

МЕХАНИЗМЫ НОРМАЛЬНОГО И ПАТОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТКАНЕЙ

УДК 612.17.015.378:612.646.08

ПРОТЕОМНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ – МАРКЕРОВ ЭТАПОВ ФОРМИРОВАНИЯ СЕРДЦА У ЧЕЛОВЕКА

© 2017 г. М. А. Ковалева^а, *, Л. И. Ковалев^а, А. В. Иванов^а,
М. В. Серебрякова^б, С. С. Шишкин^б

^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН
119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2

^бМГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 17.03.2016 г.

Окончательный вариант получен 01.11.2016 г.

По результатам протеомных исследований и масс-спектрометрической идентификации белков миокарда человека, проявляющих выраженные количественные изменения в динамике пренатального кардиогенеза, были выявлены изменения уровней экспрессии представителей белков трех семейств: митохондриальных, сократительного аппарата и теплового шока. Комплекс белков митохондрий миокарда человека (на примере α и β изоформ АТФ-синтазы, аконитазы 2, М-субъединицы креатинфосфокиназы и белка теплового шока 60 кДа) в основном заканчивает свое формирование по зрелому типу к 24 нед. развития. Формирование белкового состава сократительных структур миокарда человека (на примере десмина, регуляторной легкой цепи миозина 2, эссенциальной эмбриональной желудочковой изоформы 1, канонического α -тропомиозина 1 и эмбриональной изоформы 6), отражает до 8 недель развития этап начала формирования миофибрилл (замещения эмбриональных изоформ сократительных белков на зрелые, при участии фосфорилированной изоформы белка теплового шока 27 кДа), этап их качественного и количественного структурирования к 20–24 нед. развития и окончательное формирование взрослого фенотипа сократительных структур к двум годам жизни.

Ключевые слова: кардиогенез, белки, масс-спектрометрическая идентификация, человек

DOI: 10.7868/S0475145017050044

ВВЕДЕНИЕ

Онтогенетические изменения, протекающие при формировании органов и тканей человека, сопровождаются закономерными изменениями протеомных профилей. Сравнительно мало таких исследований выполнено на этапах развития сердца человека (Kovalev et al., 1988, 1990; Цветкова и др., 1992; Sasse et al., 1993). Изменения белкового спектра структуры миокарда отражают этапы его формирования как органа и представляют интерес как для решения медицинских задач, так и для изучения особенностей механизмов дифференцировки различных типов мышечных тканей человека и их субфракций. Протеомные исследования расширяют эту информацию (Doran et al., 2007; Ohlendieck, 2011; Staunton et al., 2011, 2012).

По результатам выполненного исследования белковых профилей (начиная с 5–6 нед. развития) при формировании ткани сердца человека мы ранее выявили существенные количественные изменения ряда белков (Цветкова и др., 1992), но в силу малого количества биоматериала

идентификация этих белков в тот момент была невозможна. Создание белковых баз данных и развитие технологий масс-спектрометрии позволило детализировать эту информацию и провести идентификацию соответствующих мажорных фракций, результаты которой представлены ниже.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены результаты идентификации белков миокарда из двумерных электрофореграмм, окрашенных Кумасси голубым R-250, а в гелях образцов, полученных на ранних сроках развития, дополнительно и азотнокислым серебром. Данные электрофореграммы получены ранее при исследовании 95 образцов сердца/желудочков эмбрионов и плодов человека на разных сроках гестации (Цветкова и др., 1992).

Электрофореграммы были дегидратированы в растворе 3% глицерина и 48% этанола, высушены в целлофане и хранились при комнатной температуре более 25 лет, что показало пригодность способа для архивирования такого вида биомате-

риалов и возможность их использования в дальнейшем для масс-спектрометрической идентификации. К настоящему моменту геномы большинства видов живых существ не аннотированы в международных базах данных, но протеомные исследования на таких объектах активно ведутся, и такой способ сохранения информации явно перспективен для дальнейших исследований интересных белков.

