

УДК 577.112.7

## СВОЙСТВА СЕРДЕЧНОГО МИОЗИНА С КАРДИОМИОПАТИЧЕСКИМИ МУТАЦИЯМИ В СУЩЕСТВЕННЫХ ЛЁГКИХ ЦЕПЯХ

© 2022 Д.С. Ямпольская<sup>1</sup>, Г.В. Копылова<sup>2</sup>, Д.В. Щепкин<sup>2</sup>, С.Ю. Бершицкий<sup>2</sup>,  
А.М. Матюшенко<sup>1</sup>, Д.И. Левицкий<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
119071 Москва, Россия; электронная почта: levitsky@inbi.ras.ru

<sup>2</sup> Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049 Екатеринбург, Россия

Поступила в редакцию 22.09.2022

После доработки 05.10.2022

Принята к публикации 05.10.2022

Исследовано влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в гене *MYL3*, кодирующем существенные лёгкие цепи миозина желудочков сердца человека (ELCv), на функциональные свойства сердечного миозина и его изолированной головки (субфрагмент 1 миозина, S1). Показано, что только одна мутация, M149V, заметно повышает активируемую актином АТРазную активность S1. Все мутации существенно повышали Ca<sup>2+</sup>-чувствительность скорости скольжения тонких филаментов по поверхности с иммобилизованным миозином в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay). При этом мутации E56G и M149V почти в 2 раза снижали скорость скольжения нитей актина и регулируемых тонких филаментов, тогда как мутация E177G не меняла скорость скольжения. Таким образом, несмотря на то что все исследованные мутации в ELCv участвуют в развитии гипертрофической кардиомиопатии, механизмы их влияния на актин-миозиновое взаимодействие различны.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** миозин, существенные лёгкие цепи миозина, кардиомиопатические мутации, сердечная мышца, молекулярный механизм мышечного сокращения.

DOI: 10.31857/S0320972522110069, EDN: LVOCEK

### ВВЕДЕНИЕ

В основе молекулярного механизма мышечного сокращения лежит циклическое взаимодействие головок миозина с актиновыми филаментами, сопряжённое с гидролизом АТФ. Молекула мышечного миозина состоит из двух тяжёлых и четырёх лёгких цепей; N-концевые области тяжёлых цепей образуют глобулярные головки, каждая из которых содержит активный центр АТРазы и участки связывания актина [1]. Изолированная миозиновая головка, называемая субфрагментом 1 миозина (S1), состоит из двух главных структурных доменов, известных как моторный (или каталитический) домен и регуляторный домен. Моторный домен

отвечает за гидролиз АТФ и связывание актина, тогда как регуляторный домен представляет собой длинную α-спираль, стабилизируемую нековалентными взаимодействиями с двумя лёгкими цепями – существенной (Essential Light Chain, ELC) и регуляторной (Regulatory Light Chain, RLC) [2]. Функционирование миозиновой головки в качестве молекулярного мотора включает поворот регуляторного домена относительно моторного домена, вызываемый глобальными конформационными перестройками, происходящими в моторном домене в процессе АТРазного цикла, при котором регуляторный домен действует как рычаг («lever arm») [1, 3]. Важную роль при этом играет ELC, стабилизирующая α-спираль регуляторного домена головки, с которой она ассоциирована своей C-концевой частью. Имеются данные о том, что при повороте регуляторного домена в процессе АТРазного цикла C-концевая часть ELC способна взаимодействовать с моторным доменом головки [4–7], а её уни-

Принятые сокращения: ELC – существенные лёгкие цепи миозина; ELCv – ELC желудочков сердца; HCM – гипертрофическая кардиомиопатия; RLC – регуляторные лёгкие цепи миозина; S1 – субфрагмент 1 миозина; Tn – тропонин; Tpm – тропомиозин.

\* Адресат для корреспонденции.

кальная *N*-концевая часть – как с моторным доменом [8], так и с актином [9].

