

РЫСЕВ

Никита Александрович

**МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ РАБОТЫ АКТМИОЗИНОВОГО МОТОРА В
МЫШЕЧНОМ ВОЛОКНЕ МУТАЦИЯМИ ТРОПОМИОЗИНА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель:

Юрий Сергеевич Боровиков

доктор биологических наук, профессор
заведующий Лабораторией молекулярных
основ клеточной подвижности

Официальные оппоненты:

Надежда Владимировна Кулёва

доктор биологических наук, профессор
кафедры биохимии ФГБОУ ВПО
Санкт-Петербургский государственный
университет, г. Санкт-Петербург

Александр Вячеславович Воротников

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории
молекулярной эндокринологии ФГБУ Инсти-
тут экспериментальной кардиологии
Российского кардиологического
научно-производственного комплекса МЗ РФ
г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии моря
им. А.В. Жирмунского Дальневосточного
отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 29 января 2016 года в « » часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., д. 4.

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Телефон: (812) 297-18-29

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института цитоло-
гии РАН <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан « » декабря 2015 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Выяснение молекулярных механизмов мышечного сокращения является одной из фундаментальных проблем клеточной биологии. На данный момент хорошо известно, что генерация силы сердечной и скелетной мышц является результатом циклических взаимодействий миозиновых поперечных мостиков с актином и аденозинтрифосфорной кислотой (АТФ), которые запускаются освобождением ионов кальция из саркоплазматической сети. В цикле гидролиза АТФ поперечные мостики проходят через несколько конформационных состояний, так называемых «сильных» и «слабых» форм связывания миозина с актином [Geeves, Holmes 2005]. Регуляция взаимодействия актина с миозином осуществляется тропомиозином (ТМ) и кальций-чувствительным белком тропонином, которые формируют с F-актином тонкую нить саркомера мышечного волокна. Предполагается, что при низкой концентрации ионов Ca^{2+} тропомиозин занимает блокирующую позицию на периферии тонкой нити и закрывает участки актина, с которыми миозин способен формировать как сильные, так и слабые формы связывания [McKillop, Geeves, 1993]. Активация сокращения мышечного волокна происходит при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и их связывании с тропонином. При этом тропомиозин, изменяя свою конформацию, сдвигается от внешнего домена актина по направлению к центру нити в закрытую позицию, позволяя миозину формировать слабые формы связывания с актином [Galińska-Rakoczy et al., 2008]. Только тогда, когда миозин смещает тропомиозин к внутреннему домену актина в открытую позицию, все области связывания миозина на актине открываются, и между миозином и актином образуются существенные для генерации силы сильные формы связывания [Houmeida et al., 2010].

Нарушение этого взаимодействия и его регуляции вследствие точечных мутаций в мышечных белках приводит к серьезным структурным и функциональным нарушениям в мышечной клетке. Так, в генах тропомиозина идентифицировано большое количество мутаций, вызывающих такие наследственные заболевания, как гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии, немалиновая миопатия, «кэп»-миопатия и дистальный артрогрипоз. Врожденные миопатии разнородны по клиническим, гистологическим и генетическим признакам [Wallgren-Pettersson et al., 2011]. Гипертрофическая кардиомиопатия – одно из серьезных заболеваний миокарда, сопровождающееся его дисфункцией. Это заболевание характеризуется гипертрофией стенок левого желудочка сердца без расширения его полости, усилением систолической и нарушением диастолической функций. При дилатационной кардиомиопатии развиваются дилатации (растяжения) полостей сердца, с нарушением систолической функции без увеличения толщины стенок. Немалиновая миопатия характеризуется мышечной слабостью и наличием немалиновых тел в мышечных волокнах. «Кэп»-миопатия диагностируется при мышечной слабости и обнаружении шапочкообразных, или «кэп»-структур под сарколеммой мышечных волокон. При дистальном артрогрипозе повреждаются дистальные отделы конечностей. Данное заболевание сопровождается мышечными контрактурами, деформацией конечностей, недоразвитием суставов и мышц, фиброзом. Молекулярные механизмы нарушения регуляции сократительной функции мутациями в тропомиозине при этих заболеваниях изучены недостаточно.

Цели и задачи работы. Цель настоящей работы состояла в изучении механизма нарушений регуляции тропомиозином взаимодействия актина и миозина, вызванных точечными мутациями в генах TPM1 и TPM2 тропомиозина человека.

В задачи работы входило:

1. Исследовать конформационные перестройки, происходящие в F-актине, субфрагменте 1 миозина, α -тропомиозине сердечных мышц и β -тропомиозинах скелетных и гладких мышц, при моделировании ряда последовательных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне.
2. Изучить влияние точечных мутаций Glu180Gly или Asp175Asn α -тропомиозина, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией, на изменение позиции тропомиозина и на конформационные изменения актина и субфрагмента 1 миозина, происходящие в мышечном волокне в цикле гидролиза АТФ.
3. Исследовать характер движения β -тропомиозина скелетных мышц с мутациями Arg91Gly или Glu139del, которые вызывают дистальный артрогрипоз и «кэп»-миопатию, и β -тропомиозина скелетных мышц с мутацией Glu41Lys, которая ассоциирована с немалиновой миопатией, а также влияние этих мутаций на конформационные изменения актина и субфрагмента 1 миозина в АТФазном цикле.
4. Изучить влияние точечной мутации Gly126Arg, вызывающей стабилизацию структуры центральной области α -тропомиозина скелетных и β -тропомиозина гладких мышц, на движение тропомиозина и конформационные изменения актина в цикле гидролиза АТФ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В цикле гидролиза АТФ существуют несколько различных структурных состояний α -тропомиозина сердечных мышц и β -тропомиозина скелетных и гладких мышц человека, которые отличаются между собой гибкостью тропомиозинового тяжа и его позицией на актиновых нитях. Движение тропомиозина к центру нити (к внутреннему домену актина) сопряжено со смещением равновесия в сторону «включения» мономеров актина и образования сильной формы связывания головок миозина с актином, в то время как движение тропомиозина к периферии актиновой нити (к внешнему домену актина) сопровождается «выключением» мономеров актина и образованием слабой формы связывания головок миозина и актина.
2. Точечные мутации Glu180Gly и Asp175Asn в α -тропомиозине сердечных мышц, Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в β -тропомиозине скелетных мышц и Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных и β -тропомиозине гладких мышц нарушают характер движения тропомиозина на поверхности актиновой нити в цикле гидролиза АТФ и вызывают аномальные конформационные изменения актина и головок миозина.
3. Мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном α -тропомиозине, ассоциированные с гипертрофической кардиомиопатией, и мутация Arg91Gly в β -тропомиозине скелетных мышц, связанная с дистальным артрогрипозом, приводят к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и увеличению относительного количества головок миозина, способных к сильному связыванию с актином, при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ, что может быть причиной гиперсократимости мышечной ткани при этих мутациях.
4. Замена Glu41Lys в β -тропомиозине скелетных мышц, ассоциированная с немалиновой миопатией, приводит к смещению тропомиозина к периферии тонкой нити на

всех стадиях цикла гидролиза АТФ и к уменьшению и увеличению относительного количества миозиновых мостиков, сильно связанных с актином, при моделировании, соответственно, сильных и слабых форм связывания актина и миозина, что может объяснить ослабление сократительной функции мышечной ткани при этой мутации.

5. Мутация Glu139del, связанная с «кэп»-миопатией, приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и уменьшению относительного количества миозиновых мостиков, сильно связанных с актином, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ, что может вызывать ослабление сократительной функции мышечной ткани при этой мутации.

6. Замена Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных и β -тропомиозине гладких мышц, приводящая к стабилизации структуры центральной области тропомиозинового тяжа, вызывает смещение тропомиозина к периферии актиновой нити, увеличение жесткости С- и N-концевых участков тропомиозина и включение большего количества мономеров актина при моделировании почти всех стадий АТФазного цикла, что свидетельствует об увеличении кооперативности актиновой нити.

Научная новизна. Для α -тропомиозина сердечных мышц человека впервые показано, а для β -тропомиозина скелетных и гладких мышц человека подтверждено, что в АТФазном цикле каждому положению тропомиозина на поверхности актиновой нити соответствует определенное структурное состояние актомиозиновой системы, характеризующееся подвижностью и позицией моторного домена миозина, актинового мономера и его субдомена 1. Впервые показано, что точечные мутации тропомиозина, связанные с миопатиями человека, приводят к тому, что движения тропомиозина становятся аномальными и изменяется характер конформационных изменений миозина и актина в цикле гидролиза АТФ. Обнаружено, что мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном α -тропомиозине, ассоциированные с гипертрофической кардиомиопатией, и мутация Arg91Gly в β -тропомиозине скелетных мышц, связанная с дистальным артрогрипозом, приводят к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и активируют образование сильной формы связывания головки миозина с F-актином при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ, что может вызывать гиперсократимость мышечного волокна. Установлено, что замена Glu139del, связанная с «кэп»-миопатией, приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и уменьшению относительного количества миозиновых мостиков, сильно связанных с актином, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ. Показано, что мутация Glu41Lys в β -тропомиозине скелетных мышц, ассоциированная с немалиновой миопатией, фиксирует тропомиозин в положении ближе к периферии актиновой нити на всех стадиях цикла гидролиза АТФ. Такое расположение тропомиозина вызывает ингибирование образования сильной формы связывания головки миозина с актином на финальных стадиях цикла гидролиза АТФ, но активизирует формирование этой формы связывания актомиозина при расслаблении мышечного волокна. Эти нарушения в работе актомиозина могут быть причиной ослабления сократительной функции мышечного волокна. Обнаружено, что замена Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных и β -тропомиозине гладких мышц, приводящая к стабилизации центральной области молекулы, вызывает смещение тропомиозина к периферии нити в большинстве стадий АТФазного цикла и существенно увеличивает кооперативность включения мономеров актина.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные расширяют и углубляют представления о молекулярных механизмах регуляции клеточной подвижности и могут быть использованы при чтении курсов лекций по цитологии, клеточной биологии, биофизике, биохимии и физиологии. Новые данные о влиянии точечных мутаций в тропомиозине на его регуляторную функцию существенны для понимания того, какие нарушения характера конформационных перестроек сократительных белков могут лежать в основе таких тяжелых болезней человека, как гипертрофическая кардиомиопатия, дистальный артрогрипоз, немалиновая миопатия и «кэп»-миопатия. Кроме того, полученные результаты могут способствовать разработке тестов для диагностики заболеваний мышц человека. Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов кафедры биофизики и биохимии СПбГУ.

