

ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА КАЛЬЦИЕВУЮ РЕГУЛЯЦИЮ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЗАВИСИТ ОТ ИЗОФОРМ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА

© 2019 г. С.Р. Набиев, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

E-mail: g.rodionova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.06.2019 г.

После доработки 21.06.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

Кроме тропонина и тропомиозина, в регуляции актин-миозинового взаимодействия в миокарде участвует белок сМуВР-С (сердечный миозинсвязывающий белок С), который влияет на функцию миозина и активацию тонких нитей. В медленных скелетных мышцах экспрессируется та же самая β -изоформа тяжелых цепей миозина, что и в миокарде, но миозин медленных скелетных мышц и сердечный миозин отличаются изоформами легких цепей. Мы исследовали влияние сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина медленной скелетной мышцы (*m. soleus*) с актином, используя *in vitro* подвижную систему и оптическую ловушку. Обнаружено, что в физиологической концентрации сМуВР-С увеличивал кальциевую чувствительность скорости скольжения регулируемых тонких нитей по миозину из *m. soleus* и, в отличие от сердечного миозина, увеличивал скорость тонких нитей. В оптической ловушке сМуВР-С не влиял на шаг миозина, но уменьшал продолжительность одиночного актин-миозинового взаимодействия, что объясняет увеличение скорости нитей в *in vitro* подвижной системе. Таким образом, сМуВР-С по-разному проявляет свои регуляторные свойства в зависимости от изоформного состава легких цепей миозина.

Ключевые слова: миозин, актин-миозинное взаимодействие, сердечный миозинсвязывающий белок С, оптическая ловушка, *in vitro* подвижная система.

DOI: 10.1134/S0006302919050041

Сокращение поперечнополосатых мышц является результатом взаимодействия толстых миозиновых нитей с тонкими нитями, состоящими из актина и регуляторных белков тропонина и тропомиозина. Кроме тропонина и тропомиозина, в регуляции актин-миозинового взаимодействия в миокарде принимает участие сердечный миозинсвязывающий белок С (сМуВР-С) [1–7]. Этот белок располагается в С-зоне в области перекрытия толстых и тонких нитей саркомера кардиомиоцита [8]. сМуВР-С имеет стержнеобразную форму, его длина — 48 нМ, молекулярная масса — около 140–150 кДа. Молекула сМуВР-С состоит из восьми иммуноглобулиновых и трех фибронектиновых доменов от С0 на N-конце до С10 на С-конце. сМуВР-С взаимодействует с миозином в нескольких местах: С-конец (домены

С7–С10) связывает стержневую часть молекулы миозина [9]; N-конец (домены С1 и С2) — субфрагмент 2 миозина [10–12], а домен С0 — регуляторную легкую цепь миозина [10,13]. N-концевые домены (С0–С2) и линкерные участки между ними связывают актин [14–17]. Показано, что домен С1 может взаимодействовать с тропомиозином [18]. Взаимодействие N-концевых доменов сМуВР-С с белками тонкой нити модулирует ее активацию [19–22], тем самым сМуВР-С влияет на сократимость миокарда, особенно при фофорилировании, вызванном β -адренергической стимуляцией [23–26].

В экспериментах на мышечных волокнах обнаружено, что сМуВР-С увеличивает кальциевую чувствительность зависимости «рСа — сила» [27,28]. С помощью *in vitro* подвижной системы (ИПС) показано, что добавление как полноразмерного сМуВР-С, так и его N-концевых доменов увеличивает кальциевую чувствительность скорости скольжения тонких нитей по миозину

Сокращения: сМуВР-С — сердечный миозинсвязывающий белок С, ИПС — *in vitro* подвижная система, ELC — «существенная» легкая цепь.

[29–31], а также уменьшает максимальную скорость скольжения нитей как по скелетному миозину и его протеолитическим субфрагментам [29,30], так и по сердечному миозину [31].

В медленных скелетных мышцах экспрессируется та же самая β -изоформа тяжелых цепей миозина, что и в миокарде. Миозин из медленных скелетных мышц содержит изоформы «существенной» (ELC) легкой цепи, характерные для медленных скелетных мышц. В связи с тем, что сМуВР-С взаимодействует с регуляторной легкой цепью, а легкие цепи принимают участие в силогенерации миозина, можно предположить, что эффект сМуВР-С на взаимодействие с тонкой нитью сердечного миозина и миозина из медленных скелетных мышц будет различен. Мы исследовали влияние сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина медленной скелетной мышцы (*m. soleus*) с актином, используя *in vitro* подвижную систему и оптическую ловушку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Миозин выделяли из *m. soleus* кроликов по методу, описанному в работе [32]. Миозин содержал преимущественно медленную изоформу I тяжелых цепей миозина и изоформы легких цепей, соответствующие медленному скелетному миозину. Актин получали из *m. psoas* кролика по стандартной методике [33]. Мономерный G-актин полимеризовали, увеличивая концентрации KCl до 100 мМ, АТФ — до 2 мМ и MgCl₂ — до 4 мМ. Тропонин и тропомиозин экстрагировали из левого желудочка сердца быка [34,35]. Регулируемые тонкие нити, содержащие F-актин, тропомиозин и тропонин, реконструировали прямо в проточной ячейке [36].

