

# EF 手图像超家族成员——肌钙蛋白 C 的研究进展 The Research Progress of One Member of the EF-hand Superfamily ——Troponin C

陈剑清, 张耀洲\*

CHEN Jian-Qing and ZHANG Yao-Zhou\*

浙江理工大学生物化学研究所, 杭州 310018

*Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China*

**摘 要** EF 手图像超家族蛋白泛指一类含有由螺旋区-泡区-螺旋区构成的 EF 手图像模体的蛋白。这类蛋白通常都具有金属离子结合能力或者形成二聚体的能力。肌钙蛋白 C 是一种 EF 手图像蛋白,它具有钙离子结合能力,可以与肌钙蛋白 I、肌钙蛋白 T 形成复合物调节肌肉收缩。目前,国内外对肌钙蛋白 C 的研究多数集中在脊椎动物上,而对无脊椎动物的研究较少。主要从 EF 手图像超家族的特性及其家族成员——肌钙蛋白 C 的分类、结构及功能等方面进行了阐述,并结合笔者自身的研究方向,简要介绍了家蚕肌钙蛋白 C 的研究情况及前景。

**关键词** EF 手图像, 肌钙蛋白 C,  $Ca^{2+}$  调节, 肌肉收缩, 家蚕

中图分类号 Q593.3 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0375-06

**Abstract** The EF-hand superfamily is a large group of proteins which contain EF-hand motif formed by helix-loop-helix. These proteins always have the ability of binding metal ions or forming dimers. Troponin C, known as having ability of binding  $Ca^{2+}$ , is one member of the EF-hand superfamily. Troponin C interacts with troponin I and troponin T, forming a troponin complex which takes part in regulating muscle contraction. It is interesting that troponin C was also found in non-muscular tissue, and its function was proved to be different from that of troponin C found in muscular tissue. To date, a lot of researches about troponin C have been carried out widely. However, most of them focused on vertebrate, seldom were done on invertebrate. Our group carried out a research on troponin C from silkworm, a model organism of insects, aiming to clarify the structure and function of silkworm troponin C. Here, we mainly discuss the characters of the EF-hand superfamily and the classification, structure and function of troponin C. We also introduced our work about silkworm troponin C briefly, hoping of making a little contribution to the research of invertebrate troponin C.

**Key words** EF-hand, troponin C,  $Ca^{2+}$  regulating, muscle contraction, silkworm

$Ca^{2+}$  信号传导是细胞中最广泛存在的信号传导机制中的一种,一般由 EF 手图像(EF-hand)蛋白参与执行<sup>[1]</sup>。肌钙蛋白 C(troponin C, TnC)作为 EF 手

图像超家族的成员,也同样参与了细胞内的  $Ca^{2+}$  信号传导。

肌钙蛋白 C 是一种钙离子结合蛋白,它可以与

Received: November 1, 2006; Accepted: December 4, 2006.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2005AA206120), and the National Basic Research Program of China (No. 2005CB121006).

\* Corresponding author. Tel: +86-571-86843198; Fax: +86-571-86843198; E-mail: yaozhou@chinagene.com

国家高新技术研究与发展(863)项目(No.2005AA206120)和国家 973 项目(No.2005CB121006)资助  
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

肌钙蛋白 I (Troponin I, TnI)、肌钙蛋白 T (Troponin T, TnT) 形成复合物, 并对横纹肌的收缩起到  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的调节作用。肌钙蛋白 C 在肌肉收缩过程中的作用主要体现在它与  $\text{Ca}^{2+}$  结合或解离之后, 能够调节肌钙蛋白其它两个亚基 TnT、TnI 及收缩系统其它组分间的相互作用。

肌钙蛋白 C 除了可以调节肌肉收缩之外, 它还具有其它方面的功能。随着研究的不断深入, 肌钙蛋白 C 更多的功能将不断被发现。

## 1 EF 手图像超家族

### 1.1 EF 手图像的结构

EF 手图像是一种由螺旋区-泡区-螺旋区 (HLH) 构成的  $\text{Ca}^{2+}$  结合模体 (motif), 通常成对出现 (图 1)。EF 手图像模体在结合  $\text{Ca}^{2+}$  之后会发生较大的构象改变。

Sequence of parvalbumin  
 1-35 AFAGVLDADIAAALAEACKAADSFNHKAFFAKVGL  
 36-70 TSKSADDVVKKAFAIDQDKSFGIEDELKLFQNF  
 71-108 KADARALTDGETKTFCLKAGDSDGDGKIGVDEFTALVKA  
 EF-hand motif of underline sequence