Личный вклад автора. Все экспериментальные процедуры работы, за исключением получения рекомбинантных форм тропомиозина, проведены автором лично. Поляризационно-флуориметрические эксперименты на мутантной форме тропомиозина Arg91Gly выполнены совместно с А.О. Симоняном. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались с научным руководителем и соавторами, и статьи были подготовлены к публикации при активном участии диссертанта.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на 37-й Европейской мышечной конференции в 2008 г. (Оксфорд, Великобритания), 39-й Европейской мышечной конференции в 2010 г. (Падуа, Италия), 40-й Европейской мышечной конференции в 2011 г. (Берлин, Германия), 41-й Европейской мышечной конференции в 2012 г. (Родос, Греция), 38-м Международном конгрессе Федерации европейских биохимических обществ в 2013 г. (Санкт-Петербург, Россия), 42-й Европейской мышечной конференции в 2013 г. (Амстердам, Нидерланды), Международном симпозиуме “Биологическая подвижность” в 2014 г. (Пущино, Россия), 43-й Европейской мышечной конференции в 2014 г. (Зальцбург, Австрия), 44-й Европейской мышечной конференции в 2015 г. (Варшава, Польша) и на научных семинарах Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности ИНЦ РАН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения (7 стр.), обзора литературы (34 стр.), описания материалов и методов (10 стр.), изложения полученных результатов и их обсуждения (60 стр.), выводов и списка цитированной литературы (259 работ). Работа изложена на 142 страницах, иллюстрирована 22 рисунками и 10 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В главе рассмотрены основные положения, которые касаются структуры и функции белков мышечной ткани: актина, миозина, тропомиозина. Особое внимание уделено описанию возможных областей связывания тропомиозина и миозина с актином. Проанализированы имеющиеся в литературе данные о молекулярных механизмах со-

кращения и регуляции саркомера и о влиянии на них точечных мутаций в тропомиозине, связанных с наследственными заболеваниями мышц человека.

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на теневых волокнах скелетных мышц кролика, избирательно лишенных миозина, тропонина и тропомиозина и содержащих актин (которым представлено более 80 % общего содержания белка) и белки Z-линии. Сократительная и регуляторная системы таких волокон были реконструированы при инкубации одиночных волокон в растворах, содержащих тропомиозин и S1. В экспериментах с флуоресцентно-меченным G-актином в теневые волокна встраивали G-актин, который затем полимеризовали. Миозин и актин выделяли из скелетных мышц кролика [Иванов, Юрьев, 1961; Spudich, Watt, 1971]. S1 получали перевариванием скелетного миозина α -химотрипсином в течение 20 мин при 25°C по ранее описанному методу [Weeds, Pope, 1977]. Рекомбинантные тропомиозины сердечных и скелетных мышц человека были получены в бактериальной системе клонирования и экспрессии *E. coli* в клетках BL21(DE3)pLysS [Mirza et al., 2005]. Последовательность ДНК тропомиозина в 5'-конце содержала основания, кодирующие вставку Met-Ala-Ser в N-конце тропомиозина. Эта вставка служила для имитации ацетилирования нативного белка при посттрансляционной модификации, что необходимо для нормального функционирования тропомиозина [Monteiro et al., 1994]. Препараты тропомиозина с точечными мутациями Asp175Asn, Glu180Gly, Gly126Arg в α -тропомиозине и Glu41Lys, Arg91Gly, Glu139del в β -тропомиозине получали методом сайт-направленного мутагенеза. Белковый состав теневых мышечных волокон и чистоту белковых препаратов оценивали с помощью метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [Laemmli, 1970].

Для выявления конформационных перестроек мышечные белки были модифицированы флуоресцентными красителями. Остатки Cys374 G-актина и Cys707 субфрагмента 1 специфически связывали с N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)этилендиамин (1,5-IAEDANS) [Miki et al., 1987; Borejdo, Putnam, 1977]. Cys36 β -тропомиозина или Cys190 α -тропомиозина модифицировали 5-йодоацетоамидофлуоресцеином (5-IAF) [Lamkin et al., 1983]. F-актин теневых мышечных волокон связывали с фаллоидин-флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC-фаллоидин) [Gałazkiewicz et al., 1987]. Модификация мышечных белков флуоресцентными красителями не оказывала существенного влияния на функциональные свойства актина, S1 и тропомиозина [Borejdo, Putnam S, 1977; Lamkin et al., 1983; Prochniewicz-Nakayama et al., 1983; Borovikov et al. 2000; Śliwińska et al., 2011]. Специфичность окрашивания препаратов определяли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующей визуализацией гелей в ультрафиолетовом свете.

Поскольку флуоресцентный зонд был жестко связан с исследуемым мышечным белком, то поляризованная флуоресценция, создаваемая этим зондом, позволяла получить информацию о пространственной организации актина, S1 или тропомиозина в мышечном волокне. Интенсивность поляризованной флуоресценции зондов регистрировали с помощью поляризационного микрофлуориметра [Borovikov et al., 2004]. Флуоресценцию регистрировали в области 500-600 нм после возбуждения при 489±5 нм для

5-IAF и FITC-фаллоидина и при 365 ± 5 нм для 1,5-IAEDANS. Измерения проводили в растворе, содержащем 6,7 мМ K,Na-фосфатный буфер, pH 7,0 в отсутствие и в присутствии 3 мМ MgADP, 15 мМ MgAMP-PNP или 5 мМ MgATP.

Для анализа поляризованной флуоресценции использовали модель-зависимый метод [Yanagida, Oosawa, 1978; Borovikov et al., 2004]. Предполагалось, что в мышечном волокне существуют две популяции флуорофоров: хаотично расположенные (в количестве N) и ориентированные (в количестве 1-N). Оси диполей ориентированных флуорофоров располагаются по спирали вдоль поверхности конуса, ось которого совпадает с осью актиновых филаментов. Диполи поглощения и излучения флуорофоров образуют углы Φ_A и Φ_E , соответственно, при вершине конуса. Угол между диполями поглощения и излучения постоянен для каждого зонда. Тонкая нить является гибкой и может отклоняться от оси мышечного волокна на максимальный угол $\theta_{1/2}$. Величина $\theta_{1/2}$ позволяет определить эластичный модуль (жесткость тонкой нити на изгиб) [Yanagida, Oosawa, 1978]. Анализ спектров флуоресценции красителей, связанных с белками в мышечном волокне, не показал существенного сдвига спектра флуоресценции и его максимума при связывании других белков и нуклеотидов. Поэтому изменения в поляризованной флуоресценции, зарегистрированные в наших экспериментах, отражают, прежде всего, изменения в ориентации и подвижности диполей поглощения и излучения зондов, а не изменения в микроокружении зонда. Во всех экспериментах характер изменений Φ_A и Φ_E был одинаковым, поэтому в работе представлены значения одного из углов, Φ_E . Статистическую достоверность изменений оценивали с помощью критерия Стьюдента ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в α -ТМ на структурное состояние актина, α -тропомиозина и субфрагмента-1 миозина при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне.

Мутации в гене TPM1, кодирующем α -изоформу тропомиозина, обнаружены у больных дилатационной (ДКМ) и гипертрофической (ГКМ) кардиомиопатиями. Оказалось, что оба заболевания развиваются вследствие определенных первичных изменений сократительной функции кардиомиоцитов, при этом гипертрофическая кардиомиопатия характеризуется повышенной сократимостью, а дилатационная кардиомиопатия, наоборот, пониженной сократительной функцией. Предположили, что молекулярный механизм этих заболеваний, лежащий в основе таких противоположных эффектов, состоит в нарушении регуляции ионами Ca^{2+} актин-миозинового взаимодействия, возникающем вследствие мутаций в ТМ и/или тропонине [Robinson et al., 2007]. Известно, что мутации Glu180Gly и Asp175Asn в гене сердечного тропомиозина (TPM1) связаны с ГКМ.

В нашей работе α -ТМ модифицировали по остатку Cys190 флуоресцентным зондом 5-IAF, S1 – по остатку Cys707 зондом 1,5-IAEDANS. Флуоресцентный зонд 1,5-IAEDANS ковалентно связывали с остатком Cys374 субдомена 1 актина (см. Материалы и методы).

Белки, содержащие флуоресцентные зонды, вводили в одиночные теневые мышечные волокна и изучали изменения их структурного состояния в цикле гидролиза АТФ с помощью метода поляризационной флуориметрии. Различные стадии АТФазного цикла AM , AM^A-ADP , AM^A-ADP , AM^A-ATP (A – актин, M – головки миозина) моделировали, соответственно, в отсутствие нуклеотида и в присутствии 3 мМ $MgADP$, 15 мМ $MgAMP-PNP$, 5 мМ $MgATP$ [Goody, Hofmann, 1980; Roopnarine, Thomas, 1996]. Для оценки изменений структурного состояния белков использовали параметр Φ_E – угол, образованный осциллятором излучения зонда и осью мышечного волокна (см. обзоры: [Borovikov, 1999; Borejdo et al. 2006]). Поскольку красители ковалентно связывались с белками и не оказывали существенного влияния на их свойства [Borejdo, Putnam S, 1977; Lamkin et al., 1983; Prochniewicz-Nakayama et al., 1983; Borovikov et al. 2000; Śliwińska et al., 2011], то изменения значения Φ_E рассматривались как свидетельство конформационных перестроек белка, происходящих при мышечном сокращении.