Выделение белковых фракций на пластинах ПААГ, гидролиз трипсином и экстракцию пептидов для идентификации белков с помощью времяпролетной масс-спектрометрии на матрице (MALDI-TOF) проводили как описано ранее (Говорун и др., 2003). Образец (0.5 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом раствора 20%-ного ацетонитрила, содержавшего 0.1% трифторуксусной кислоты и 20 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты ("Sigma"), и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF масс-спектрометре Ultraflextreme (Bruker Daltonics Inc., США) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да, используя для калибровки известные пики аутолиза трипсина, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. При выявлении изоформ однотипных белков дополнительно использовалась опция фосфорилирования по серину и треонину. При MS/MS анализе масс-спектры фрагментов регистрировали на масс-спектрометре в тандемном режиме при детекции положительных ионов. Погрешность измерения масс фрагментов не превышала 0.01%. На масс-спектре присутствуют только сигналы С-концевых фрагментов пептида, претерпевших разрыв по пептидной связи (у-ионы).

Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint ("Matrix Science", США). Работа выполнена на оборудовании ЦКП ИНБИ РАН – идентификатор RFMEFI62114X0002. Денситометрия фрагментов двумерных электрофореграмм проводилась после сканирования (Epson Expression 1680 scanner). Полученные цифровые изображения редактировали в графическом редакторе и обсчитывали количественное содержание белков с помощью пакета программ ImageMaster 2D Platinum версии 7 ("GE Healthcare", Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общей чертой раннего кардиомиогенеза у позвоночных является накопление миофибрилл до начала сокращений сердца. У человека этот период заканчивается к концу 3-й недели пренатального развития (Шаров и др., 1988), и миокард как орган начинает функционировать на 3–4 неделе гестации, а к 31 дню развития формируется 4-х

камерное сердце, что подразумевает функциональную зрелость как сократительных, так и энергетических молекулярных структур.

Обзорные двумерные электрофореграммы белков миокарда на различных сроках формирования сердца и данные по наиболее выраженным количественным изменениям отдельных фракций белков (в суммарном гомогенате предсердий/желудочков на ранних этапах у эмбрионов и в ткани желудочков у плодов) были нами представлены ранее (Цветкова и др., 1992).

Результаты проведенной масс-спектрометрической идентификации показали, что в основном меняющиеся белки относятся к представителям трех семейств: митохондриальным белкам, белкам сократительного аппарата и белкам теплового шока (таблица).

На рис. 1 представлена двумерная электрофореграмма белков эмбрионального миокарда человека и результаты компьютерной денситометрии, иллюстрирующие наиболее выраженные количественные изменения в ходе формирования сердца человека.

Для митохондриальных белков было выявлено: β -изоформа АТФ-синтазы в интервале между 5–6 и 7–8 неделями гестации увеличивается взрывообразно, не менее чем на порядок, и явно превышает по относительному количеству ее содержание в зрелой функционирующей ткани миокарда (по сравнению с фракцией α -актина и другими белками домашнего хозяйства миокарда), с дальнейшим постепенным снижением в количестве к соответствующему уровню у взрослых к 24 нед. В тоже время фракция α -изоформы АТФ-синтазы на ранних сроках практически не детектируется, а резкое увеличение ее количества происходит между 16–19 нед. и также выходит на уровень зрелого миокарда к 24 нед. развития. Эти данные показали, что в эмбриогенезе миокарда человека функционально активный комплекс F1 митохондриальной АТФ-синтазы окончательно формируется только к 24 нед. развития, а до этого должен иметь свои особенности в функциональной активности.

Фракции митохондриальной аконитазы 2 и мышечной изоформы креатинфосфокиназы (одни из наиболее количественно представленных в зрелой ткани) демонстрировали только относительное постепенное линейное увеличение количества, стабилизирующееся на зрелом уровне на сроках 21–24 нед.