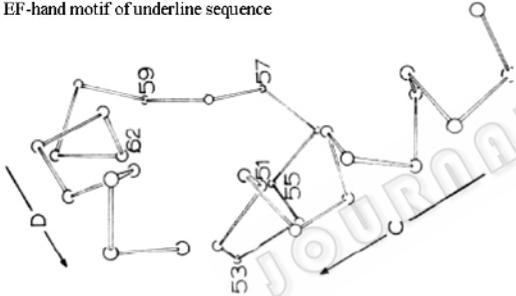


图 1 鲤鱼小清蛋白 (parvalbumin) 的氨基酸序列及 EF 手图像模体<sup>[2]</sup>

Fig. 1 Sequence and EF-hand motif of parvalbumin from carp muscle<sup>[2]</sup>

### 1.2 EF 手图像蛋白的分类

EF 手图像超家族成员泛指所有的含有 EF 手图像模体的蛋白。该超家族蛋白按其功能可分为两种类型: 信号蛋白与缓冲/转运蛋白。信号蛋白是该家族中最大的一类, 它包括钙调蛋白、肌钙蛋白 C 及 S100B 等大家所熟知的家族成员。这些蛋白都会发生典型的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的构象改变, 进而暴露靶结合位点。而缓冲/转运蛋白不会发生  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的构象改变, 钙结合蛋白 D9K 就属于这种类型。

### 1.3 EF 手图像亚家族

在 EF 手图像超家族中, 有一个 S100 亚家族, 它是一类跟疾病相关的蛋白。S100 蛋白只存在于脊椎动物中, 具有胞内、胞外调节活性<sup>[3]</sup>。S100 亚家族成员在细胞内可形成反平行的二聚体结构, 进而以

$\text{Ca}^{2+}$  依赖 (有时不依赖  $\text{Ca}^{2+}$ ) 的方式将细胞内的两个同种或异种的靶蛋白功能性地桥联起来。S100 蛋白的胞内活性主要体现在蛋白的磷酸化、细胞增殖 (包括瘤性转化) 与分化、细胞骨架的形成、膜的形成、胞内  $\text{Ca}^{2+}$  平衡及防止细胞氧化损伤等方面。而 S100 蛋白的胞外活性主要体现在促进神经元存活或分化、星形胶质细胞增殖, 通过凋亡引发神经元死亡以及刺激或抑制炎症细胞的活性等方面。

在 EF 手图像超家族中, 还有另外一类含有 Eps15 同源 (Eps15 Homologue, EH) 结构域的蛋白, 它在细胞内吞、膜泡运输及信号传导过程中发挥作用。这类蛋白同样也含有一对 EF 手图像模体, 其中一个结合  $\text{Ca}^{2+}$ , 而另一个可能并不结合。这类蛋白中的 EF 手图像模体上的残基可形成一个疏水结合口袋, 进而与含有 NPF、SWG、H[TS]F 模体的蛋白结合。

此外, 在 Lin<sup>[4]</sup> 及 Blanchard 等人<sup>[5]</sup> 的研究中发现, calpain 的 N 端存在第五个 EF 手图像模体, 这类蛋白也因而被归类为 Penta-EF 手图像 (PEF) 亚家族。它拥有两类不同性质的 EF 手图像模体: 一种可结合  $\text{Ca}^{2+}$ , 另一种不结合  $\text{Ca}^{2+}$ , 但可用于形成二聚体。虽然 PEF 亚家族成员的 N 端的氨基酸序列及长度都不尽相同, 但它们同样都富含甘氨酸和疏水性氨基酸残基<sup>[6]</sup>。

## 2 肌钙蛋白 C

### 2.1 TnC 的进化分析

肌钙蛋白 C 由四个 EF 手图像模体构成, 是 EF 手图像超家族中的一员。它作为肌钙蛋白复合体中的  $\text{Ca}^{2+}$  结合亚基, 是最早发现并明确其生理功能的一种  $\text{Ca}^{2+}$  调节蛋白。随着生物的进化, 各物种中 TnC 的氨基酸序列已不尽相同, 即使在同一物种中也出现了 TnC 的不同亚型。为了弄清该蛋白的进化情况, 我们从 NCBI 数据库中调取了所有的 TnC 的氨基酸序列, 并就其中的 116 个 TnC 序列进行了分析 (图 2)。分析结果发现, TnC 在其进化过程中保留了 EF 手图像模体, 尤其是泡区的 12 个氨基酸序列 (DXDXDX<sub>6</sub>E) 具有高度保守性。从图中不难看出, 该蛋白主要沿着脊椎动物与无脊椎动物两个分支进化, 这也成为该蛋白的分类依据之一。