Согласно данным, представленным на рисунках 1, 2, 3, присоединение α -ТМ с мутациями Glu180Gly или Asp175Asn к F-актину в теневом мышечном волокне оказывает заметное влияние на значение Φ_E для комплексов актин-AEDANS, α -ТМ-AF и S1-AEDANS. Оказалось, что как в отсутствие, так и в присутствии субфрагмента-1 миозина величины Φ_E для α -ТМ-AF с мутацией Glu180Gly значительно ниже, чем для α -ТМ «дикого» типа (WT-TM) (рис. 2, А). Уменьшение параметра Φ_E для α -ТМ-AF свидетельствует о смещении тропомиозина с мутацией Glu180Gly по направлению к внутреннему домену Ф-актина. Стоит отметить, что при моделировании слабой формы связывания актомиозина (в присутствии АТФ) позиция Glu180Gly тропомиозина наиболее существенно отличается от позиции тропомиозина «дикого» типа и характерна для расположения тропомиозина в открытой позиции [Lehman et al., 2013], при которой головка миозина способна образовывать с актином сильную форму связывания. Действительно, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ в присутствии Glu180Gly α -ТМ наблюдается снижение значений Φ_E для S1-AEDANS (рис. 3, А), которое свидетельствует об увеличении относительного количества миозиновых поперечных мостиков в сильной форме связывания. Возрастание числа таких мостиков сопровождается включением большего количества актиновых мономеров при моделировании сильных форм связывания (рис. 1, А). Однако при моделировании слабых форм связывания с актином, несмотря на локализацию тропомиозина с мутацией Glu180Gly в открытой позиции, количество включенных актиновых мономеров не увеличивается, а, наоборот, уменьшается. В этом случае согласованное взаимодействие актина и миозина разобщается.

Актин-AEDANS

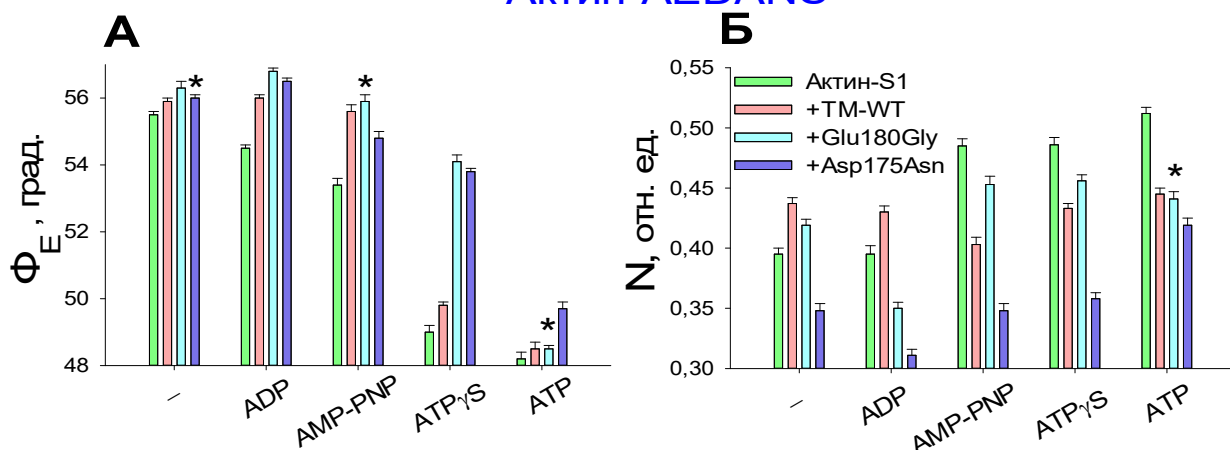


Рисунок 1. Влияние ТМ «дикого» типа (WT-TM) и ТМ с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly на параметры поляризованной флуоресценции (Φ_E (А) и N (Б)) актин-AEDANS в теневых мышечных волокнах при имитации различных стадий цикла гидролиза ATP. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей; N – количество хаотически ориентированных зондов. Столбики в каждой группе представляют (слева направо) данные для теневых волокон в отсутствие ТМ и в присутствии WT-TM, ТМ с мутациями Glu180Gly или Asp175Asn, соответственно. Значения Φ_E и N изменяются в присутствии нуклеотидов ($p < 0.05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Asp175Asn или Glu180Gly.

ТМ-AF

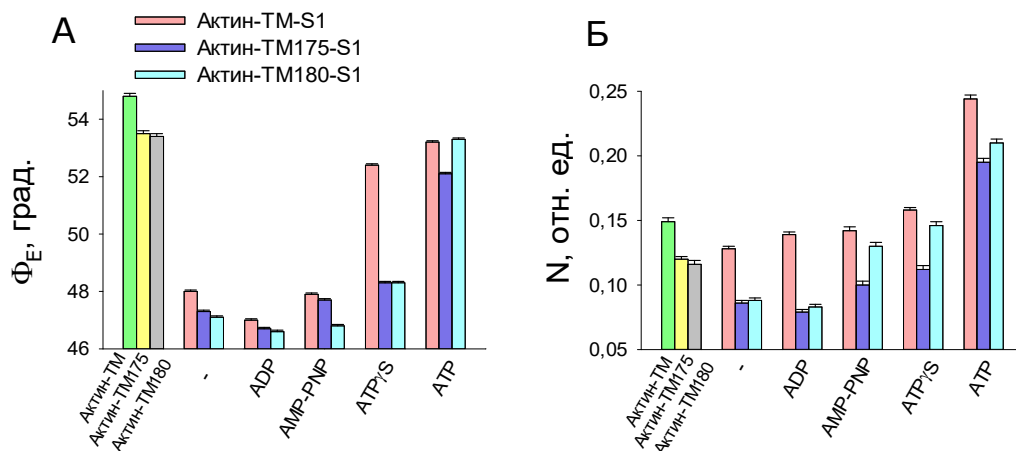


Рисунок 2. Значения параметров поляризованной флуоресценции (Φ_E (А) и N (Б)) 5-IAF, связанного с Cys190 ТМ «дикого» типа, Asp175Asn и Glu180Gly мутантных ТМ в теневых мышечных волокнах при имитации различных стадий цикла гидролиза ATP. Угол Φ_E дан с поправкой на вращение мономеров актина; N – относительное количество хаотически расположенных зондов. Столбики в каждой группе представляют данные для теневых волокон, содержащих ТМ «дикого» типа, ТМ с мутацией Asp175Asn или ТМ с мутацией Glu180Gly, соответственно. Значения Φ_E и N существенно изменяются под действием нуклеотидов ($p < 0,05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения.

S1-AEDANS

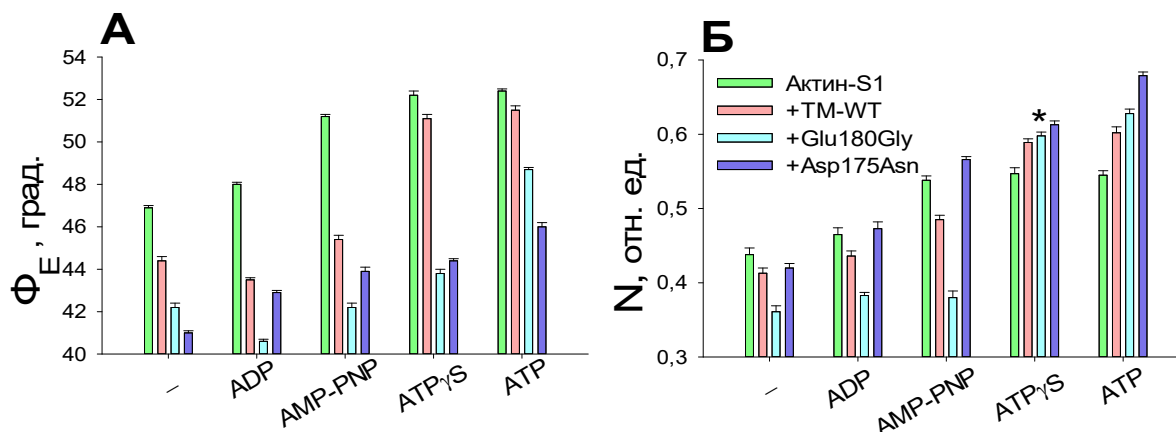


Рисунок 3. Влияние ТМ «дикого» типа (WT-TM), мутантных Asp175Asn и Glu180Gly ТМ на параметры Φ_E (А) и N (Б) поляризованной флуоресценции AEDANS-S1 в теневых мышечных волокнах при имитации различных стадий цикла гидролиза АТФ. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей; N – количество хаотически ориентированных зондов. Столбики в каждой группе представляют (слева направо) данные для теневых волокон в отсутствие ТМ и в присутствии WT-TM, ТМ с мутациями Glu180Gly или Asp175Asn, соответственно. Значения Φ_E и N изменяются в присутствии нуклеотидов ($p < 0.05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками обозначены недостоверные различия данных между WT-TM и Asp175Asn или Glu180Gly.

Мутация Asp175Asn в α -тропомиозине имеет менее выраженные эффекты: тяжи тропомиозина смещены к внутреннему домену актина на некоторых стадиях АТФазного цикла (рис. 2, А). При этом относительное количество головок миозина, способных образовывать с F-актином сильную форму связывания, увеличивается. В отличие от мутации Glu180Gly, мутация Asp175Asn способна вызывать смещение тропомиозина к внешнему домену актина в присутствии ADP и AMP-PNP (рис. 2, А), при котором наблюдается выключение актиновых мономеров (рис. 1, А) и увеличение относительного количества миозиновых головок в слабой форме связывания с актином (рис. 3, А).

Обе мутации уменьшают значения N для ТМ-AF среднем на 30% (рис. 2, Б). Это позволяет предположить, что мутации Asp175Asn и Glu180Gly усиливают связывание С-концевой области ТМ, содержащей Cys190, с актином в результате увеличения стереоспецифического согласования между молекулами актина и миозина [Borovikov et al., 2009a]. Таким образом, мутации в ТМ, связанные с ГKM, скорее всего, увеличивают стереоспецифическое и гидрофобное взаимодействия между молекулами актина и миозина и, тем самым, повышают положительный аллостерический эффект ТМ на актине.

Тропомиозины с мутациями Asp175Asn и Glu180Gly вызывают уменьшение значений N для зондов, связанных с субдоменом-1 актина и с SH1 спиралью головки миозина, при переходе из AM^x -ATP в AM состояние, причём эффект мутации Glu180Gly выражен сильнее, чем для Asp175Asn (рис. 1, Б; 3, Б). Это означает, что по сравнению с WT-TM тропомиозины, содержащие мутации, связанные с ГKM (рис. 1, 3) индуцируют конформационные состояния более сильных форм связывания S1 и актина при имитации всех промежуточных состояний цикла гидролиза АТФ.