сМуВР-С выделяли из куриных сердец по методу, описанному в работе [37], с небольшими модификациями [31]. После экстракции сМуВР-С осаждали сульфатом аммония до финального насыщения 55% и растворяли в буфере, содержащем 70 мМ KCl, 10 мМ MES, 2 мМ NaN₃, 0,1 мМ ЭДТА, 3 мМ 2-меркаптоэтанола, pH 6,45, затем диализовали против этого же буфера. После диализа сМуВР-С очищали с помощью жидкостной хроматографии на пятимиллилитровой колонке HiTrap Q HP (AKTA basic 10 FPLC, Amersham Biosciences, США) с линейным градиентом от 70 до 300 мМ NaCl в буфере следующего состава: 10 мМ MES, 2 мМ NaN₃, 0,1 мМ ЭДТА, 3 мМ 2-меркаптоэтанола, pH 6,45. сМуВР-С, который сходил с колонки в области 90–130 мМ по NaCl, концентрировали добавлением сульфата аммония с последующим центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин. Осажденный сМуВР-С растворяли буфером АВ (25 мМ KCl,

25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ ДТТ, pH 7,5), содержащем 80 мМ KCl, и диализовали против этого же буфера.

Чистоту полученных белков и изоформный состав тяжелых и легких цепей миозина проверяли с помощью вертикального денатурирующего гель-электрофореза [31].

Эксперименты в оптической ловушке и в *in vitro* подвижной системе проводили, как описано ранее [31,36,38]. С помощью оптической ловушки измеряли шаг миозина и продолжительность актин-миозинового взаимодействия. В *in vitro* подвижной системе (ИПС) исследовали влияние сМуВР-С на кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей. сМуВР-С добавляли в проточную ячейку вместе с миозином. Концентрации миозина и сМуВР-С, загружаемых в проточную камеру в экспериментах в ИПС, составляли соответственно 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), а в оптической ловушке — 5 мкг/мл (0,011 мкМ) и 0,33 мкг/мл (0,002 мкМ), что соответствует их отношению в мышце.

Кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей аппроксимировали уравнением Хилла: $V = V_{\max}(1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})})^{-1}$, где V и $V_{\max}$ — соответственно скорость и максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция; pCa_{50} (кальциевая чувствительность) — значение, при котором достигается полумаксимальная скорость скольжения филаментов; h — коэффициент кооперативности Хилла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина из *m. soleus* с актином. Для исследования влияния сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия миозина из медленной мышцы с актином мы проанализировали кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей в ИПС (рис. 1). Обнаружено, что влияние сМуВР-С на зависимость « pCa — скорость» миозина из *m. soleus* и сердечного миозина [31] существенно различается. сМуВР-С не влиял на коэффициент кооперативности Хилла зависимости « pCa — скорость» миозина из медленной мышцы, увеличивал ее кальциевую чувствительность и скорость скольжения тонких нитей при всех концентрациях кальция (рис. 1; табл. 1). Ранее для сердечного миозина было показано, что сМуВР-С уменьшает максимальную скорость скольжения тонких нитей и коэффициент кооперативности Хилла, но увеличивает кальциевую чувствительность скорости [31].

Влияние сМуВР-С на характеристики одиночного взаимодействия миозина с актином. С помо-

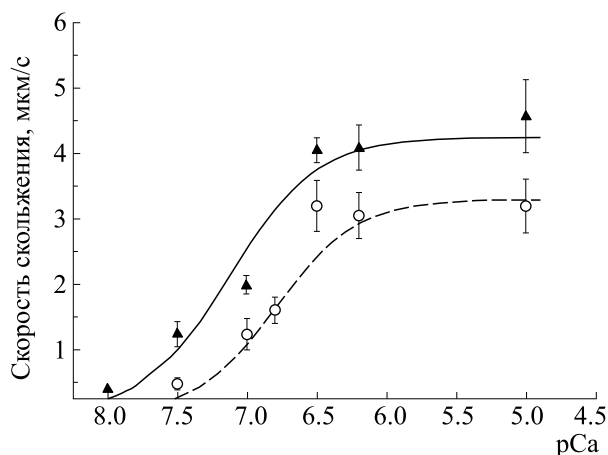


Рис. 1. Влияние сМуВР-С на кальциевую зависимость скорости скольжения тонких филаментов по миозину, выделенному из медленной скелетной мышцы (*m. soleus*), без сМуВР-С (треугольники) и в присутствии сМуВР-С при соотношении сМуВР-С : миозин, равном 1 : 5 (кружки). Скорость представлена как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла, значения параметров уравнения Хилла представлены в табл. 1.