### 2.2 TnC 的分类

目前研究认为, TnC 在脊椎动物中存在两种亚型, 一种存在于快速骨骼肌中, 称为骨骼肌肌钙蛋白 C (fast skeletal muscular troponin C, TnC<sub>f</sub>), 而另一种

存在于慢速骨骼肌或心肌中,称为心肌肌钙蛋白 C (slow skeleton/cardiac muscular troponin C, cTnC),而在无脊椎动物及昆虫中,肌钙蛋白 C 也存在多种亚

型,但分类并不明确。目前,在果蝇、按蚊中已发现 TnC 的多种亚型,其中果蝇中已鉴定的亚型有 TnC41C、TnC47D 及 TnC73F<sup>[7]</sup>。

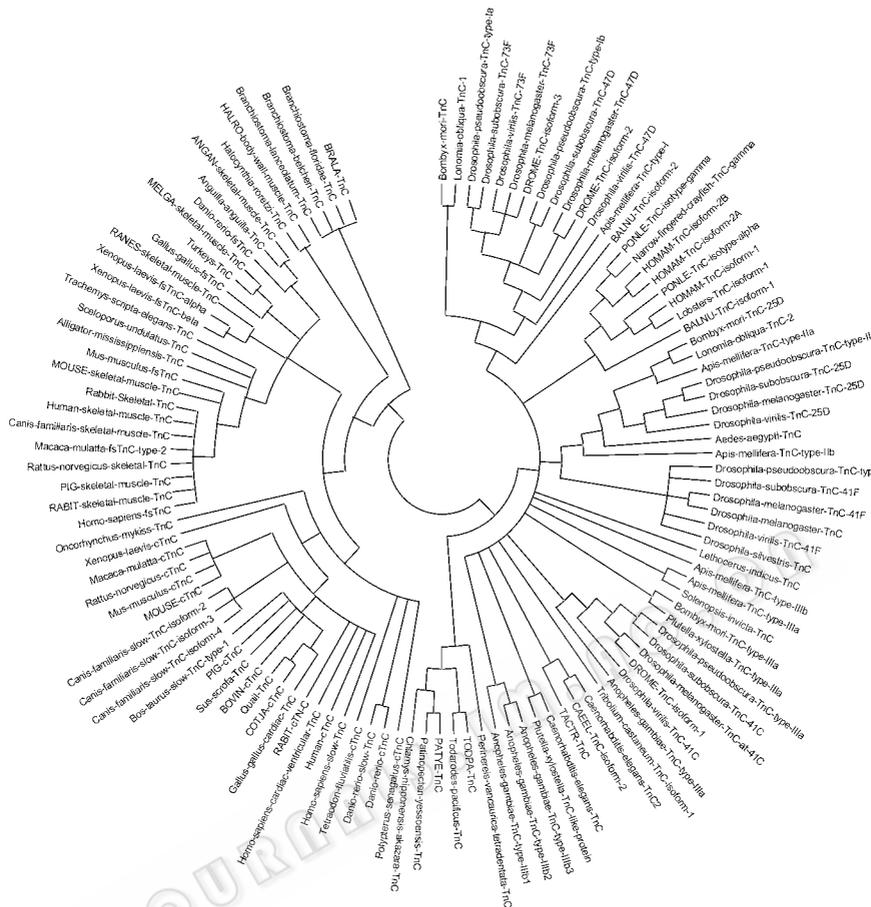


图 2 TnC 的进化树  
Fig. 2 The phylogeny of TnC

2.3 TnC 的结构

2.3.1 脊椎动物 TnC 的结构:从脊椎动物的 sTnC 的晶体结构可以看出,该分子是由一个中间螺旋连接的两个球形区域构成。而两个球形区域又分别由两个 EF 手图像模体构成,可以结合金属离子。根据金属离子结合属性的差异,我们将这四个 EF 手图像模体分为两种类型:一种位于 C 端,具有较高的亲和性,既可以跟 Ca<sup>2+</sup> 结合,又可以与 Mg<sup>2+</sup> 结合,称为 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> 位点;另一种位于 N 端,具有较低的亲和性,只能与 Ca<sup>2+</sup> 结合,称为 Ca<sup>2+</sup> 特异位点。Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> 位点虽然在结合 Ca<sup>2+</sup> 或 Mg<sup>2+</sup> 之后会发生较大的构象变化,但它并不具有明显的调节肌肉收缩的功能。然而,大量的证据表明,仅仅 Ca<sup>2+</sup> 特异位点就可以传递 Ca<sup>2+</sup> 信号,与肌钙蛋白的其它亚基形成 Ca<sup>2+</sup> 依赖性的互作,调节肌肉收缩。因此,我们也可以将肌钙蛋白 C 看作是一个 C 端为结构区域,N 端为调节区域的哑铃形结构<sup>[8]</sup>。