Причиной смещения тропомиозина с мутациями Asp175Asn или Glu180Gly, возможно, является изменение поверхностного заряда молекулы тропомиозина. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки аспарагиновой кислоты в позиции 175 и

глутаминовой кислоты в позиции 180 последовательности α -ТМ меняются на незаряженные аминокислотные остатки аспарагина и глицина в последовательности мутантных изоформ. Более того, обе мутации находятся в α -зоне псевдоповторов молекулы ТМ, которые участвуют в связывании с F-актином. В связи с электростатической природой взаимодействия ТМ с F-актином даже локальное изменение поверхностного заряда тропомиозинового тяжа может привести к нарушению взаимодействия этих белков [Olson et al., 2001]. Вследствие смещения тропомиозина с мутациями Asp175Asn или Glu180Gly к внутреннему домену актина, в открытую позицию, может усиливаться сократительная функция кардиомиоцитов. Такое усиление, приводящее к развитию гипертрофии сердечной мышцы, наблюдали у трансгенных мышей с мутацией Asp175Asn в α -ТМ [Muthuchamy et al., 1999].

Влияние мутаций Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в β -ТМ на структурное состояние актина, β -скелетного ТМ и S1 в цикле гидролиза АТФ

В этой части работы мы изучили влияние мутаций Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в β -скелетном ТМ человека, вызывающих, соответственно, немалиновую миопатию, дистальный артрогрипоз, «кэп»-миопатию, на характер изменений позиции β -ТМ, пространственной организации мономеров F-актина и субфрагмента-1 миозина в цикле гидролиза АТФ.

β -ТМ модифицировали по остатку Cys36 флуоресцентным зондом 5-IAF, S1 – по остатку Cys707 зондом 1,5-IAEDANS. F-актин был специфически связан с FITC-фаллоидином в районе бороздки актиновой нити.

Белки, содержащие флуоресцентные зонды, вводили в одиночные теневые мышечные волокна и изучали изменения их структурного состояния в цикле гидролиза АТФ с помощью метода поляризационной флуориметрии. Различные стадии АТФазного цикла AM, AM[^]-ADP, AM'-ADP, AM^x-ATP (A – актин, M – головки миозина) моделировали, соответственно, в отсутствие нуклеотида и в присутствии 3 mM MgADP, 15 mM MgAMP-PNP, 5 mM MgATP [Goody, Hofmann, 1980; Roopnarine, Thomas, 1996]. Для оценки изменений структурного состояния белков использовали параметр Φ_E – угол, образованный осциллятором излучения зонда и осью мышечного волокна (см. обзоры: [Borovikov, 1999; Borejdo et al. 2006]). Поскольку красители ковалентно связывались с белками и не оказывали существенного влияния на их свойства [Borejdo, Putnam, 1977; Lamkin et al., 1983; Prochniewicz-Nakayama et al., 1983; Borovikov et al. 2000; Śliwińska et al., 2011], то изменения значения Φ_E рассматривались как свидетельство конформационных перестроек белка, происходящих при мышечном сокращении.

Как следует из данных, представленных на рисунке 4, каждой моделируемой стадии цикла гидролиза АТФ соответствует определенная ориентация осцилляторов излучения зонда, связанного с каждым из белков.

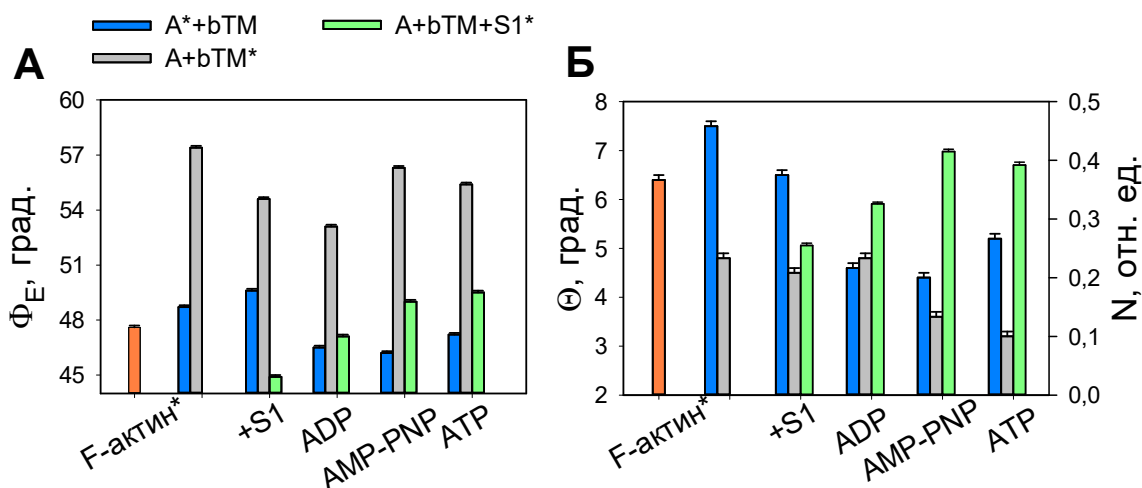


Рисунок 4. Значения Φ_E (А), $\theta_{1/2}$ (Б) для актин-FITC-фаллоидина, β -TM-AF и Φ_E (А), N (Б) для S1-AEDANS при моделировании промежуточных стадий цикла гидролиза ATP в теновом мышечном волокне (80 измерений для каждого белка). Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. Угол Φ_E для TM-AF дан с поправкой на вращение мономеров актина. $\theta_{1/2}$ – угол отклонения тонких филаментов или тяжей TM, характеризующий гибкость молекулы. N – количество хаотически ориентированных зондов. Все изменения достоверны ($p < 0,05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения.

При моделировании перехода актомиозина из слабой (в присутствии ATP) в сильную (в отсутствие нуклеотида и в присутствии ADP) форму связывания наблюдается постепенное уменьшение значений Φ_E для S1-AEDANS (рис. 4, зеленые колонки), что отражает многоступенчатый поворот головки миозина к оси F-актина. Следовательно, уменьшение значения Φ_E для S1-AEDANS происходит при увеличении относительного количества сильных форм связывания поперечных мостиков с актином (см. обзоры: [Borovikov, 1999; Borejdo et al. 2006]).

Изменения в активном центре головки миозина передаются на актин, вызывая нуклеотид-зависимые изменения угла ориентации флуоресцентного зонда в F-актине (рис. 4, синие колонки). Переход актомиозина из слабой в сильную форму связывания вызывает увеличение Φ_E для актин-AEDANS или комплекса актин-FITC-фаллоидин, что свидетельствует о повороте субдомена 1 актина от оси тонкой нити на периферию. Такие изменения ориентации субдомена 1 актина можно рассматривать как увеличение относительного количества включенных мономеров актина в тонких нитях [Borovikov et al., 2004].

При моделировании перехода актомиозина из слабой в сильную форму связывания происходит многоступенчатое уменьшение значения угла Φ_E для TM-AF (рис. 4, серые колонки). Поскольку наименьшие значения Φ_E для TM-AF обнаружены в экспериментах с S1, находящимся в сильной форме связывания с актином, был сделан вывод о том, что уменьшение значения Φ_E для TM-AF отражает движение тропомиозина по поверхности тонкой нити к внутреннему домену актина (по направлению к открытой позиции) [Rysev et al., 2014]. При переходе актомиозина из слабой в сильную форму связывания тропомиозиновый тяж смещается к внутреннему домену актина, при этом увеличивается относительное количество включенных мономеров актина и миозиновых поперечных мостиков, образующих с актином сильную форму связывания.

Несмотря на то, что клинические симптомы, описанные у пациентов с мутациями Arg91Gly и Glu139del, отличаются (контрактуры в случае с мутациями Arg91Gly [Sung et al., 2003] и гипотония и мышечная слабость в случае с мутацией Glu139del), на молекулярном уровне обе мутации демонстрируют гиперсократимость. Основным эффектом мутаций в позициях 91 и 139 аминокислотной последовательности β -ТМ заключается в повышении чувствительности тонких филаментов к ионам Ca^{2+} в тесте *in vitro motility assay* [Robinson et al., 2007; Marttila et al., 2012; Marston et al., 2013]. Мутация Glu41Lys характеризуется гипотонией и мышечной слабостью у пациентов, [Martilla et al., 2012] и сниженной Ca^{2+} -чувствительностью тонких нитей [Ochala et al., 2008; Marttila et al., 2012].

Мутация Arg91Gly располагается в позиции “g” гептадного повтора и может влиять на димеризацию. Данная мутация может нарушать солевой мостик через замену положительно заряженного аминокислотного остатка на нейтральный. Мутации Glu139del и Glu41Lys располагаются в позиции “f” и могут влиять на связывание ТМ с актином и другими белками тонких филаментов [Martilla et al., 2012]. Эти замены могут изменять конформацию ТМ, приводя к деформации молекулы ТМ, которая может лежать в основе изменения позиции и гибкости тяжей ТМ.

Наши данные позволяют предположить, что изменение чувствительности тонких филаментов к Ca^{2+} , вызванное этими мутациями, коррелирует с изменением позиции тропомиозиновых тяжей на актиновых нитях (рис. 5).

