*, **63**, 343-350, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.261602>.
161. Sung, S. S., Brassington, A. M., Grannatt, K., Rutherford, A., Whitby, F. G., Krakowiak, P. A., Jorde, L. B., Carey, J. C., and Bamshad, M. (2003) Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins cause distal arthrogryposis syndromes, *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 681-690, <https://doi.org/10.1086/368294>.
162. Kimber, E., Tajsharghi, H., Kroksmark, A. K., Oldfors, A., and Tulinius, M. (2006) A mutation in the fast skeletal muscle troponin I gene causes myopathy and distal arthrogryposis, *Neurology*, **67**, 597-601, <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000230168.05328.f4>.
163. Jiang, M., Zhao, X., Han, W., Bian, C., Li, X., Wang, G., Ao, Y., Li, Y., Yi, D., Zhe, Y., Lo, W. H., Zhang, X., and Li, J. (2006) A novel deletion in TNNI2 causes distal arthrogryposis in a large Chinese family with marked variability of expression, *Hum. Genet.*, **120**, 238-242, <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0183-4>.
164. Shrimpton, A. E., and Hoo, J. J. (2006) A TNNI2 mutation in a family with distal arthrogryposis type 2B, *Eur. J. Med. Genet.*, **49**, 201-206, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.06.003>.
165. Li, X., Jiang, M., Han, W., Zhao, N., Liu, W., Sui, Y., Lu, Y., and Li, J. (2013) A novel TNNI2 mutation causes Freeman-Sheldon syndrome in a Chinese family with an affected adult with only facial contractures, *Gene*, **527**, 630-635, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.082>.
166. Li, Y., Nong, T., Li, X., Li, Z., Lv, H., Xu, H., Li, J., and Zhu, M. (2022) A TNNI2 variant c.525G>T causes distal arthrogryposis in a Chinese family, *Mol. Genet. Genomic Med.*, **10**, e2042, <https://doi.org/10.1002/mgg3.2042>.
167. Čulić, V., Miyake, N., Janković, S., Petrović, D., Šimunović, M., Đapić, T., Shiina, M., Ogata, K., and Matsumoto, N. (2016) Distal arthrogryposis with variable clinical expression caused by TNNI2 mutation, *Hum. Genome Var.*, **3**, 16035, <https://doi.org/10.1038/hgv.2016.35>.
168. Wang, B., Zheng, Z., Wang, Z., Zhang, X., Yang, H., Cai, H., and Fu, Q. (2016) A novel missense mutation of TNNI2 in a Chinese family cause distal arthrogryposis type 1, *Am. J. Med. Genet. A*, **170a**, 135-141, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37391>.
169. Seyama, R., Uchiyama, Y., Kaneshi, Y., Hamanaka, K., Fujita, A., Tsuchida, N., Koshimizu, E., Misawa, K., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Makino, S., Itakura, A., Okamoto, N., and Matsumoto, N. (2023) Distal arthrogryposis in a girl arising from a novel TNNI2 variant inherited from paternal somatic mosaicism, *J. Hum. Genet.*, **68**, 363-367, <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01117-x>.
170. Nishimori, Y., Iida, A., Ogasawara, M., Okubo, M., Yonenobu, Y., Kinoshita, M., Sugie, K., Noguchi, S., and Nishino, I. (2022) TNNI1 mutated in autosomal dominant proximal arthrogryposis, *Neurol. Genet.*, **8**, e649, <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000649>.
171. Beck, A. E., McMillin, M. J., Gildersleeve, H. I., Kezele, P. R., Shively, K. M., Carey, J. C., Regnier, M., and Bamshad, M. J. (2013) Spectrum of mutations that cause distal arthrogryposis types 1 and 2B, *Am. J. Med. Genet. A*, **161**, 550-555, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35809>.
172. Desai, D., Stiene, D., Song, T., and Sadayappan, S. (2020) Distal arthrogryposis and lethal congenital contracture syndrome – an overview, *Front. Physiol.*, **11**, 689, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00689>.
173. Shafaattalab, S., Li, A. Y., Lin, E., Stevens, C. M., Dewar, L. J., Lynn, F. C., Sanatani, S., Laksman, Z., Morin, R. D., van Petegem, F., Hove-Madsen, L., Tieleman, D. P., Davis, J. P., and Tibbits, G. F. (2019) *In vitro* analyses of suspected arrhythmogenic thin filament variants as a cause of sudden cardiac death in infants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6969-6974, <https://doi.org/10.1073/pnas.1819023116>.