在 sTnC 中有四个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点:C 端、N 端各有两个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点。而在 cTnC (如人的 cTnC,图 3)中,由于 Ca<sup>2+</sup> 结合位点 I 的序列发生改变,致使其失去 Ca<sup>2+</sup> 结合能力,从而使其 N 端只含有一个低亲和性的 Ca<sup>2+</sup> 结合位点<sup>[9]</sup>。因此,在心肌组织中,Ca<sup>2+</sup> 只结合于位点 II 上,从而调节肌肉的收缩。

2.3.2 无脊椎动物 TnC 的结构:无脊椎动物的 TnC 氨基酸序列中通常存在四个潜在的可结合 Ca<sup>2+</sup> 的 EF 手图像模体。但是,由于这些 TnC 中某些模体上的 Ca<sup>2+</sup> 结合所必需的氨基酸残基发生突变,使得其失去两个甚至更多的 Ca<sup>2+</sup> 结合位点<sup>[7]</sup>。

东半球马蹄型蟹 (*Tachypleus tridentatus*)<sup>[12]</sup> 肌肉组织中的 TnC 的 Ca<sup>2+</sup> 结合位点 I 上的某些氨基酸残基被取代,从而使其失去了 Ca<sup>2+</sup> 结合能力。蜆蛄 (*Astacus lepodactylus*)<sup>[13-14]</sup> 和龙虾 (*Homarus americanus*)<sup>[15]</sup> 肌肉组织中的 TnC 都只在位点 II 和位点 III 上结合 Ca<sup>2+</sup>,而软体动物的 TnC 通常只在位

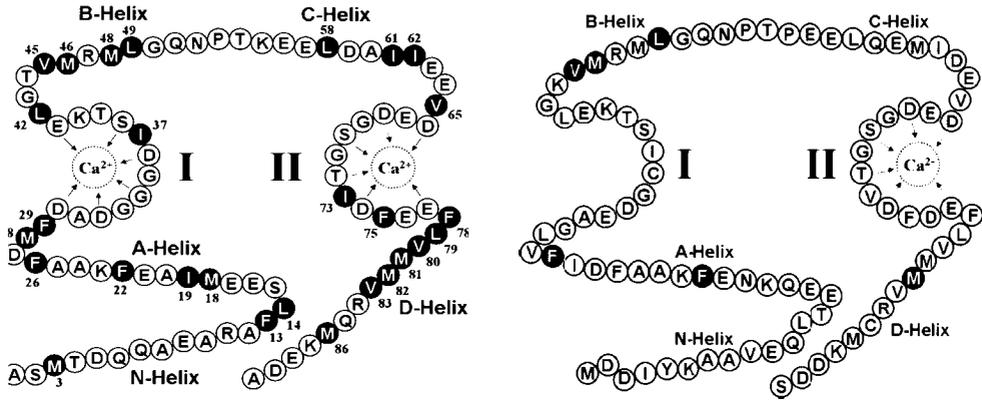


图3 人的 cTnC 与鸡的 sTnC 中 Ca<sup>2+</sup> 结合位点的比较. 左图: 鸡的 sTnC<sup>[10]</sup>; 右图: 人的 cTnC<sup>[11]</sup>  
 Fig. 3 Comparison of the Ca<sup>2+</sup> binding site I of chicken sTnC (left)<sup>[10]</sup> to that of human cTnC (right)<sup>[11]</sup>