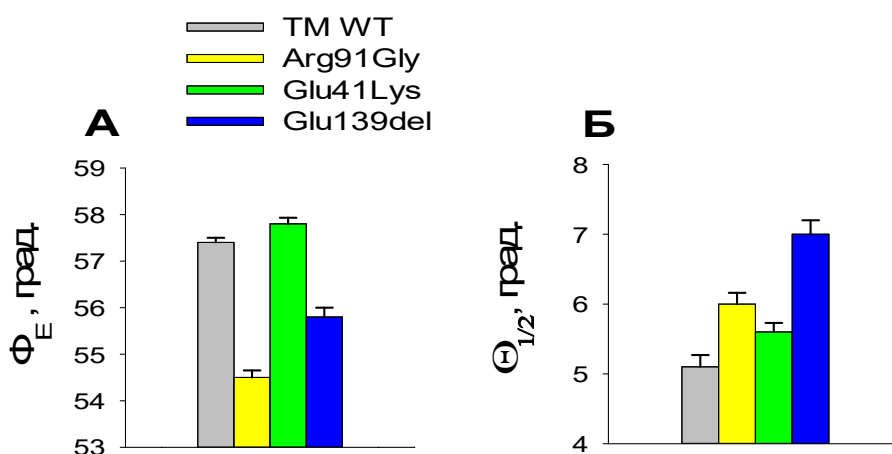


Рисунок 5. Значения Φ_E (А) и $\theta_{1/2}$ (Б) для β -ТМ-АФ «дикого» типа и с мутациями Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del в отсутствие S1 в теневом мышечном волокне. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей, дан с поправкой на вращение мономеров актина. $\theta_{1/2}$ – угол отклонения тонких филаментов или тяжей ТМ, характеризующий гибкость молекулы. Все изменения Φ_E и $\theta_{1/2}$ для β -ТМ с мутациями Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del относительно β -ТМ «дикого» типа достоверны ($p < 0,05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения.

Мутации Arg91Gly, Glu139del и Glu41Lys приводят к статистически достоверным ($p < 0,05$) изменениям значений Φ_E и $\theta_{1/2}$ для АФ-ТМ, что свидетельствует об изменениях в позиции и гибкости ТМ, вызванных этими мутациями (рис. 5). Так, для мутаций Arg91Gly и Glu139del в отсутствие S1 значения Φ_E для АФ-ТМ были меньше, по сравнению с WT-ТМ, на $2,9^\circ$ и $1,6^\circ$, соответственно (рис 5, А). Это значит, что эти замены в молекуле ТМ вызывают смещение тяжа ТМ к центру тонкой нити, к открытой позиции. Для мутации Glu41Lys значение Φ_E было выше, чем для WT-ТМ, на $0,3^\circ$ ($P < 0,05$) (рис.

5, А), что указывает на смещение тяжа ТМ к периферии тонкой нити, в направлении блокирующей позиции. Такой характер расположения ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu139del, по-видимому, способствует формированию сильного связывания S1 с актином, тогда как расположение Glu41Lys ТМ, наоборот, может препятствовать такому связыванию. Эти мутации располагаются в областях, не вовлечённых напрямую в связывание с тропонином [White et al., 1987; Miki et al., 2012]. Следовательно, можно предположить, что именно смещение тяжа ТМ ответственно за описанное в литературе увеличение Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей в присутствии ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu139del [Marston et al., 2013] и уменьшение Ca^{2+} -чувствительности в присутствии ТМ с мутацией Glu41Lys [Ochala et al., 2008; Martilla et al., 2012].

Мутации ТМ изменяют значение $\theta_{1/2}$ (рис. 5, Б), что указывает на изменение гибкости тяжа ТМ. Так, в отсутствие S1 значение $\theta_{1/2}$ было выше на $0,9^\circ$, $1,9^\circ$ и $0,5^\circ$ для Arg91Gly, Glu139del и Glu41Lys, соответственно, по сравнению с тропомиозином «дикого» типа, что свидетельствует об увеличении гибкости тяжа ТМ. Ранее было обнаружено, что ТМ с мутацией Glu139del содержит меньше α -спиральных участков, чем WT-ТМ [Martilla et al., 2012]. Замена Arg91Gly приводит к существенной дестабилизации значительной части молекулы ТМ [Nevzorov et al., 2008]. Возможно, уменьшение содержания α -спиральных структур и дестабилизация молекулы ТМ могут лежать в основе обнаруженного нами увеличения гибкости ТМ вследствие мутаций Arg91Gly и Glu139del.

Изменения в позиции ТМ и его гибкости существенно меняют конформационное состояние F-актина (рис. 7).

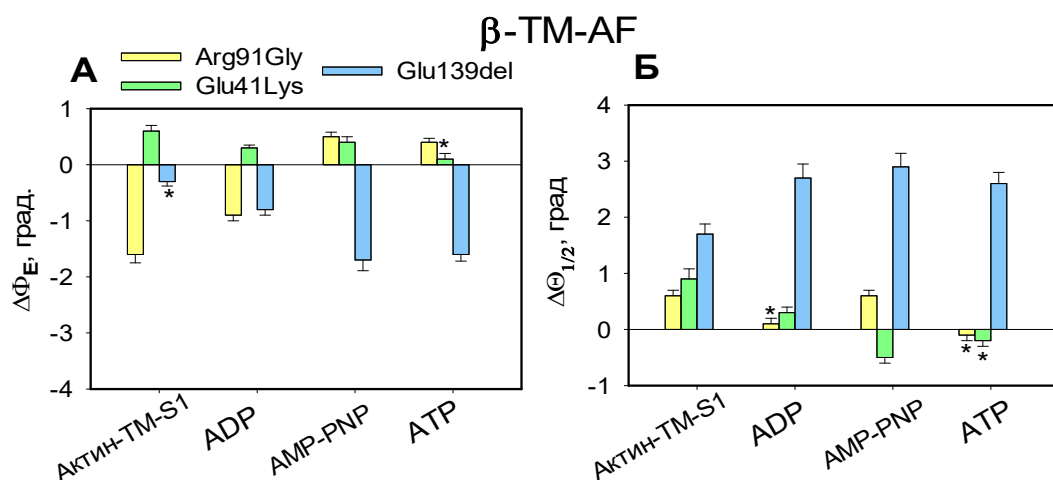


Рисунок 6. Влияние мутаций Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del в скелетном β -ТМ на значения Φ_E (А) и $\theta_{1/2}$ (Б) флуоресцентных зондов, локализованных в β -ТМ относительно Φ_E и $\theta_{1/2}$, вычисленных в присутствии тропомиозина «дикого» типа (см. рис. 4) при моделировании различных промежуточных стадий АТФазного цикла. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. Угол Φ_E дан с поправкой на вращение мономеров актина. $\theta_{1/2}$ – угол отклонения тяжей ТМ, характеризующий гибкость молекулы. Все изменения относительно β -ТМ «дикого» типа достоверны, за исключением изменений, отмеченных звездочкой ($p < 0,05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-ТМ и ТМ с мутациями.

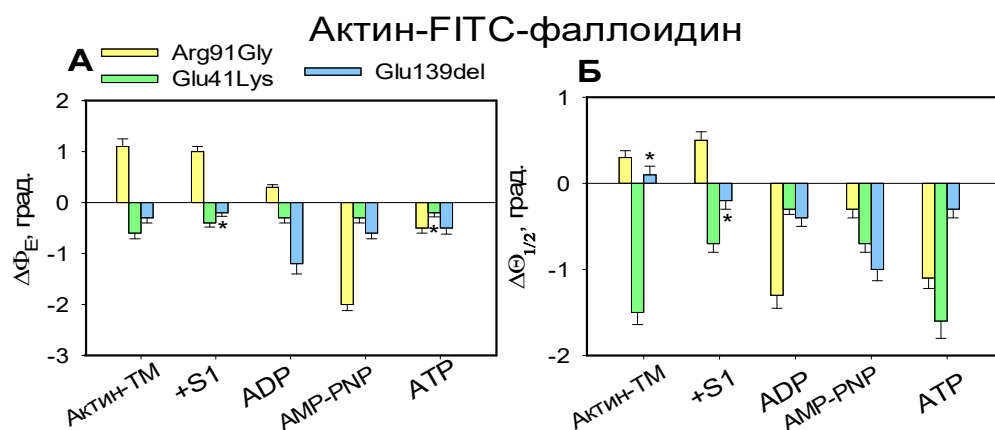


Рисунок 7. Влияние мутаций Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del в скелетном β-ТМ на значения Φ_E (А) и $\theta_{1/2}$ (Б) флуоресцентных зондов, локализованных в F-актине относительно Φ_E и $\theta_{1/2}$, вычисленных в присутствии тропомиозина «дикого» типа (см. рис. 4) при моделировании различных промежуточных стадий АТФазного цикла. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. $\theta_{1/2}$ – угол отклонения тонких филаментов, характеризующий гибкость молекулы. Все изменения относительно β-ТМ «дикого» типа достоверны, за исключением изменений, отмеченных звездочкой ($p < 0,05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и TM с мутациями.

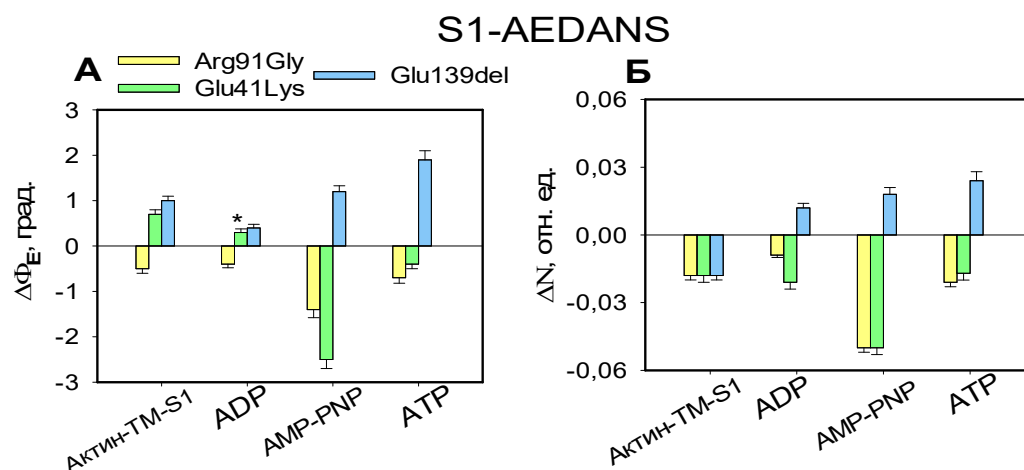


Рисунок 8. Влияние мутаций Arg91Gly, Glu41Lys и Glu139del в скелетном β-ТМ на значения Φ_E (А) и N (Б) флуоресцентных зондов, локализованных в S1 относительно Φ_E и N, вычисленных в присутствии тропомиозина «дикого» типа (см. рис. 4) при моделировании различных промежуточных стадий АТФазного цикла. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. N – количество хаотически ориентированных зондов. Все изменения относительно β-ТМ «дикого» типа достоверны, за исключением изменений, отмеченных звездочкой ($p < 0,05$). Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и TM с мутациями.