щью оптической ловушки были измерены величина шага миозина и продолжительность его взаимодействия с F-актином. Обнаружено, что сМуВР-С не влияет на размер шага миозина, но уменьшает продолжительность его взаимодействия с актином в 1,7 раза (рис. 2; табл. 2), что может объяснять увеличение скорости скольжения нитей по миозину из медленной мышцы, так как скорость скольжения нитей в ИПС обратно пропорциональна продолжительности актин-миозинового взаимодействия [39].

Взаимодействие сМуВР-С с миозином, а именно с его регуляторной легкой цепью, может объяснить различие его эффектов на характеристики кальциевой регуляции взаимодействия сердечного миозина и миозина из *m. soleus* с актином. С помощью ядерного магнитного резонанса и дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что домен С0 в сМуВР-С спо-

собен связываться с регуляторной легкой цепью сердечного миозина [13], при этом фрагмент С1—С2 взаимодействует с субфрагментом 2 миозина [10–12]. Это может менять ориентацию головок миозина [13], влияя на их взаимодействие с актином, которое зависит от изоформ легких цепей миозина. Известно, например, что предсердная изоформа ELC — aELC, в отличие от желудочковой vELC, не взаимодействует с актином и что экспрессия aELC в миокарде желудочков крыс приводит к изменению сократительных характеристик миокарда [40,41]. На изолированных мышечных белках показано, что кинетика взаимодействия головки миозина с актином различается для изоформ миозина, содержащих aELC и vELC [38, 42]. Поэтому важно исследовать влияние изоформ легких цепей на взаимодействие сМуВР-С с миозином. Для изучения этого влияния мы использовали медленный скелетный миозин и сравнили полученные данные с результатами исследований на сердечном миозине. Медленный скелетный миозин содержит в своем составе ту же β -цепь, кодируемую геном *MYH7*, что и сердечный миозин. В составе медленного скелетного миозина кролика имеются легкие цепи LC1sa, LC1sb и sLC2 [43,44]. LC1sb и sLC2 экспрессируются также в миокарде [44,45]. Медленный скелетный миозин представляет собой смесь двух типов миозинов, содержащих в своем составе либо LC1sa, либо LC1sb. Показано, что волокна с преимущественным содержанием LC1sa генерировали большие силы и обладали меньшей скоростью ненагруженного укорочения, чем волокна с LC1sb [44].

Наши результаты показали, что из-за наличия специфической изоформы LC1sa, регуляторный эффект сМуВР-С отличается для медленного скелетного и сердечного миозина, и сМуВР-С сокращает время одиночного взаимодействия миозина из *m. soleus* с актином. Результаты, полученные в ИПС, можно объяснить тем, что сМуВР-С уменьшает время присоединенного к актину состояния, благодаря чему увеличивается скорость скольжения тонких нитей.

Таким образом, сМуВР-С оказывает существенное влияние на кальциевую регуляцию вза-

Таблица 1. Влияние сМуВР-С на характеристики зависимости «рСа — скорость»

Концентрация сМуВР-С, мкМ	$V_{\max}$, мкм/с	pCa_{50}	h
0	3.2 ± 0.2	6.80 ± 0.01	1.49 ± 0.08
0.13	$4.2 \pm 0.2^*$	$7.13 \pm 0.08^*$	1.39 ± 0.07

Примечание. V и $V_{\max}$ — скорость и максимальная скорость скольжения тонких филаментов при насыщающей концентрации кальция соответственно; pCa_{50} (кальциевая чувствительность) — значение, при котором достигается полумаксимальная скорость скольжения филаментов; h — коэффициент кооперативности Хилла. Символом * обозначены отличия параметров уравнения Хилла зависимости «рСа — скорость», полученной в присутствии сМуВР-С, от значений зависимости «рСа — скорость» без сМуВР-С ($p < 0,05$).