点 IV 上结合 Ca<sup>2+</sup>, 而且这个位点属于 Ca<sup>2+</sup> 特异性结合位点。

### 2.4 TnC 的生物学功能

**2.4.1 TnC 在肌肉组织中的作用** 肌钙蛋白 C 通过调节肌肉收缩发挥着重要而广泛的作用。由于肌钙蛋白 C 分为两种亚型, 这也决定了它们在调节肌肉收缩发挥功能时存在两种不同的生物学功能。sTnC 通过调节肌肉收缩调节着动物的一切行为活动, 而 cTnC 主要是通过调节心机的收缩来调节心脏的收缩, 与生命的持续密切相关。在早期的心肌疾病诊断中, 心肌中 TnC 的含量高低被作为评价心肌受损程度的一种标志, 这更加说明了心肌中的 TnC 对心肌正常发挥功能的作用。

肌钙蛋白 C 作为肌钙蛋白复合物中的一个 Ca<sup>2+</sup> 结合亚基, 需要与 TnI、TnT 共同作用, 调节肌肉收缩。TnI 是肌原纤维 ATP 酶的抑制亚基, 它可抑制肌球蛋白与肌动蛋白的偶联, 松弛骨骼肌或心肌。TnT 是原肌球蛋白的结合亚基, 它将 TnC 和 TnI 连接到肌动蛋白和原肌球蛋白上, 从而在肌纤维收缩和舒张过程中发挥中介作用。

TnC 与 TnT、TnI 结合成肌钙蛋白复合物(T<sub>n</sub>), 然后再与原肌球蛋白(T<sub>m</sub>)一起构成 T<sub>m</sub>-T<sub>n</sub> 复合体, 调节肌肉收缩与舒张的力量和速度。T<sub>m</sub>-T<sub>n</sub> 复合体位于横纹肌的细肌丝和心肌细胞的细肌丝上(图 4)。从图中我们可以看出, 肌原纤维由肌小节构成, 每个肌小节又由粗丝与细丝构成, 而 T<sub>m</sub>-T<sub>n</sub> 复合体就位于细丝上。

T<sub>m</sub>-T<sub>n</sub> 复合体对肌肉收缩的调节作用需在 Ca<sup>2+</sup> 的诱导下进行。当肌浆中的 Ca<sup>2+</sup> 浓度较低时, TnC 的 N 端处于无 Ca<sup>2+</sup> 状态, 使其与 TnI 的结合能力减弱, 无法解除 TnI 对肌动球蛋白 ATP 酶的抑制, 从而使肌肉处于舒张状态。当肌浆中的 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高

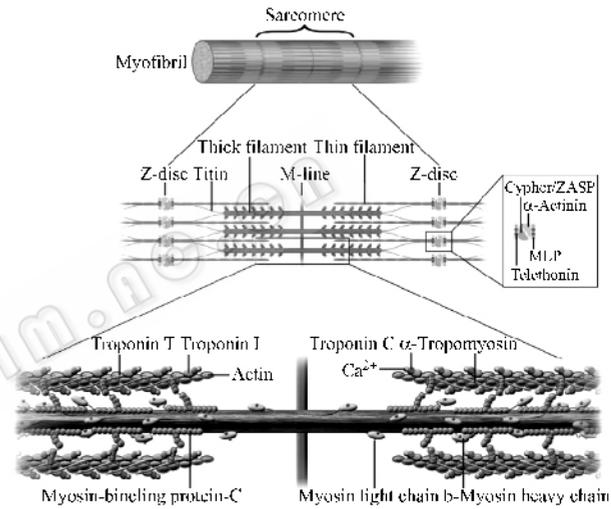


图 4 肌原纤维的结构<sup>[16]</sup>

Fig. 4 Structure of myofibril<sup>[16]</sup>

时, Ca<sup>2+</sup> 结合到 TnC 上, 并使后者发生构象改变, 从而使 TnC 与 TnI、TnT 的结合能力增强, TnI 与肌动蛋白的结合能力减弱并与其脱离, 变成应力状态(图 5)。同时, TnT 使原肌球蛋白移动到肌动蛋白双螺旋沟的深处, 消除肌动蛋白与肌球蛋白结合的障碍, 肌球蛋白头部结合到邻近的肌动蛋白上, 这一结合引起肌球蛋白头部 ATP 酶的活化, 释放 ADP、Pi 和能量, 从而使肌球蛋白头部弯曲, 导致了细丝和粗丝之间的滑动。弯曲后的肌球蛋白头部又结合 ATP, 从而与肌动蛋白分开恢复原来的构象, 这就是肌肉收缩的一个循环。