Митохондриальный белок теплового шока 60 кДа, участвующий в фолдинге и импорте белков в митохондрии, также показал взрывной характер экспрессии гена в интервале между 5–6 и 7–8 неделями гестации (как и β -изоформа АТФ-синтазы), с постепенной нормализацией в коли-

Результаты масс-спектрометрической идентификации белков-маркеров стадий кардиогенеза человека

№	Наименование белка (<i>символ гена</i>)	Номер в NCBI protein	*	**	Мм/рI эксп.	Мм/рI теор.***
1	β -Субъединица митохондриальной АТФ-синтазы (<i>ATP5B</i>)	32189394	338/37	66	51.0/5.00	51.8/5.00
2	α -субъединица митохондриальной АТФ-синтазы (<i>ATP5A1</i>)**** (1)	4757810	294/26	43	55.0/7.0	55.2/8.28
3	Аконитаза 2 митохондриальная (<i>ACO2</i>)	49168620	206/23	39	82.0/6.80	82.4/6.85
4	Креатинфосфокиназа М, субъединица мышечного типа (<i>СКМ</i>)	30582425	224/17	37	43.0/7.01	43.1/6.77
5	Белок теплового шока 60 кДа (<i>HSPD1</i>)	77702086	239/24	46	58.0/5.25	58.0/5.24
6	Легкая цепь миозина 4 (<i>MYL4</i>)	4557038	86/6	32	22.0/4.95	21.6/4.97
7	Легкая цепь миозина 3 (<i>MYL3</i>)	738460	155/21	81	22.0/5.10	21.9/5.03
8	Легкая цепь миозина 2 (<i>MYL2</i>)	21411329	205/19	94	19.0/4.90	18.8/4.92
9	Десмин (<i>DES</i>)	55749932	468/39	62	54.0/5.20	53.4/5.21
10	α -Тропомиозин 1 (<i>TPM1</i>)	63252898	328/31	75	33.0/4.70	32.7/4.69
11	α -Тропомиозин 1 вариант 6 (<i>TPM1</i>)**** (2)	31565806	199/10	36	28.0/4.70	28.4/4.74
12	Белок теплового шока 27 кДа (<i>HSPB1</i>)	4504517	163/13	76	23.0/6.00	22.8/5.98
13	Белок теплового шока 27 кДа (<i>HSPB1</i>)**** (2)	4504517	207/14	78	23.0/5.70	22.8/5.98

* Показатели идентификации – вероятностный коэффициент достоверности/количество выявленных масс пептидов, ** % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами, *** Мм/рI (расчет.) – расчетные оценки, сделанные из данных об аминокислотной последовательности с учетом удаления сигнального пептида, с помощью программы ExPASy Compute pI/Mw tool, **** () – указание на подтверждающую идентификацию количества пептидов тандемной масс-спектрометрией.

честве к соответствующему уровню взрослых к 24 нед.

Полученные результаты продемонстрировали, что комплекс белков митохондриального аппарата миокарда человека в основном заканчивает свое формирование по зрелому типу к 24 нед. развития, а до этого имеет свои особенности в белковом составе и, соответственно, в энергетической функции.

Эти данные хорошо коррелируют с морфологическими исследованиями миокарда человека, согласно которым на этапах кардиогенеза у человека происходит закономерное нарастание степени гетерогенности митохондриального аппарата, при котором значительно увеличивается содержание высокоэнергетических органелл 1-го типа (в ортодоксальной) и 3-го типа (в конденсированной) конфигурациях, отсутствующих до 6 нед. развития (Твердохлеб, 1996), и приближается к зрелому типу к 24 нед. гестации, составляя 75% от общего числа органелл. На 40 нед. их соотношение составляет 83%, и только 17% приходится на “низкоэнергетические” митохондрии (2-го ти-

па). Выявленные нами изменения, очевидно, и отражают данный процесс.

Для белков сократительного аппарата был выявлен ряд разнонаправленных изменений, к которым относились изменения экспрессии генов семейства легких цепей миозина (ЛЦМ), тропомиозина и десмина.