174. Sung, S. S., Brassington, A. M., Krakowiak, P. A., Carey, J. C., Jorde, L. B., and Bamshad, M. (2003) Mutations in TNNT3 cause multiple congenital contractures: a second locus for distal arthrogryposis type 2B, *Am. J. Hum. Genet.*, 212-214, <https://doi.org/10.1086/376418>.
175. Daly, S. B., Shah, H., O'Sullivan, J., Anderson, B., Bhaskar, S., Williams, S., Al-Sheqaih, N., Mueed Bidchol, A., Banka, S., Newman, W. G., and Girisha, K. M. (2014) Exome sequencing identifies a dominant TNNT3 mutation in a large family with distal arthrogryposis, *Mol. Syndromol.*, 5, 218-228, <https://doi.org/10.1159/000365057>.
176. Zhao, N., Jiang, M., Han, W., Bian, C., Li, X., Huang, F., Kong, Q., and Li, J. (2011) A novel mutation in TNNT3 associated with Sheldon-Hall syndrome in a Chinese family with vertical talus, *Eur. J. Med. Genet.*, 54, 351-353, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.03.002>.
177. Lu, J., Li, H., Zhang, H., Lin, Z., Xu, C., Xu, X., Hu, L., Luan, Z., Lou, Y., and Tang, S. (2021) The distal arthrogryposis-linked p.R63C variant promotes the stability and nuclear accumulation of TNNT3, *J. Clin. Lab. Anal.*, 35, e24089, <https://doi.org/10.1002/jcla.24089>.
178. Sandaradura, S. A., Bournazos, A., Mallawaarachchi, A., Cummings, B. B., Waddell, L. B., Jones, K. J., Troedson, C., Sudarsanam, A., Nash, B. M., Peters, G. B., Algar, E. M., MacArthur, D. G., North, K. N., Brammah, S., Charlton, A., Laing, N. G., Wilson, M. J., Davis, M. R., and Cooper, S. T. (2018) Nemaline myopathy and distal arthrogryposis associated with an autosomal recessive TNNT3 splice variant, *Hum. Mutat.*, 39, 383-388, <https://doi.org/10.1002/humu.23385>.
179. Johnston, J. J., Kelley, R. I., Crawford, T. O., Morton, D. H., Agarwala, R., Koch, T., Schaffer, A. A., Francomano, C. A., and Biesecker, L. G. (2000) A novel nemaline myopathy in the Amish caused by a mutation in troponin T1, *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 814-821, <https://doi.org/10.1086/303089>.
180. Marra, J. D., Engelstad, K. E., Ankala, A., Tanji, K., Dastgir, J., De Vivo, D. C., Coffee, B., and Chiriboga, C. A. (2015) Identification of a novel nemaline myopathy-causing mutation in the troponin T1 (TNNT1) gene: a case outside of the old order Amish, *Muscle Nerve*, 51, 767-772, <https://doi.org/10.1002/mus.24528>.
181. Van der Pol, W. L., Leijenaar, J. F., Spliet, W. G., Lavrijsen, S. W., Jansen, N. J., Braun, K. P., Mulder, M., Timmers-Raaijmakers, B., Ratsma, K., Dooijes, D., and van Haelst, M. M. (2014) Nemaline myopathy caused by TNNT1 mutations in a Dutch pedigree, *Mol. Genet. Genomic Med.*, 2, 134-137, <https://doi.org/10.1002/mgg3.52>.
182. Abdulhaq, U. N., Daana, M., Dor, T., Fellig, Y., Eylon, S., Schuelke, M., Shaag, A., Elpeleg, O., and Edvardson, S. (2016) Nemaline body myopathy caused by a novel mutation in troponin T1 (TNNT1), *Muscle Nerve*, 53, 564-569, <https://doi.org/10.1002/mus.24885>.
183. Jin, J. P., Brotto, M. A., Hossain, M. M., Huang, Q. Q., Brotto, L. S., Nosek, T. M., Morton, D. H., and Crawford, T. O. (2003) Truncation by Glu180 nonsense mutation results in complete loss of slow skeletal muscle troponin T in a lethal nemaline myopathy, *J. Biol. Chem.*, 278, 26159-26165, <https://doi.org/10.1074/jbc.M303469200>.
184. Wang, X., Huang, Q. Q., Breckenridge, M. T., Chen, A., Crawford, T. O., Morton, D. H., and Jin, J. P. (2005) Cellular fate of truncated slow skeletal muscle troponin T produced by Glu180 nonsense mutation in amish nemaline myopathy, *J. Biol. Chem.*, 280, 13241-13249, <https://doi.org/10.1074/jbc.M413696200>.
185. Mondal, A., and Jin, J. P. (2016) Protein structure-function relationship at work: learning from myopathy mutations of the slow skeletal muscle isoform of troponin T, *Front. Physiol.*, 7, 449, <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00449>.
186. Van de Locht, M., Donkervoort, S., de Winter, J. M., Conijn, S., Begthel, L., Kusters, B., Mohassel, P., Hu, Y., Medne, L., Quinn, C., Moore, S. A., Foley, A. R., Seo, G., Hwee, D. T., Malik, F. I., Irving, T., Ma, W., Granzier, H. L., Kamsteeg, E. J., Immadisetty, K., et al. (2021) Pathogenic variants in TNNC2 cause congenital myopathy due to an impaired force response to calcium, *J. Clin. Invest.*, 131, <https://doi.org/10.1172/jci145700>.
187. Van de Locht, M., Borsboom, T. C., Winter, J. M., and Ottenheijm, C. A. C. (2021) Troponin variants in congenital myopathies: how they affect skeletal muscle mechanics, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, <https://doi.org/10.3390/ijms22179187>.
188. Hoffmann, B., Schmidt-Traub, H., Perrot, A., Osterziel, K. J., and Gessner, R. (2001) First mutation in cardiac troponin C, L29Q, in a patient with hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, 17, 524, <https://doi.org/10.1002/humu.1143>.
189. Landstrom, A. P., Parvatiyar, M. S., Pinto, J. R., Marquardt, M. L., Bos, J. M., Tester, D. J., Ommen, S. R., Potter, J. D., and Ackerman, M. J. (2008) Molecular and functional characterization of novel hypertrophic cardiomyopathy susceptibility mutations in TNNC1-encoded troponin C, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 45, 281-288, <https://doi.org/10.1016/j.jmcc.2008.05.003>.
190. Chung, W. K., Kitner, C., and Maron, B. J. (2011) Novel frameshift mutation in Troponin C (TNNC1) associated with hypertrophic cardiomyopathy and sudden death, *Cardiol. Young*, 21, 345-348, <https://doi.org/10.1017/S1047951110001927>.
191. Parvatiyar, M. S., Landstrom, A. P., Figueiredo-Freitas, C., Potter, J. D., Ackerman, M. J., and Pinto, J. R. (2012) A mutation in TNNC1-encoded cardiac troponin C, TNNC1-A31S, predisposes to hypertrophic cardiomyopathy and ventricular fibrillation, *J. Biol. Chem.*, 287, 31845-31855, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377713>.