**2.4.2 TnC 在非肌肉组织中的作用** 早在 1978 年, Pollard 等人<sup>[18]</sup>就发现, TnC、TnI 等参与肌肉收缩功能的蛋白不仅存在于肌肉组织中, 而且还存在于非肌肉组织(如软骨)中。在非肌肉组织中无需调节肌肉收缩, 这也许暗示着 TnC、TnI 除了具有调节肌肉收缩功能外还有其它功能。Moses 等人<sup>[19]</sup>开创了这

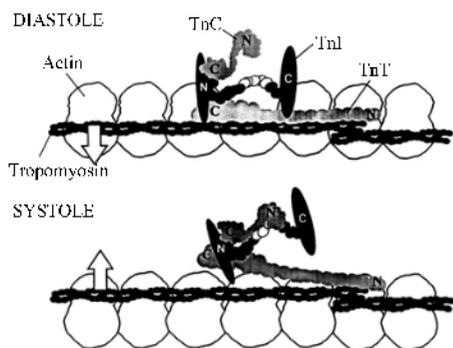


图 5 肌肉舒张 (diastole) 收缩 (systole) 时肌丝蛋白构象的变化<sup>[17]</sup>

Fig. 5 Structure changes in thin filament during diastole and systole<sup>[17]</sup>

一领域的先河,他们的研究证实了 TnI 也存在于人的软骨中,并可抑制血管生成及肿瘤转移。另有研究发现,TnI 在抑制血管内皮细胞增殖过程中需与受体结合发挥作用<sup>[20]</sup>。

随着研究人员对 TnI 在非肌肉组织中功能研究的深入,TnI 在非肌肉组织中的功能也开始引起人们的重视。国内有研究报道称,重组人 TnI 对人体静脉内皮细胞增长成剂量依赖性关系,对小鼠异位抑制肿瘤也成剂量依赖性关系<sup>[21]</sup>。这也就表明 TnI 能够抑制血管内皮细胞的生长,并且具备一定的抗肿瘤作用。但是,人们对 TnI 发挥该功能的作用机制还不清楚,有待进一步研究。

## 2.5 TnC 的研究现状及展望

近年来,国内对肌钙蛋白 C 的研究主要集中在两个方面:一方面研究 TnI 与二价金属离子的结合属性,另一方面研究钙增敏剂对 cTnI 的作用。张毅等人<sup>[22]</sup>研究过羟苯氨酮对 cTnI 与  $Ca^{2+}$  亲和力的影响,认为羟苯氨酮作为钙增敏剂可直接增加 cTnI 与  $Ca^{2+}$  的亲合力。除此之外,在国内最新的一篇文章中,刘先俊等人<sup>[21]</sup>报道了重组人骨骼肌 TnI 的抗肿瘤作用,这可能成为 TnI 功能研究的新起点。

在国外,多数的研究都集中在对 TnI 突变体<sup>[10,11]</sup>及 TnI 嵌合体<sup>[23,24]</sup>的研究,进而了解 TnI 与  $Ca^{2+}$  的结合特性及其与其它蛋白之间的互作机制。Bret 等人<sup>[25]</sup>的研究认为,心肌肌钙蛋白 C 在与心肌肌钙蛋白 I 结合后会引发前者构象及结构灵活性的改变。Tharin 等人<sup>[26]</sup>的研究发现,在肌钙蛋白复合体中肌钙蛋白 C 的调节区域的灵活性具有  $Ca^{2+}$  依赖性。Ye 等人<sup>[27]</sup>将单个 EF 手图像模体上的  $Ca^{2+}$  结合环嵌入一种脚手架蛋白的不同位点,进而研究单个 EF 手图像模体的  $Ca^{2+}$  亲合力。

可见,到目前为止,国内外对 TnI 的研究都只

停留在对脊椎动物的研究。相比之下,人们对无脊椎动物 TnI 的研究相对较少。虽然在果蝇中已经鉴定出三种 TnI,但我们还无法确定它的  $Ca^{2+}$  结合位点<sup>[28]</sup>。迄今为止,人们已经克隆到 TnI 基因的无脊椎动物有蜗牛、扇贝、乌贼、线虫、蜃、龙虾、蝾螈、蚂蚁、果蝇等<sup>[29]</sup>。这些基因的克隆为今后研究无脊椎动物 TnI 的功能打下坚实的基础。