Общие характеристики основных мышечных изоформ ЛЦМ человека и их генов были получены уже к середине 80-х годов XX века; при этом оказалось, что у всех изученных млекопитающих состав и свойства данной группы белков во многом сходны. Результаты ранних структурно-функциональных исследований позволили подразделить ЛЦМ на два семейства: эссенциальные изоформы и регуляторные (фосфорилируемые) изоформы (Barton, Buckingham, 1985; Seidel et al., 1988; Schiaffino, Reggiani, 1996). Функционирующие молекулы миозина всегда включают в своем составе как эссенциальные, так и регуляторные изоформы в соотношении 1 : 1.

В эмбриональном миокарде на 5–6 нед. развития детектировались фракции эмбриональной

(a)

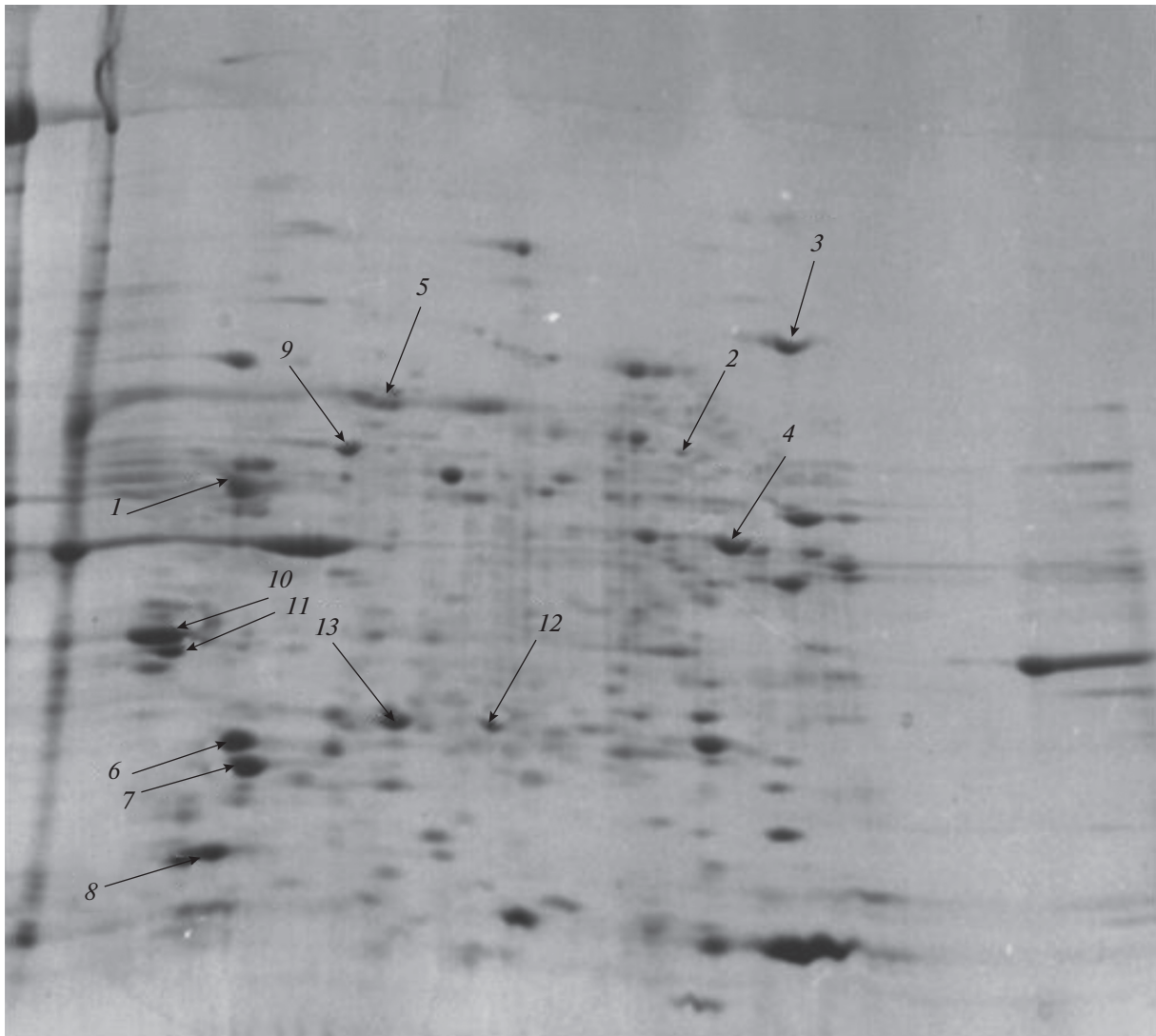


Рис. 1. Двумерная электрофореграмма (a) белков миокарда человека на 8.5 нед. развития. Стрелками с номерами обозначены идентифицированные в соответствии с таблицей белки. Трехмерные модели результатов сравнительной компьютерной денситометрии (б) ряда зон белков, проявляющих наиболее выраженные количественные изменения (семейств митохондриальных, сократительных и белков теплового шока), на этапах кардиогенеза у человека. Левая колонка – ранние этапы, средняя – уровень зрелой ткани, правая – символ гена (нумерация в соответствии с таблицей).

желудочковой/предсердной ЛЦМ 1 (ген *MYL4*) и желудочковой ЛЦМ 3 (ген *MYL3*) в равном количестве (они относятся к семейству эссенциальных изоформ), тогда как продукт гена *MYL2* (регуляторной ЛЦМ 2) на ранних этапах детектировался в явно меньшем количестве (не более 