192. Caforio, A. L., Rossi, B., Risaliti, R., Siciliano, G., Marchetti, A., Angelini, C., Crea, F., Mariani, M., and Muratorio, A. (1989) Type 1 fiber abnormalities in skeletal muscle of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy: evidence of subclinical myogenic myopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **14**, 1464-1473, [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90383-5](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90383-5).
193. Veltri, T., Landim-Vieira, M., Parvatiyar, M. S., Gonzalez-Martinez, D., Dieseldorff Jones, K. M., Michell, C. A., Dweck, D., Landstrom, A. P., Chase, P. B., and Pinto, J. R. (2017) Hypertrophic cardiomyopathy cardiac troponin C mutations differentially affect slow skeletal and cardiac muscle regulation, *Front. Physiol.*, **8**, 221, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00221>.
194. Li, M. X., Mercier, P., Hartman, J. J., and Sykes, B. D. (2021) Structural basis of tirasemtiv activation of fast skeletal muscle, *J. Med. Chem.*, **64**, 3026-3034, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01412>.
195. Russell, A. J., Hartman, J. J., Hinken, A. C., Muci, A. R., Kawas, R., Driscoll, L., Godinez, G., Lee, K. H., Marquez, D., Browne, W. F. 4th, Chen, M. M., Clarke, D., Collibee, S. E., Garard, M., Hansen, R., Jia, Z., Lu, P. P., Rodriguez, H., Saikali, K. G., Schaletzky, J., et al. (2012) Activation of fast skeletal muscle troponin as a potential therapeutic approach for treating neuromuscular diseases, *Nat. Med.*, **18**, 452-455, <https://doi.org/10.1038/nm.2618>.
196. Shefner, J., Cedarbaum, J. M., Cudkowicz, M. E., Maragakis, N., Lee, J., Jones, D., Watson, M. L., Mahoney, K., Chen, M., Saikali, K., Mao, J., Russell, A. J., Hansen, R. L., Malik, F., and Wolff, A. A. (2012) Safety, tolerability and pharmacodynamics of a skeletal muscle activator in amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler.*, **13**, 430-438, <https://doi.org/10.3109/17482968.2012.684214>.
197. Shefner, J. M., Watson, M. L., Meng, L., and Wolff, A. A. (2013) A study to evaluate safety and tolerability of repeated doses of tirasemtiv in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **14**, 574-581, <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.822517>.
198. Shefner, J. M., Wolff, A. A., and Meng, L. (2013) The relationship between tirasemtiv serum concentration and functional outcomes in patients with ALS, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **14**, 582-585, <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.817587>.
199. Shefner, J. M., Wolff, A. A., Meng, L., Bian, A., Lee, J., Barragan, D., and Andrews, J. A. (2016) A randomized, placebo-controlled, double-blind phase IIb trial evaluating the safety and efficacy of tirasemtiv in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **17**, 426-435, <https://doi.org/10.3109/21678421.2016.1148169>.
200. Sanders, D. B., Rosenfeld, J., Dimachkie, M. M., Meng, L., and Malik, F. I. (2015) A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial to evaluate efficacy, safety, and tolerability of single doses of tirasemtiv in patients with acetylcholine receptor-binding antibody-positive myasthenia gravis, *Neurotherapeutics*, **12**, 455-460, <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0345-y>.
201. Andrews, J. A., Cudkowicz, M. E., Hardiman, O., Meng, L., Bian, A., Lee, J., Wolff, A. A., Malik, F. I., and Shefner, J. M. (2018) VITALITY-ALS, a phase III trial of tirasemtiv, a selective fast skeletal muscle troponin activator, as a potential treatment for patients with amyotrophic lateral sclerosis: study design and baseline characteristics, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **19**, 259-266, <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1426770>.
202. Shefner, J. M., Cudkowicz, M. E., Hardiman, O., Cockcroft, B. M., Lee, J. H., Malik, F. I., Meng, L., Rudnicki, S. A., Wolff, A. A., and Andrews, J. A. (2019) A phase III trial of tirasemtiv as a potential treatment for amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **0**, 1-11, <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1612922>.
203. Hwee, D. T., Kennedy, A. R., Hartman, J. J., Ryans, J., Durham, N., Malik, F. I., and Jasper, J. R. (2015) The small-molecule fast skeletal troponin activator, CK-2127107, improves exercise tolerance in a rat model of heart failure, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **353**, 159-168, <https://doi.org/10.1124/jpet.114.222224>.
204. Andrews, J. A., Miller, T. M., Vijayakumar, V., Stoltz, R., James, J. K., Meng, L., Wolff, A. A., and Malik, F. I. (2018) CK-2127107 amplifies skeletal muscle response to nerve activation in humans, *Muscle Nerve*, **57**, 729-734, <https://doi.org/10.1002/mus.26017>.
205. Cheng, A. J., Hwee, D. T., Kim, L. H., Durham, N., Yang, H. T., Hinken, A. C., Kennedy, A. R., Terjung, R. L., Jasper, J. R., Malik, F. I., and Westerblad, H. (2019) Fast skeletal muscle troponin activator CK-2066260 increases fatigue resistance by reducing the energetic cost of muscle contraction, *J. Physiol.*, **597**, 4615-4625, <https://doi.org/10.1113/jp278235>.
206. Shefner, J. M., Andrews, J. A., Genge, A., Jackson, C., Lechtzin, N., Miller, T. M., Cockcroft, B. M., Meng, L., Wei, J., Wolff, A. A., Malik, F. I., Bodkin, C., Brooks, B. R., Caress, J., Dionne, A., Fee, D., Goutman, S. A., Goyal, N. A., Hardiman, O., Hayat, G., et al. (2021) A phase 2, double-blind, randomized, dose-ranging trial of reldesemtiv in patients with ALS, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **22**, 287-299, <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1822410>.
207. Collibee, S. E., Bergnes, G., Chuang, C., Ashcraft, L., Gardina, J., Garard, M., Jamison, C. R., Lu, K., Lu, P. P., Muci, A., Romero, A., Valkevich, E., Wang, W., Warrington, J., Yao, B., Durham, N., Hartman, J., Marquez, A.,