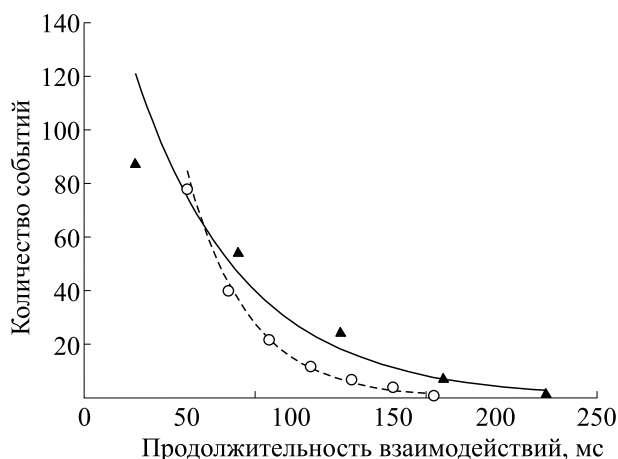


Рис. 2. Распределение продолжительности одиночных взаимодействий миозина с актином без сМуВР-С (треугольники) и в присутствии сМуВР-С при соотношении сМуВР-С : миозин, равном 1 : 5 (кружки).

имодействия миозина из медленной скелетной мышцы с актином, а также на продолжительность актин-миозинового взаимодействия. Эффекты сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия сердечного миозина и миозина из медленной скелетной мышцы с актином различаются, что может объясняться отличием изоформного состава легких цепей этих миозинов, т.е. регуляторные свойства сМуВР-С зависят от изоформ миозина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят С.Ю. Бершицкого за конструктивные предложения при работе над текстом рукописи.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

Таблица 2. Влияние сМуВР-С на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия

Концентрация сМуВР-С, мкМ	d , нм	t , мс
0	10 ± 4 (279)	52.6 ± 7.0
0.13	9 ± 3 (233)	$29.8 \pm 5.4^*$

Примечание. d — Размер шага, представлен как среднее $\pm SD$; t — продолжительность взаимодействия, представлена как среднее $\pm SEM$. В скобках указано количество проанализированных взаимодействий. Символом * обозначено статистически значимое отличие продолжительности взаимодействия с сМуВР-С от миозина без сМуВР-С. Достоверность оценивали по t -тесту Стьюдента на уровне $p < 0,05$.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-20085) и Программы АААА-А18-118020590135-3.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Offer, C. Moos, and R. Starr, *J. Mol. Biol.* **74**, 653 (1973).
2. P. A. Hofmann, H. C. Hartzell, and R. L. Moss, *J. Gen. Physiol.* **97**, 1141 (1991).
3. S. P. Harris, C. R. Bartley, T. A. Hacker, et al., *Circ. Res.* **90**, 594, (2002).
4. F. S. Korte, K. S. McDonald, S. P. Harris, and R. L. Moss, *Circ. Res.* **93**, 752, (2003).
5. O. Cazorla, S. Szilagyi, N. Vignier, et al., *Cardiovasc. Res.* **69**, 370 (2006).
6. T. J. Herron, E. Rostkova, G. Kunst, et al., *Circ. Res.* **98**, 1290 (2006).
7. W. Saber, K. J. Begin, D. M. Warshaw, P. and. Van-Buren, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44**, 1053 (2008).
8. P. Bennett, R. Craig, R. Starr, and G. Offer, *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **7**, 550 (1986).
9. E. Flashman, C. Redwood, J. Moolman-Smook, and H. Watkins, *Circ. Res.* **94**, 1279 (2004).
10. R. Starr and G. Offer, *Biochem. J.* **171**, 813 (1978).
11. M. Gruen and M. Gautel, *J. Mol. Biol.* **286**, 933 (1999).
12. M. S. Bhuiyan, P. McLendon, J. James, et al., *Pflugers Arch.* **468**, 1685 (2016).
13. J. Ratti, E. Rostkova, M. Gautel, and M. Pfuhl, *J. Biol. Chem.* **286**, 12650 (2011).
14. J. M. Squire, P. K. Luther, and C. Knupp, *J. Mol. Biol.* **331**, 713 (2003).
15. C. Moos, C. M. Mason, J. M. Besterman, et al., *J. Mol. Biol.* **124**, 571 (1978).
16. A. Orlova, V. E. Galkin, C. M. Jeffries, et al., *J. Mol. Biol.* **412**, 379 (2011).
17. A. Weith, S. Sadayappan, J. Gulick, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012 Jan;52(1):219-27.
18. S. P. Harris, B. Belknap, R. E. Van Sciver, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 1558 (2016).
19. J. Y. Mun, M. J. Previs, H. Y. Yu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 2170 (2014).
20. T. Kampourakis, Z. Yan, M. Gautel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 18763 (2014).
21. M. J. Previs, J. Y. Mun, A. J. Michalek, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 3239 (2016).
22. C. Risi, B. Belknap, E. Forgacs-Lonart, et al., *Structure* **26**, 1604 (2018).
23. S. Sadayappan, J. Gulick, H. Osinska, et al., *Circ. Res.* **109**, 141 (2011).