В отсутствие S1 значения Φ_E для FITC-актина в присутствии ТМ с мутацией Arg91Gly выше на $1,1^\circ$, в присутствии ТМ с мутациями Glu41Lys и Glu139del ниже на $0,6^\circ$ и $0,3^\circ$ ($P < 0,05$), соответственно, по сравнению с ТМ «дикого» типа (рис. 7, А). $\theta_{1/2}$ больше на $0,3^\circ$ в присутствии ТМ с мутацией Arg91Gly и меньше на $1,5^\circ$ ($P < 0,05$) в присутствии ТМ с мутацией Glu41Lys, по сравнению с ТМ дикого типа (рис. 7, Б). Эти величины для F-актина в присутствии ТМ «дикого» типа и ТМ с мутацией Glu139del были одинаковыми. Увеличение и уменьшение значений Φ_E и $\theta_{1/2}$ интерпретируется как увеличение и уменьшение, соответственно, относительного количества мономеров актина во включенном состоянии [Rysev et al., 2014].

Таким образом, в отсутствие S1 мутация Arg91Gly увеличивает количество включенных мономеров актина, а мутация Glu41Lys – уменьшает.

В случае с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys изменения позиции тяжей ТМ, вызванные этими мутациями в отсутствие S1 коррелирует с нормальными изменениями в количестве включенных мономеров актина (рис. 7, А): мутация Arg91Gly сдвигает тяж ТМ к внутреннему домену актина, и это сопровождается увеличением количества включенных мономеров актина; и, напротив, мутация Glu41Lys смещает тяжи к внешнему домену актина, что сопровождается уменьшением количества включенных мономеров актина. Эта корреляция нарушается в случае с мутацией Glu139del: смещение тяжей ТМ к внутреннему домену актина сопровождалось уменьшением относительного количества включенных мономеров актина. Наблюдаемое разобщение корреляции между положением ТМ и конформацией актина можно объяснить тем, что ТМ с мутацией Glu139del обладает существенно меньшим сродством к F-актину, чем ТМ «дикого» типа [Martilla et al., 2012].

Мутации Arg91Gly, Glu139del и Glu41Lys в тропомиозине оказывают существенное влияние на позицию ТМ и структурное состояние актомиозина в цикле гидролиза АТФ.

Так, в отсутствие нуклеотидов, или в присутствии MgADP (состояния АМ и АМ[^]-ADP, соответственно), значение Φ_E для АF-ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu139del, меньше на 1,6° и 0,3° при имитации состояния АМ и на 0,9° и 0,8° при имитации состояния АМ[^]-ADP (рис. 6, А), соответственно. В случае же с мутацией Glu41Lys угол меньше на 0,8° и 0,3°, соответственно (рис. 6, А). Это значит, что при моделировании состояний сильного связывания актомиозина мутации Arg91Gly и Glu139del сдвигают тяж ТМ к внутреннему домену актина, в то время как мутация Glu41Lys, напротив, сдвигает его к внешнему домену.

Интересно, что нормальный ответ актиновых мономеров (рис. 7) и головок миозина (рис. 8) на движение ТМ в этих экспериментальных условиях (в отсутствие нуклеотида или в присутствии MgADP) наблюдается только для мутаций Arg91Gly и Glu41Lys: сдвиг ТМ с мутацией Arg91Gly в сторону внутреннего домена актина (рис. 6, А) сопровождается увеличением количества головок миозина в состоянии сильного связывания с актином (значения Φ_E и N для AEDANS-S1 снижаются на 0,5° и 0,4°, и на 0,018 относительных единиц и 0,009 относительных единиц ($P < 0,05$) в отсутствие нуклеотида и в присутствии MgADP, соответственно) (рис. 8) и увеличением количества включенных мономеров актина (в состоянии АМ значения Φ_E и $\theta_{1/2}$ для FITC-актина увеличиваются на 1,0° и 0,5°, соответственно) (рис. 7). Сдвиг ТМ с мутацией Glu41Lys к внешнему домену актина (рис. 6, А) снижает количество головок миозина в состоянии сильного связывания (значения Φ_E и N для AEDANS-S1 увеличиваются на 0,7° и 0,3°, и на 0,018 и 0,021 относительных единиц в отсутствие нуклеотида и в присутствии MgADP, соответственно) (рис. 8) и количество включенных мономеров актина (для AEDANS-актин значения Φ_E снижаются на 0,4° и 0,3°, а значения $\theta_{1/2}$ снижаются на 0,7° и 0,3° ($P < 0,05$), при имитации состояний АМ и АМ[^]-ADP, соответственно) (рис. 7).

В противоположность мутациям Arg91Gly и Glu41Lys, в отсутствие нуклеотидов и в присутствии MgADP мутация Glu139del демонстрирует аномальный ответ мономеров актина и головок миозина на движение ТМ. Смещение ТМ с мутацией Glu139del к внутреннему домену актина (рис. 6, А), вместо увеличения количества головок в состоянии

сильного связывания с актином и мономеров актина во включенном состоянии, сопровождается снижением количества сильно связанных головок миозина (значения Φ_E выше на $1,0^\circ$ и $0,4^\circ$, и N меньше на $0,018$ и $0,012$ относительных единиц ($P < 0,05$), соответственно) (рис. 8) и количества включенных мономеров актина (значение Φ_E не изменяется или уменьшается на $1,2^\circ$, а значение $\theta_{1/2}$ не изменяется или снижается на $0,4^\circ$ ($P < 0,05$), соответственно) (рис. 7).

При имитации состояний слабого связывания актомиозина (в присутствии MgAMP-PNP и MgATP) наблюдается аномальный ответ головок миозина на движение ТМ для всех трёх мутаций (рис. 8). Движение ТМ «дикого» типа в сторону внешнего домена актина сопровождается уменьшением количества головок миозина в состоянии сильного связывания, тогда как для ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys наблюдается сохранение некоторого количества головок в состоянии сильного связывания (в присутствии MgAMP-PNP Φ_E и N для AEDANS-S1 снижается на $1,4^\circ$ и $2,5^\circ$, и на $0,050$ и $0,050$ относительных единиц для мутаций Arg91Gly и Glu41Lys, соответственно; в присутствии MgATP снижение значений Φ_E и N составляет $0,7^\circ$ и $0,4^\circ$, и $0,021$ и $0,017$ относительных единиц ($P < 0,05$) для ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys, соответственно).

В присутствии MgAMP-PNP и MgATP, движение ТМ с мутациями Arg91Gly и Glu41Lys и ТМ «дикого» типа в сторону внешнего домена актина (рис. 6, А) сопровождается увеличением количества выключенных мономеров актина (рис. 7) (в присутствии MgAMP-PNP, Φ_E и $\theta_{1/2}$ меньше на $2,0^\circ$ и $0,3^\circ$ для мутации Arg91Gly и на $0,3^\circ$ и $0,7^\circ$ для мутации Glu41Lys; в присутствии MgATP эти величины также снижаются на $0,5^\circ$ и $1,1^\circ$ для мутации Arg91Gly, а для мутации Glu41Lys Φ_E не меняется, а $\theta_{1/2}$ снижается на $1,6^\circ$ ($P < 0,05$), соответственно, по сравнению с ТМ «дикого» типа).

Таким образом, несмотря на то, что в присутствии MgAMP-PNP и MgATP большая часть мономеров актина находится в выключенном состоянии, некоторое количество головок миозина сохраняют способность к сильному связыванию с актином, т.е. к формированию связывания, похожего на то, что наблюдаются в присутствии MgADP. Для ТМ «дикого» типа в присутствии MgAMP-PNP и MgATP переключение мономеров актина в выключенное состояние коррелирует с образованием слабых форм связывания актомиозина. Следовательно, мутации Arg91Gly и Glu41Lys в ТМ сдвигают равновесие в сторону образования сильных форм связывания головок миозина даже в присутствии АТФ. Как известно, миозин способен связываться электростатически с ТМ [Behrmann et al., 2012]. Таким образом, способность головок к сильным взаимодействиям с актином в присутствии АТФ может быть результатом изменения характера взаимодействия между головками миозина и ТМ, вызванного мутациями в последнем.

Следует отметить, что в присутствии АТФ похожий эффект сохранения некоторых головок в состоянии близком к состоянию сильного связывания, был обнаружен нами ранее, например, для мутации Lys169Arg в α -ТМ скелетных мышц [Rysev et al., 2015] и для мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном α -ТМ [Rysev et al., 2012]. Однако не было обнаружено таких эффектов для других мутаций: Например, для Glu40Lys в сердечном α -ТМ [Borovikov et al., 2011b], Gly126Arg в скелетном α -ТМ и гладкомышечном β -ТМ [Rysev et al., 2014] и Glu117Lys в скелетном β -ТМ [Karpicheva et al., 2014].

Так как значения $\theta_{1/2}$ для FITC-актина снижаются во всех экспериментах с ТМ, содержащим эти три мутации, мы предполагаем, что все эти мутации снижают сродство головок миозина к F-актину в течение цикла гидролиза АТФ.

Таким образом, все исследованные точечные мутации вызывают аномальное поведение тропомиозина в АТФазном цикле и приводят к дефектному ответу актина и миозина, что может быть одной из причин нарушения сократительной функции, описанной в литературе для мышечной ткани, содержащей эти мутантные формы тропомиозина [Muthuchamy et al., 1999; Sung et al., 2003; Kremneva et al., 2004; Ochala et al., 2008; Marston et al., 2013]. Так, мутация Arg91Gly сдвигает тяжи ТМ к внутреннему и внешнему доменам актина при имитации сильных и слабых форм связывания, соответственно. Это движение сопровождается увеличением количества головок миозина в сильной форме связывания на всех стадиях цикла гидролиза АТФ, что может быть одной из причин образования контрактур и мышечной слабости при дистальном артрогрипозе [Sung et al., 2003]. Мутация Glu139del стабилизирует тяжи ТМ около внутреннего домена актина на протяжении всего цикла гидролиза АТФ. Видимо, мутация Glu139del ингибирует формирование сильного связывания миозина с актином в АТФазном цикле. Мутация Glu41Lys, связанная с гипосократимостью, стабилизирует тяжи ТМ около внешнего домена актина в течение цикла гидролиза АТФ, приводя к уменьшению количества головок миозина в состоянии сильного связывания при моделировании сильной формы связывания и к увеличению количества таких головок миозина при моделировании слабого связывания. Такой ответ сократительной системы может быть причиной мышечной слабости при немалиновой миопатии [Donner et al., 2002].