- Hinken, A., Schaletzky, J., et al. (2021) Discovery of reldesemtiv, a fast skeletal muscle troponin activator for the treatment of impaired muscle function, *J. Med. Chem.*, **64**, 14930-14941, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01067>.
208. Issahaku, A. R., Ibrahim, M. A. A., Mukelabai, N., and Soliman, M. E. S. (2023) Intermolecular and dynamic investigation of the mechanism of action of reldesemtiv on fast skeletal muscle troponin complex toward the treatment of impaired muscle function, *Protein J.*, **42**, 263-275, <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10091-y>.
209. Rudnicki, S. A., Andrews, J. A., Duong, T., Cockcroft, B. M., Malik, F. I., Meng, L., Wei, J., Wolff, A. A., Genge, A., Johnson, N. E., Tesi-Rocha, C., Connolly, A. M., Darras, B. T., Felice, K., Finkel, R. S., Shieh, P. B., Mah, J. K., Statland, J., Campbell, C., Habib, A. A., et al. (2021) Reldesemtiv in patients with spinal muscular atrophy: a phase 2 hypothesis-generating study, *Neurotherapeutics*, **18**, 1127-1136, <https://doi.org/10.1007/s13311-020-01004-3>.
210. Shefner, J. M., Al-Chalabi, A., Andrews, J. A., Chio, A., De Carvalho, M., Cockcroft, B. M., Corcia, P., Couratier, P., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Hardiman, O., Heiman-Patterson, T., Henderson, R. D., Ingre, C., Jackson, C. E., Johnston, W., Lechtzin, N., Ludolph, A., Maragakis, N. J., Miller, T. M., et al. (2023) COURAGE-ALS: a randomized, double-blind phase 3 study designed to improve participant experience and increase the probability of success, *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **24**, 523-534, <https://doi.org/10.1080/21678421.2023.2216223>.
211. Robertson, I. M., Baryshnikova, O. K., Li, M. X., and Sykes, B. D. (2008) Defining the binding site of levosimendan and its analogues in a regulatory cardiac troponin C-troponin I complex, *Biochemistry*, **47**, 7485-7495, <https://doi.org/10.1021/bi800438k>.
212. Thompson, B. R., Martindale, J., and Metzger, J. M. (2016) Sarcomere neutralization in inherited cardiomyopathy: small-molecule proof-of-concept to correct hyper-Ca²⁺-sensitive myofilaments, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **311**, H36-43, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00981.2015>.
213. Cai, F., Hwang, P. M., and Sykes, B. D. (2018) Structural changes induced by the binding of the calcium desensitizer w7 to cardiac troponin, *Biochemistry*, **57**, 6461-6469, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00882>.
214. Adhikari, B. B., and Wang, K. (2004) Interplay of troponin- and myosin-based pathways of calcium activation in skeletal and cardiac muscle: the use of W7 as an inhibitor of thin filament activation, *Biophys. J.*, **86**, 359-370, [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74112-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74112-0).