24. C. W. Tong, X. Wu, Y. Liu, et al., *Circ. Heart Fail.* **8**, 595 (2015).
25. K. S. Gresham, R. Mamidi, J. Li, et al., *J. Appl. Physiol.* **122**, 520 (2017).
26. R. Mamidi, K. S. Gresham, J. Li, and J. E. Stelzer, *Sci. Adv.* **3**, e1602445 (2017).
27. C. C. Witt, B. Gerull, M. J. Davies, et al., *J. Biol. Chem.* **276**, 5353 (2017).
28. O. Cazorla, S. Szilagyi, N. Vignier, et al., *Cardiovasc. Res.* **69**, 370 (2016).
29. M. V. Razumova, J. F. Shaffer, A. Y. Tu, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 35846 (2006).
30. W. Saber, K. J. Begin, D. M. Warshaw, and P. Van-Buren, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44**, 1053 (2006).
31. D. V. Shchepkin, G. V. Kopylova, L. V. Nikitina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 159 (2010).
32. S. S. Margossian and S. Lowey, *Methods Enzymol.* **85**, 55 (1982).
33. J. D. Pardee and J. A. Spudich, *Methods Enzymol.* **85**, 164 (1982).
34. J. D. Potter, *Methods Enzymol.* **85**, 241 (1982).
35. L. B. Smillie, *Methods Enzymol.* **85**, 234 (1982).
36. A. M. Matyushenko, D. V. Shchepkin, G. V. Kopylova, et al., *Biochemistry* **56**, 250 (2017).
37. H. C. Hartzell, *J. Biol. Chem.* **259**, 15587 (1984).
38. G. Kopylova, S. Nabiev, L. Nikitina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **476**, 648 (2016).
39. K. A. Palmiter, M. J. Tyska, D. E. Dupius, et al., *J. Physiol.* **519**, 669 (1999).
40. M. C. Schaub, M. A. Hefti, R. A. Zuellig, and I. Morano, *Cardiovasc. Res.* **37**, 381 (1998).
41. K. Kazmierczak, Y. Xu, M. Jones, et al., *J. Mol. Biol.* **387**, 706 (2009).
42. H. Yamashita, S. Sugiura, H. Fujita, et al., *Cardiovasc. Res.* **60**, 580 (2003).
43. O. Andrucho, O. Andruchova, Y. Wang, and S. Galler, *J. Physiol.* **571**, 231 (2006).
44. P. J. Reiser, S. Bicer, *Arch. Biochem. Biophys.* **456**, 112 (2006).
45. F. Sheikh, R. C. Lyon, and J. Chen, *Gene* **569**, 14 (2015).

The Effect of Cardiac Myosin-Binding Protein C on Calcium Regulation of the Actin-Myosin Interaction Depends on Myosin Light Chain Isoforms

S.R. Nabiev, G.V. Kopylova, and D.V. Shchepkin

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
Pervomayskaya ul. 106, Yekaterinburg, 620049 Russia*

In addition to troponin and tropomyosin, cMyBP-C (cardiac myosin-binding protein C) that has an effect on the function of myosin and thin filament activation, is involved in regulation of the actin-myosin interaction in the myocardium. The β -myosin heavy chains isoform expressed in slow skeletal muscles is identical to that in the myocardium, but myosin isoforms in slow skeletal muscles and in cardiac muscle differ in the composition of myosin light chain isoforms. We investigated the effect of cMyBP-C on calcium regulation of the interaction of slow skeletal muscle myosin (m. soleus) with actin, using an in vitro motility assay and an optical trap. It was found that physiological concentration of cMyBP-C resulted in increased calcium sensitivity of the sliding velocity of regulated thin filaments over myosin extracted from slow soleus muscle, and as opposed to cardiac myosin, increased the speed of thin filaments. In the optical trap, cMyBP-C did not affect the step size of myosin but reduced the duration of a single actin-myosin interaction, thereby explaining the increase in the velocity of filaments in the in vitro motility assay. Thus, the regulatory properties of cMyBP-C are exhibited in different ways depending on the composition of myosin light chain isoforms.

Keywords: myosin, actin-myosin interaction, cardiac myosin-binding protein C, optical trap, in vitro motility assay