Влияние мутации Gly126Arg в α - и β -изоформах ТМ на структурное состояние актина и ТМ при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне.

Интересно изучить влияние индуцированных мутаций в тропомиозине, не связанных с развитием какого-либо заболевания, на структуру и функцию сократительной системы мышечного волокна. Так, например, показано, что замены Gly126Arg и Asp137Leu вызывают стабилизацию центральной области молекулы тропомиозина и приводят к изменению регуляторных свойств тропомиозина [Sumida et al., 2008; Nevzorov et al., 2011]. Положительно заряженный остаток аргинина в позиции *g* гептоповтора, в отличие от глицина, не препятствует образованию α -спирали и образует солевой мостик с остатком глутаминовой кислоты в положении 131 противоположной цепи ТМ. Таким образом, замена Gly126Arg приводит к появлению канонического для этой позиции суперспирали ТМ аминокислотного остатка. Интересно отметить, что наличие в структуре неканонических остатков часто является необходимым условием для выполнения белками своих уникальных функций [Невzorov, 2011].

Для выяснения функциональной роли остатка Gly126 в данной работе ТМ и F-актин были модифицированы флуоресцентными красителями: 5-IAF был ковалентно связан с Cys190 α -скелетного и Cys36 β -гладкомышечного ТМ [Borovikov, et al., 2009a; Kulikova et al., 2006], FITC-фаллоидин связывался с F-актином теневых волокон в области желобка актина [Lorenz et al., 1993].

В соответствии с ранее опубликованными данными [Borovikov, et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b; Borovikov et al., 2011a; Karpicheva et al., 2013], включение 5-IAF-меченого рекомбинантного ТМ или FITC-фаллоидина в теневые мышечные волокна вызывает появление поляризованной флуоресценции. Анализ параметров поляризованной флуоресценции этих зондов позволил определить изменения в ориентации и подвижности актина и ТМ (см. Материалы и методы). Различные стадии АТФазного цикла АМ, АМ[^]-ADP, АМ'-ADP, АМ^x-ATP (А – актин, М – головки миозина) моделировали, соответственно, в отсутствие нуклеотида и в присутствии 3 мМ MgADP, 15 мМ MgAMP-PNP, 5 мМ MgATP [Goody, Hofmann, 1980; Roopnarine, Thomas, 1996].

Значение угла излучения диполей красителя (FITC-фаллоидина), связанного с актином (Φ_E), и параметр ϵ содержат информацию о пространственной ориентации и жёсткости на изгиб тонких филаментов [Borovikov, et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b; Borovikov et al., 2011a; Rysev et al., 2012 ; Karpicheva et al., 2013]. Увеличение значений Φ_E интерпретируется как вращение субъединиц актина к периферии тонкой нити [Borovikov et al., 2004; Avrova et al., 2012]. В соответствии с этим уменьшение значений Φ_E индуцированное мутацией Gly126Arg в α -скелетном и β -гладкомышечном ТМ (рис. 9, А) свидетельствует о ингибировании вращения мономеров актина.

В нашей работе обнаружено, что одиночная замена Gly126Arg изменяет пространственное расположение ТМ и субдомена 1 актина в мышечном волокне. Согласно рисунку 10, в отсутствие S1 значение угла излучения диполей красителя (5-IAF), связанного с ТМ (Φ_E), для α - и β -ТМ-AF с мутацией Gly126Arg значительно больше, чем для ТМ «дикого» типа. ТМ-AF с мутацией Gly126Arg смещен к внешнему домену F-актина. Уменьшение значения Φ_E для FITC-актина (рис. 9, А) свидетельствует о том, что в присутствии α - и β -ТМ с мутацией Gly126Arg ТМ возрастает относительное количество актиновых мономеров в выключенном состоянии. В присутствии S1 данная мутация, наоборот, приводит к увеличению относительного количества «включенных» мономеров актина (рис. 9). Этот эффект более выражен в отсутствие нуклеотида и в присутствии АТФ, когда ТМ с мутацией Gly126Arg ТМ сдвигается к внутреннему домену Ф-актина (к центру актиновой нити) сильнее, чем ТМ «дикого» типа (рис. 10, А.)

Актин-FITC-фаллоидин

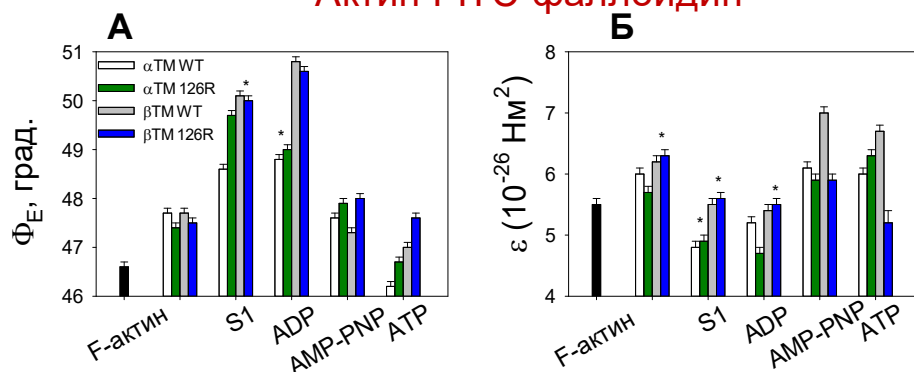


Рисунок 9. Влияние мутации Gly126Arg в α -скелетном и β -гладкомышечном ТМ на значения Φ_E (А) и ε (Б) поляризованной флуоресценции комплекса FITC-фаллоидин-актин при имитации промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. ε – значение жёсткости актиновой нити на изгиб. Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Gly126Arg.

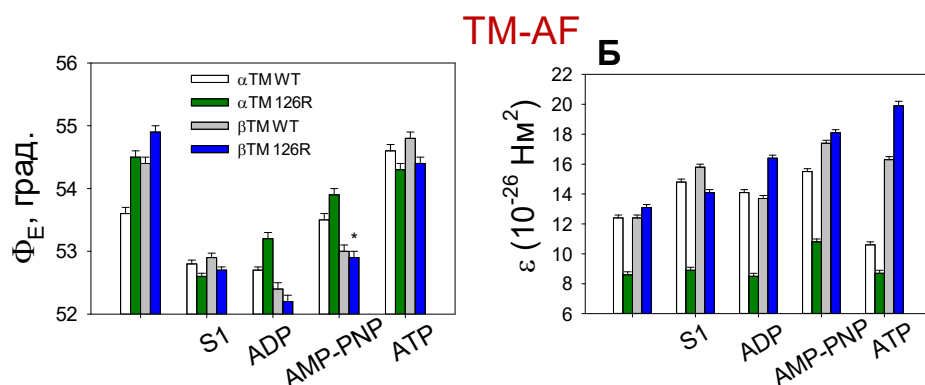


Рисунок 10. Влияние Gly126Arg мутации в α -скелетном и β -гладкомышечном ТМ на значения Φ_E (А) и ε (Б) поляризованной флуоресценции 5-IAF, связанного с ТМ при имитации промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ. Φ_E – угол между диполем излучения зонда и осью тонких нитей. ε – значение жёсткости ТМ тяжёлой на изгиб. Угол Φ_E дан с поправкой на вращение мономеров актина. Показаны стандартные ошибки среднего значения. Звёздочками отмечены недостоверные различия данных между WT-TM и Gly126Arg.

Недавно было показано, что замещение Gly126 на Arg в α -скелетном и β -гладкомышечном ТМ вызывает снижение гибкости центральной части молекулы ТМ [Nevzorov, 2011]. Наши данные показывают, что помимо влияния на центральную часть ТМ эта мутация также изменяет гибкость С-конца скелетного α -ТМ и N-конца β -гладкомышечного ТМ. Так, мутация Gly126Arg уменьшает жесткость на изгиб С-концевой области молекулы (область Cys190) на 31% в α -ТМ и слабо, на 6%, увеличивает жёсткость N-концевой части (область Cys36) β -ТМ (рис. 10, Б). Можно предположить, что изменения в жёсткости тяжёлой ТМ и F-актина происходят в результате конформационных изменений этих белков, вызванных изменениями электростатических связей между ТМ и F-актином [Rysev et al., 2012].

Связывание S1 с F-актином уменьшает жесткость на изгиб F-актина и увеличивает её для ТМ. Так, жесткость ТМ увеличивается на 19% для α -скелетного ТМ «дикого» типа, на 4% для мутантного α -ТМ и на 27% и 8% ($P < 0,05$) для β -гладкомышечных ТМ «дикого» типа и мутантного, соответственно. Эта иммобилизация может быть результатом связывания ТМ нитей с S1 [Behrmann et al., 2012]. По-видимому, замена Gly126 на Arg в α -скелетном и β -гладкомышечном ТМ изменяет характер связывания ТМ с S1. В соответствии с рисунком 10, Б, эта замена снижает иммобилизацию тяжелой цепи ТМ под действием S1, что может указывать на изменения в электростатических взаимодействиях между ТМ, актином и S1. Трудно исключить определенную роль связывания S1 с ТМ в молекулярном механизме мышечного сокращения [Behrmann et al., 2012]. Включение S1 в теневые волокна уменьшает жесткость F-актина на изгиб на 20% и 15% в присутствии α -скелетных ТМ «дикого» типа и ТМ с мутацией, соответственно, и на 12% и 11% ($P < 0,05$) в присутствии β -гладкомышечных ТМ «дикого» типа и ТМ с мутацией, соответственно. Это согласуется с тем, что S1 формирует сильную форму связывания с F-актином в АМ состоянии цикла гидролиза АТФ, что приводит к увеличению его подвижности [Borovikov et al., 2009a]. Замена Gly126 на Arg в ТМ не влияет на значения ϵ (рис. 9, Б), показывая, что конформационные изменения в ТМ, вызванные Gly126Arg мутацией вызывают лишь небольшие изменения в сродстве S1 к F-актину в соответствии с более ранними наблюдениями [Nevzorov et al., 2011].