TROPONINS AND SKELETAL MUSCLE PATHOLOGIES

Review

A. P. Bogomolova^{1,2*} and I. A. Katrukha^{1,2}

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

² Hytest Ltd., Turku, Finland; e-mail: bogomolova.agnessa@yandex.ru

Skeletal muscles account for ~30-40% of the total weight of human body and are responsible for its most important functions, including movement, respiration, thermogenesis, and glucose and protein metabolism. Skeletal muscle damage negatively impacts the whole-body functioning, leading to deterioration of the quality of life and, in severe cases, death. Therefore, timely diagnosis and therapy for skeletal muscle dysfunction are important goals of modern medicine. In this review, we focused on the skeletal troponins that are proteins in the thin filaments of muscle fibers. Skeletal troponins play a key role in regulation of muscle contraction. Biochemical properties of these proteins and their use as biomarkers of skeletal muscle damage are described in this review. One of the most convenient and sensitive methods of protein biomarker measurement in biological liquids is immunochemical analysis; hence, we examined the factors that influence immunochemical detection of skeletal troponins and should be considered when developing diagnostic test systems. Also, we reviewed the available data on the skeletal troponin mutations that are considered to be associated with pathologies leading to the development of diseases and discussed utilization of troponins as drug targets for treatment of the skeletal muscle disorders.

Keywords: skeletal muscle, troponin, ageing, myopathy, biomarker, monoclonal antibodies