然而,在另外一种模式生物——家蚕中,关于 TnI 的研究仍是一个空白。我们的研究就是要以家蚕为材料,克隆出家蚕 TnI 基因的各种亚型,并确定各亚型的组织分布情况,进而推测它们的不同功能。另外,由于家蚕在它一生中变态发育较为迅速,我们通过分析 TnI 基因在其发育过程中的表达情况,进而推测 TnI 与家蚕生长发育的关系。

此外,TnI 在肌肉组织中的作用已比较明确,而其在非肌肉组织中的作用却鲜有研究。文中提到过 TnI 能够抑制血管内皮细胞的生长,并具有抗肿瘤作用。为此,找到 TnI 在非肌肉组织(特别是软骨组织)中可能存在的受体并对其进行研究将具有重大意义。我们也试图寻找家蚕非肌肉组织中的 TnI,希望能为抗肿瘤研究做出一点贡献。

就目前的研究所知,肌钙蛋白 C 主要具有调节肌肉收缩、抑制血管生成、抑制肿瘤转移等功能,具有潜在的生物工程应用价值。由于 TnI 在心肌收缩过程中具有重要地位,而且还与某些心血管疾病相关,因此它在心血管疾病的诊断方面有一定的应用前景。另外,人们发现动物软骨是恶性肿瘤的低发部位之一,还陆续从软骨组织中分离出 U-995、TnI、SCAIF-1 等多种血管生成抑制剂,并发现其血管生成抑制活性明显高于内皮抑制素(endostatin)、血管抑制素(angiostatin)等<sup>[19,30,31]</sup>。因而,动物软骨如鲨鱼软骨已成为人类抵抗恶性肿瘤的重要武器之一。与 TnI 相似,TnI 也同样存在于动物软骨中,并具有一定的抗肿瘤作用<sup>[21,32]</sup>。此外,沈传陆<sup>[33]</sup>的研究也表明,TnI 能特异的结合癌基因 TRE17,从而抑制癌症的发生。因此,如何从动物软骨中提取 TnI 并将其作为抗肿瘤的天然药物,将是 TnI 在生物工程领域的重要应用。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Capozzi F, Casadei F, Luchinat C. EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *J Biol Inorg Chem* 2006, **11**: 949-962.
- [2] Kretsinger RH, Nockolds CE. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol*