1/3 от должного количества) и взрывообразно выходил на уровень соотношения эссенциальных/регуляторных изоформ ЛЦМ зрелого миокарда к 8 неделе развития, но соотношение эссенциальных/регуляторных изоформ по-прежнему не выдерживало параметров зрелого миокарда, вследствие явно избыточного содержания продукта гена *MYL4*, что показывает возможность существования на ран-

них этапах и до момента выхода на зрелый уровень гибридных молекул миозина, содержащих легкие цепи миозина в вариантах продуктов генов *MYL4/MYL2* и *MYL3/MYL2*. Отсутствие в необходимом количестве регуляторной изоформы ЛЦМ 2 на ранних этапах формирования миокарда позволяет предположить в миокарде и экспрессию нетипичной регуляторной формы ЛЦМ. К настоящему времени (согласно базам данных NCBI protein, UniProt и OMIM) у человека известны 10 генов, кодирующие 13 изоформ легких цепей миозина человека (7 эссенциальных и 6 регуляторных).

Среди них зарегистрирована и фетальная регуляторная ЛЦМ 5, изоформа 2 скелетной мышцы

(б)

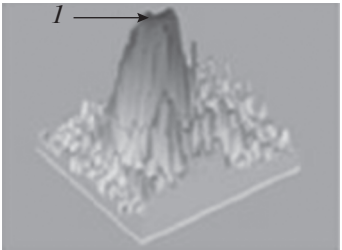
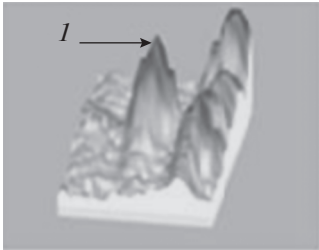
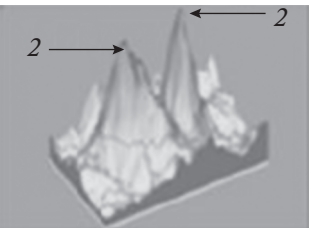
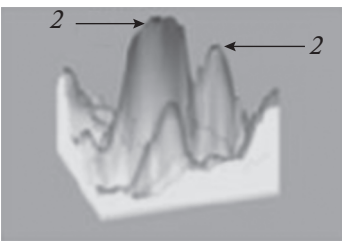
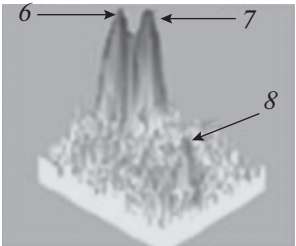
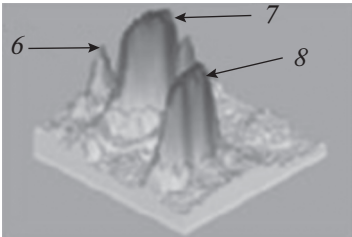
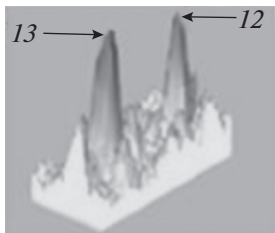
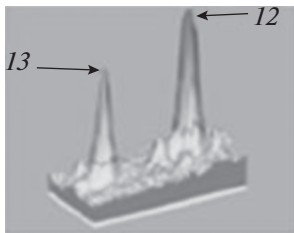
Эмбриональная стадия	Взрослое состояние	Символ гена (нумерация в соответствии с табл. 1)
		<i>ATP5B</i> (1)
		<i>ATP5A1</i> (2)
		<i>MYL4</i> (6) <i>MYL3</i> (7) <i>MYL2</i> (8)
		<i>HSRB1</i> (12), фосфорилированная форма (13)