Таким образом, применение реконструированных мышечных волокон позволило нам исследовать влияние мутации Gly126Arg на положение α -скелетного и β -гладкомышечного тропомиозина и мономеров актина и на гибкость ТМ и F-актина в цикле гидролиза АТФ. Было показано, что нуклеотиды, действующие через миозиновый мотор, изменяют структурное состояние актина и ТМ и могут нарушить равновесное состояние комплекса F-актин-ТМ-S1, стимулируя переход всех компонентов этого ансамбля (актина, миозина и ТМ) к другому структурному состоянию. Обе группы представленных здесь данных (рис. 9 и 10) и ранее полученные нами данные [Borovikov et al., 2009a; Borovikov et al., 2009b; Borovikov et al., 2011a; Karpicheva et al., 2013], показывают, что мутация Gly126Arg оказывает влияние на позицию ТМ и структурное состояние актина в АТФазном цикле. Характер этого влияния был противоположен тому, который вызывали мутации Glu54Lys, Glu40Lys и Glu117Lys. Таким образом, мутации, которые нарушают солевой мостик (мутации Glu54Lys, Glu40Lys и Glu117Lys), сдвигают ТМ в сторону закрытого положения и уменьшают число включенных мономеров актина во время АТФазного цикла, тогда как мутация Gly126Arg сдвигает ТМ к центру тонкой нити (в открытое положение), и увеличивает количество включенных мономеров актина (на рис. 9 и 10). Вполне вероятно, что изменения электростатического поля ТМ, вызванные этими мутациями, могут изменить позицию ТМ на актиновых нитях и таким способом оказать влияние на характер взаимодействия тропомиозина с актином и миозином в АТФазном цикле.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании АТФазного цикла в мышечном волокне переход от слабой формы связывания миозина с актином к сильной форме их связывания сопровождается постепенным смещением тропомиозина от периферии актиновой нити к ее центру и конформационными изменениями сократительных белков, которые приводят к увели-

чению относительного количества включенных мономеров актина и головок миозина, сильно связанных с актином.

2. Точечные мутации Glu180Gly и Asp175Asn в α -тропомиозине сердечных мышц, Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в β -тропомиозине скелетных мышц и Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных и β -тропомиозине гладких мышц изменяют характер движения тропомиозина в цикле гидролиза АТФ, что нарушает согласованность конформационных изменений актина и головок миозина.

3. Мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном α -тропомиозине и мутация Arg91Gly в β -тропомиозине приводят к смещению тропомиозиновых тяжей к центру нити, увеличению относительного количества включенных мономеров актина при моделировании сильных форм связывания головок миозина с актином, уменьшению доли таких мономеров при моделировании слабых форм связывания. Относительное количество головок миозина, способных к сильному связыванию с актином, возрастает при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ.

4. Замена Glu41Lys в β -тропомиозине смещает тропомиозин к периферии тонкой нити, что приводит к смещению равновесия в сторону выключения мономеров актина на всех стадиях цикла гидролиза АТФ; при этом относительное количество головок миозина, сильно связанных с актином, уменьшается при моделировании сильных форм связывания миозина с актином и возрастает при моделировании слабых форм связывания.

5. Мутация Glu139del приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити, что вызывает выключение мономеров актина и уменьшение относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином, на всех стадиях цикла гидролиза АТФ.

6. Замена Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных мышц и β -тропомиозине гладких мышц обуславливает смещение тропомиозина к центру нити, существенно увеличивает жесткость тропомиозина, что вызывает возрастание относительного количества включенных мономеров актина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Borovikov Y.S., Rysev N.A., Karpicheva O.E., Redwood C.S. (2011) Hypertrophic cardiomyopathy-causing Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations shift tropomyosin strands further towards the open position during the ATPase cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407(1): 197-201.
2. Rysev N.A., Karpicheva O.E., Redwood C.S., Borovikov Y.S. (2012) The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1824(2): 366-373.
3. Боровиков Ю.С., Карпичева О.Е., Рысев Н.А., Рэдвуд Ч.С. (2013) Аномальное поведение тропомиозина в АТФазном цикле при дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии. *Росс. физиол. ж. им. И.М. Сеченова.* 99(1): 73-80.
4. Rysev N.A., Nevzorov I.A., Avrova S.V., Karpicheva O.E., Redwood C.S., Levitsky D.I., Borovikov Y.S. (2014) Gly126Arg substitution causes anomalous behaviour of α -skeletal and β -smooth tropomyosins during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 543: 57-66.

5. Borovikov Y.S., Avrova S.V., Rysev N.A., Sirenko V.V., Simonyan A.O., Chernev A.A., Karpicheva O.E., Piers A., Redwood C.S. (2015) Aberrant movement of β -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 577-578:11-23.

Данное исследование проводилось при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-31527а, 14-04-00454а, 11-04-00244а, 08-04-00960а) и программой Президиума РАН (тема № 7).

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Иванов И.И., Юрьев В.А., (1961) Медгиз, Ленинград.
- Невзорov И. А., (2011) *Автореф. дисс. канд. биол. наук*: 03.01.04 – М., 2011.
- Avrova S.V. et al., (2012) *Arch Biochem Biophys* 521(1-2):1-9
- Borejdo J., Putnam S., (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 459:578-595.
- Borejdo J. et al., (2006) *Biochim. Biophys. Acta* 1763:137-140.
- Borovikov Y.S., (1999) *Int. Rev. Cytol.* 189:267-301.
- Borovikov Y.S. et al., (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1478:138-151.
- Borovikov Y.S. et al., (2004) *Biophys. J.* 86:3020-3029.
- Borovikov Y.S. et al., (2009a) *Biochim. Biophys. Acta* 1794:985-94.
- Borovikov Y.S. et al., (2009b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381:403-6.
- Borovikov Y.S. et al., (2011a) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 407:197-201
- Borovikov Y.S. et al., (2011b) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 411:496-500.
- Behrmann E. et al., (2012) *Cell* 150(2):327-38.
- Donner K. et al., (2002) *Neuromuscul Disord.* 12(2):151-8
- Gałazkiewicz B. et al., (1987) *Biochim Biophys Acta.* 916:368-375.
- Galińska-Rakoczy A. et al., (2008) *J. Mol. Biol.* 379:929-935.
- Geeves M.A., Holmes K.C., (2005) *Adv. Protein Chem.* 71:161-193.
- Goody R.S., Hofmann W., (1980) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1:101-115.
- Houmeida A. et al., (2010) *J. Biol. Chem.* 285:32760-32769.
- Karpicheva O.E. et al., (2013) *Arch Biochem Biophys.* 536(1):25-30.
- Karpicheva O.E. et al., (2014) *Arch Biochem Biophys.* 549:12-6.
- Kremneva E. et al., (2004) *Biophys. J.* 87(6):3922-3933.
- Kulikova N. et al., (2006) *Biochem Biophys Res Commun.* 345(1):280-6
- Laemmli U.K., (1970) *Nature* 227:680-685.
- Lamkin M., et al., (1983) *Biochemistry* 22:3053-3058.
- Lehman W. et al., (2013) *J Muscle Res Cell Motil.* 34(3-4):155-63
- Lorenz M. et al., (1993) *J Mol Biol.* 234(3):826-36.
- Marston S. et al., (2013) *Hum. Mol. Genet.* 22(24):4978-4987.
- Marttila M. et al., (2012) *Biochem. J.* 442(1):231-239.
- McKillop D.F.A., Geeves M.A. (1993) *Biophys. J.* 65:693-701.
- Miki M., et al., (1987) *Eur. J. Biochem.* 168:339-345.
- Miki M. et al., (2012) *J Mol Biol.* 420(1-2):40-55.
- Mirza M. et al., (2005) *J. Biol. Chem.* 280:28498-28506.
- Monteiro P.B. et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269:10461-10466.
- Muthuchamy et al., (1999) *Circ Res.* 85(1):47-56.
- Nevzorov I.A. et al., (2008) *J Muscle Res Cell Motil.* 29(6-8):173-6.
- Nevzorov et al., (2011) *J. Biol. Chem.* 286:15766-15772.
- Prochniewicz-Nakayama E., et al., (1983) *J. Cell Biol.* 97:1663-1667.
- Ochala J, et al., (2008) *J. Physiol.* 586(Pt 12):2993-3004.
- Olson T.M., et al., (2001) *J. Mol. Cell Cardiol.* 33:723-732.
- Robinson P. et al., (2007) *FASEB J.* 21:896-905.
- Roopnarine O., Thomas D.D., (1996) *Biophys. J.* 70:2795-806.
- Rysev N.A. et al., (2012) *Biochim Biophys Acta.* 1824(2):366-73.

- Rysev N.A. et al., (2014) *Arch Biochem Biophys.* 543:57-66.
- Rysev N.A. et al., (2015) *In Abstracts of 44rd European muscle conference*, Warsaw, Poland, 9.
- Spudich J.A., Watt S., (1971) *J. Biol. Chem.* 246:4866-4871.
- Sliwińska M., et al., (2011) *Cytoskeleton* 68(5):300-312.
- Sumida J.P., et al., (2008) *J. Biol. Chem.* 283(11):6728-6734.
- Sung S.S. et al. (2003) *Am. J. Hum. Genet.* 72(3):681-690.
- Tajsharghi H. et al., (2012) *Neuromuscul Disord.* 22(11):923-933.
- Thierfelder L. et al., (1994) *Cell.* 77(5):701-712.
- Wallgren-Pettersson C. et al., (2011) *Semin Pediatr Neurol.* 18(4):230-8.
- Weeds A.G., Pope B., (1977) *J. Mol. Biol.* 111:129-157.
- White S.P et al., (1987) *Nature* 325:826-8.
- Yanagida T., Oosawa F., (1978) *J. Mol. Biol.* 126:507-24.