- [ 3 ] Fritz G, Mittl PR, Vasak M, *et al.* The crystal structure of metal-free human EF-hand protein S100A3 at 1.7-resolution. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 33092 – 33098.
- [ 4 ] Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, *et al.* Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**: 539 – 547.
- [ 5 ] Blanchard H, Grochulski P, Li Y, *et al.* Structure of a calpain  $Ca^{2+}$ -binding domain reveals a novel EF-hand and  $Ca^{2+}$ -induced conformational changes. *Nat Struct Biol*, 1997, **4**: 532 – 538.
- [ 6 ] Lollike K, Johnsen AH, Durussel I, *et al.* Biochemical characterization of the penta-EF-hand protein grancalcin and identification of L-plastin as a binding partner. *J Biol Chem*, 2001, **276**( 21 ): 17762 – 17769.
- [ 7 ] Qiu F, Lakey A, Agianian B, *et al.* Troponin C in different insect muscle types: identification of two isoforms in *Lethocerus*, *Drosophila* and *Anopheles* that are specific to asynchronous flight muscle in the adult insect. *Biochem J*, 2003, **371**: 811 – 821.
- [ 8 ] Zot HG, Potter JD. A structural role for the  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  sites on troponin C in the regulation of muscle contraction: Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J Biol Chem*, 1982, **257**( 13 ): 7678 – 7683.
- [ 9 ] Johnson JD, Collins JH, Robertson SP, *et al.* A fluorescent probe study of  $Ca^{2+}$ -binding to the  $Ca^{2+}$  specific sites of cardiac troponin and troponin C. *J Biol Chem*, 1980, **225**: 9635 – 9640.
- [ 10 ] Davis JP, Rall JA, Alionte C, *et al.* Mutations of hydrophobic residues in the N-terminal domain of troponin C affect calcium binding and exchange with the troponin C-troponin I96 148 complex and muscle force production. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 17348 – 17360.
- [ 11 ] Tikunova SB, Davis JP. Designing calcium-sensitizing mutations in the regulatory domain of cardiac troponin C. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 35341 – 35352.
- [ 12 ] Kobayashi T, Kagami O, Takagi T, *et al.* Amino acid sequence of horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*, striated muscle troponin C. *J Biochem (Tokyo)*, 1989, **105**: 823 – 828.
- [ 13 ] Kobayashi T, Takagi T, Konishi K, *et al.* Amino acid sequences of the two major isoforms of troponin C from crayfish. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 18247 – 18259.
- [ 14 ] Wnuk W. Resolution and calcium-binding properties of the two major isoforms of troponin C from crayfish. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 18240 – 18246.
- [ 15 ] Garone L, Theibert JL, Miegel A, *et al.* Lobster troponin C: amino acid sequences of three isoforms. *Arch Biochem Biophys*, 1991, **291**: 89 – 91.
- [ 16 ] Morita H, Seidman J, Seidman CE. Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest*, 2005, **115**( 3 ): 518 – 526.
- [ 17 ] Solaro RJ, Rarick HM and tropomyosin proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Rarick Circulation Research*, 1998, **83**: 471 – 480.
- [ 18 ] Pollard TD, Stafford WF, Porter ME. Characterization of a second myosin from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem*, 1978, **253**: 4798 – 4808.
- [ 19 ] Moses MA, Wiederschain D, Wu I, *et al.* Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 2645 – 2650.
- [ 20 ] Feldman L, Rouleau C. Troponin I inhibits capillary endothelial cell proliferation by interaction with the cell's bFGF receptor. *Microvasc Res*, 2002, **63**: 41 – 49.
- [ 21 ] Liu XJ(刘先俊), Zhou HY(周辉云), Deng XF(邓显锋). Human TnC expressed in *E. coli* and its effect on anti-tumor. *Acta Biochim Biophys Sin*(中国生物化学与分子生物学报), 2005, **27**( 5 ): 586 – 590.
- [ 22 ] Zhang Y(张毅), Ye YX(叶益新), Qiao XY(乔小英). Effect of oxyphenamone on  $Ca^{2+}$  affinity of cardiac troponin C. *Acta Pharmaceutica Sinica*(药理学报), 1999, **34**( 9 ): 658 – 661.
- [ 23 ] Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, *et al.* Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 5451 – 5454.
- [ 24 ] Newman E, Spratt DE, Mosher J, *et al.* Differential activation of nitric-oxide synthase isozymes by calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 33547 – 33557.
- [ 25 ] Abbott MB, Gaponenko V, Abusamadneh E, *et al.* Regulatory domain conformational exchange and linker region flexibility in cardiac troponin C bound to cardiac troponin I. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 20610 – 20617.
- [ 26 ] Blumenschein TM, Stone DB, Fletterick RJ, *et al.* Calcium-dependent changes in the flexibility of the regulatory domain of troponin C in the troponin complex. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 21924 – 21932.
- [ 27 ] Ye Y, Shealy S, Lee HW, *et al.* A grafting approach to obtain site-specific metal-binding properties of EF-hand proteins. *Protein Eng*, 2003, **16**: 429 – 434.
- [ 28 ] Fyrberg C, Parker H, Hutchison B, *et al.* Drosophila melanogaster genes encoding three troponin-C isoforms and a calmodulin-related protein. *Biochem Genet*, 1994, **32**: 119 – 135.
- [ 29 ] Hooper SL, Thuma JB. Invertebrate muscles: Muscle specific genes and proteins. *Physiol Rev*, 2005, **85**: 1001 – 1060.
- [ 30 ] Sheu JR, Fu CC, Tsai ML, *et al.* Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities. *Anticancer Res*, 1998, **18**: 4435 – 4441.
- [ 31 ] Shen XR(沈先荣), Ji DM(吉冬梅), Jia FX(贾福星), *et al.* Purification and functional characterization of a shark cartilage factor inhibitory to angiogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin*(生物化学与生物物理学报), 2000, **32**: 43 – 48.
- [ 32 ] Berezowsky C, Bag J. Slow troponin C is present in both muscle and nonmuscle cells. *Biochem Cell Biol*, 1992, **70**: 691 – 697.
- [ 33 ] Shen CL(沈传陆). Identification of oncogene TRE17 interaction with troponin C2. *Chinese Journal of Pathophysiology*(中国病理生理杂志), 2005, **21**: 2388 – 239.