Рис. 1. Окончание.

(Uniprot, запись Q02045; ген *MYL5*), с расчетной рI 4.44, отличающаяся от остальных, попавших в пределы использованного градиента рН (4.60–8.00). И возможно, она и присутствует на этапах кардиогенеза, но не детектируется в использованном градиенте рН. Ее наличие может компенсировать имеющийся недостаток регуляторной изоформы ЛЦМ 2 на этих этапах (и увеличить гетерогенность состава легких цепей миозина в

структуре головок миозина), что показывает направление дальнейших исследований для уточнения этой информации.

Экспрессия эмбриональной желудочковой изоформы продукта гена *MYL4* (эссенциальной) начинает снижаться в ткани желудочков сердца только после 30 нед. развития и стабилизируется на уровне взрослых не ранее 2-х лет жизни.

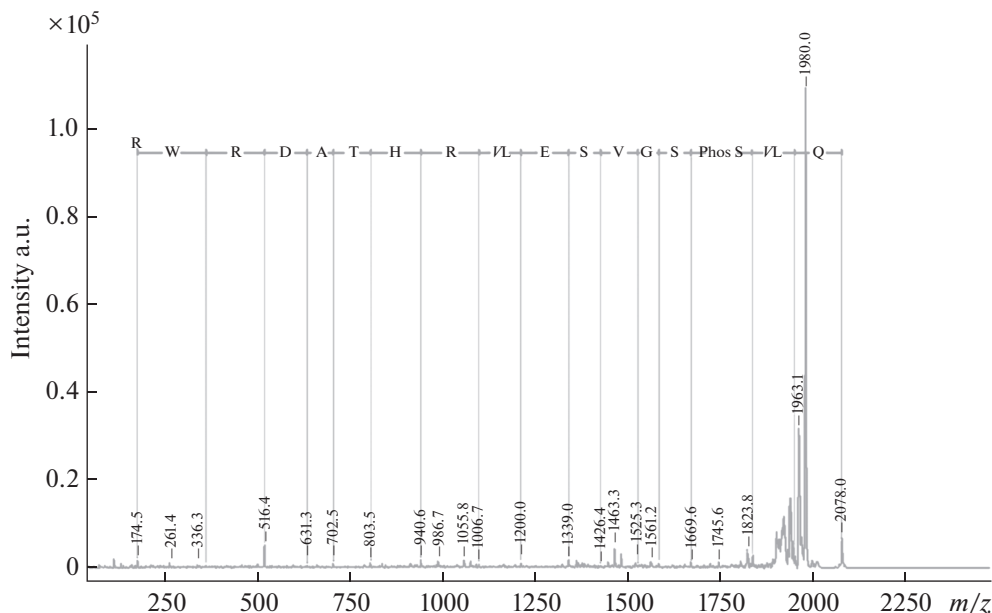


Рис. 2. Масс-спектр фрагментации иона m/z 2077.9882 (пептид а.п. 80–96 – QLSSGVSEIRHTADRW) триптического гидролизата фосфорилированной по 82S изоформы белка теплового шока 27 кДа (наблюдается у-серия фрагментных ионов с точностью 1 Да).

Фракция десмина (UniProt P17661), одного из главных белков промежуточных филаментов, участвующего в регуляции сердечного сокращения, не детектируются на ранних этапах кардио-генеза и впервые выявляются только на 8 нед. развития, с постепенным нарастанием в количестве и выходом по уровню экспрессии к сроку 24–26 на уровень миокарда взрослых лиц.

Определенные отличия выявлялись и в семействе тропомиозинов. Тропомиозин миокарда взрослых лиц представлен α -изоформой, каноническим продуктом гена *TPM1* (NCBI protein gi: 63252898), хотя обнаруживается и незначительное количество β -изоформы (*TPM2*) в соотношении не более 100 : 1, очевидно, за счет присутствия клеток других типов. Ген *TPM1* кодирует 10 тканеспецифичных изоформ (Uniprot: P09493).

В ткани миокарда на 5–6 нед. развития преобладающим компонентом тропомиозинового комплекса является низкомолекулярная фракция α -тропомиозина 1 (вариант 6), но к 8 нед. она уже составляет не более 1/4 от канонического варианта. После этого периода она продолжает линейно уменьшаться в количестве, и к 20 нед. практически не детектируется. Как показано по результатам RT-PCR, (Denz et al., 2004) в 6-нед. миокарде человека более короткая кардиоспецифичная изоформа присутствует в явно большем количестве по сравнению с тканью взрослых, и на белковом уровне мы выявили подтверждение такого эффекта.

Естественно, этот процесс сопровождался и количественными изменениями в белках, которые участвовали в фолдинге и импорте белков в структуры сократительного аппарата. Белок теплового шока 27 кДа (*HSPB1*, UniProt P04792) в зрелом миокарде был идентифицирован в виде 2-х главных электрофоретических изоформ. Сравнение спектра пиков масс триптических фрагментов главных фракций показало, что в более кислой по pI области появляется дополнительный пик с m/z 2077.99 (при исчезновении пика масс m/z 1998.03, который по своей аминокислотной последовательности соответствует триптическому пептиду позиций 80–96 – QLSSGVSEIRHTADRW). Результаты тандемной масс-спектрометрии иона m/z 2077.99 подтвердили, что это тот же пептид, только фосфорилированный по а.о. серина в 82 позиции (рис. 2). В эмбриональных образцах фосфорилированная форма до срока 8 нед. явно превышает по количеству нефосфорилированный вариант, но с 12 нед. ее количество начинает уменьшаться, стабилизируясь к 21 нед. на уровне зрелого миокарда (составляя при этом не более 10% от уровня обычного варианта, как и у взрослых лиц). Возможно, это свидетельство того, что ее роль в процессе фолдинга более значима, чем у нефосфорилированной изоформы.

В целом, полученные данные масс-спектрометрической идентификации белков, имеющих наиболее выраженные количественные изменения в формировании миокарда как органа, показали, что после начала функционирования сердца с 4 по 8 нед. проходит первый этап формирования бел-

кового состава миофибрилл сердца (происходит замещение ряда эмбриональных изоформ сократительных белков на зрелые), далее идет их качественное и количественное структурирование по зрелому типу к 20–24 нед. развития, и полностью взрослый фенотип сократительные белки миокарда приобретают только к 2 годам жизни. Аналогичный процесс проходят и белки митохондриального аппарата, также окончательно формирующих структуру митохондрий к 24 нед. развития. Этот процесс проходит при активном участии представителей белков теплового шока – 60 кДа для митохондрий и 27 кДа (фосфорилированной по 82S изоформы) для сократительных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В. и др. Сравнительный анализ протеомных карт *Helicobacter pylori* в клинических изолятах // Биохимия. 2003. Т. 68. № 1. С. 52–60.
- Ковалев Л.И., Пуляева Е.В., Кириллова А.И. и др. Белки сердечной мышцы человека: двумерный электрофоретический анализ у эмбрионов // Мол. генет., микроб., вирусол. 1988. № 8. С. 28–32.
- Ковалев Л.И., Пуляева Е.В., Ильинский Р.В. и др. Изучение топографических особенностей и изменений в онтогенезе легких цепей миозина в миокарде человека // Онтогенез. 1990. Т. 21. № 2. С. 218–222.
- Твердохлеб И.В. Гетерогенность миокарда и ее развитие в нормальном кардиомиогенезе. Днепропетровск: Пороги, 1996. 224 с.
- Цветкова М.Н., Ковалев Л.И., Фещенко С.П. и др. Изучение “мажорных” белков миокарда человека в онтогенезе // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 4. С. 351–363.
- Шаров В.Г., Иргашев Ш.Б., Магриди Д.И. и др. Ультратруктура сердца. Ташкент: Медицина, 1988. 207 с.
- Barton P.J.R., Buckingham M.E. The myosin alkali light chain proteins and their genes // Biochem. J. 1985. V. 231. P. 249–261.
- Denz C., Narshi A., Zaidel R. et al. Expression of a novel cardiac-specific tropomyosin isoform in humans // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004. № 4. P. 1291–1297.
- Doran P., Donoghue P., O’Connell K. et al. Proteomic profiling of pathological and aged skeletal muscle fibres by peptide mass fingerprinting // Int. J. Mol. Med. 2007. V. 19. № 4. P. 547–564.
- Ohlndieck K. Proteomic Profiling of fast-to-slow muscle transitions during aging // Front Physiol. 2011. № 2. P. 105.
- Sasse S., Brand N., Kyprianou P. et al. Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure // Circ. Res. 1993. V. 72. № 5. P. 932–938.
- Schiaffino S., Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance // Physiol. Rev. 1996. V. 76. P. 371–423.
- Seidel U., Bober E., Winter B. et al. Alkali myosin light chain in man are encoded by a multigene family that includes the adult skeletal muscle, the embryonic atrial, and nonsarcomeric isoforms // Gene. 1988. V. 66. P. 135–146.
- Staunton L., O’Connell K., Ohlndieck K. Proteomic profiling of mitochondrial enzymes during skeletal muscle aging // J. Aging Res. 2011. ID 908035. 9 p.
- Staunton L., Zweyer M., Swandulla D. et al. Mass spectrometry-based proteomic analysis of middle-aged vs. aged vastus lateralis reveals increased levels of carbonic anhydrase isoform 3 in senescent human skeletal muscle // Int. J. Mol. Med. 2012. V. 30. № 4. P. 723–733.

Proteomic Identification of Protein Markers of Stages of Heart Formation in Humans

M. A. Kovaleva^{1, *}, L. I. Kovalev¹, A. V. Ivanov¹, M. V. Serebryakova², and S. S. Shishkin²

¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

*e-mail: kovalyov@inbi.ras.ru

Received March 17, 2016; in final form, November 1, 2016

On the basis of the results of proteomic analysis and mass spectrometric identification of human myocardium proteins exhibiting pronounced quantitative changes in the dynamics of prenatal cardiogenesis, changes in the expression level of proteins of three families (mitochondrial, contractile, and heat shock) have been identified. The complex of human myocardium mitochondrial proteins (for example, α and β isoforms of ATP synthase, aconitase 2, creatine phosphokinase M-subunit, and 60-kDa heat shock protein) largely finishes its development according to the adult type by developmental week 24. The formation of the protein composition of human myocardium contractile structures (for example, desmin, myosin regulatory light chain 2, fetal ventricular essential isoform 1, canonical α -tropomyosin, and fetal isoform 6) reflects the initial stage of myofibril development until developmental week 8 (replacement of fetal isoforms of contractile proteins with adult ones with the involvement of the phosphorylated isoform of 27-kDa heat shock protein), the stage of their qualitative and quantitative structuring by developmental weeks 20–24, and the final formation of the adult phenotype of contractile structures by 2 years of life.

Keywords: cardiogenesis, proteins, mass spectrometric identification, human