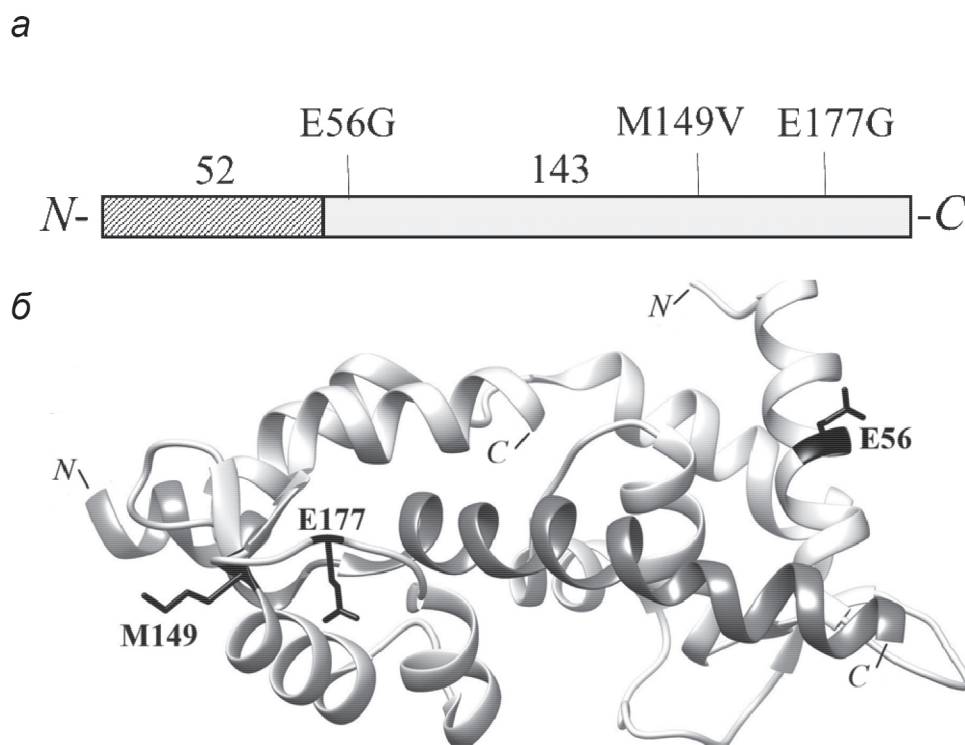
ELC играют важную роль в функционировании сердечного миозина. Изменение экспрессии изоформ ELC влияет на сократительную функцию миокарда [10]. Нарушения в первичной структуре ELC миозина желудочков сердца человека (ventricular ELC, ELC<sub>v</sub>), вызываемые мутациями в гене *MYL3*, кодирующем ELC<sub>v</sub>, связаны с развитием такого тяжёлого наследственного заболевания сердца человека, как гипертрофическая кардиомиопатия (HCM), которая характеризуется утолщением стенок левого желудочка, фиброзом и диастолической дисфункцией миокарда, что может приводить к нарушениям сердечного ритма вплоть до внезапной остановки сердца. К настоящему времени известно уже 13 аминокислотных замен в ELC<sub>v</sub> человека, вызываемых мутациями в гене *MYL3*, которые ассоциированы с развитием HCM: E56G, A57G, R63C, V79I, R81H, G128C, E143K, M149V, E152K, R154H, H155D, M173V и E177G [11]. Важно отметить, что все эти замены расположены в той области ELC<sub>v</sub>, которая взаимодействует с  $\alpha$ -спиралью тяжёлой цепи регуляторного домена миозиновой головки [11]. При этом никаких мутаций, ассоциированных с HCM, не было обнаружено в области 52 *N*-концевых остатков ELC<sub>v</sub>, где расположены функционально важные участки, ответственные за взаимодействие с актином [9, 11]. Некоторое исключение составляют, по-видимому, лишь мутации E56G и A57G, которые расположены довольно близко от *N*-концевого сегмента ELC<sub>v</sub>.

Следует отметить, что для большинства мутаций в гене *MYL3*, ассоциированных с развитием HCM, почти ничего пока не известно об их влиянии на свойства сердечного миозина. Данные таких экспериментов, хотя и в немногочисленном количестве, имеются лишь для нескольких мутаций (E56G, A57G, M149V и M173V). Так, например, было показано, что мутация E56G резко снижает сродство ELC<sub>v</sub> к участку её взаимодействия с тяжёлой цепью миозина в регуляторном домене миозиновой головки [12], а также снижает жёсткость молекулы миозина, изометрическую силу мышечных волокон и скорость скольжения актиновых филаментов по миозину в искусственной системе подвижности [13]. Помимо этого, интересные данные были получены методом FRET с высоким временным разрешением (Time-resolved fluorescence energy transfer, TR-FRET), который позволяет быстро измерять расстояния между головкой миозина и актином непосредственно в процессе АТРазного цикла актомиозина, при

переходах головки из состояния слабого связывания с актином в состояние сильного связывания и наоборот. Было показано, что при насыщающей концентрации АТР мутация E56G в ELC<sub>v</sub> заметно сдвигает равновесие между состояниями слабого и сильного связывания в процессе АТРазного цикла в сторону сильного связывания, не оказывая при этом влияния на активируемую актином АТРазу сердечного S1 и на его сродство к актину. Авторы предположили, что именно такой сдвиг в равновесии может приводить к развитию фенотипа с повышенной сократимостью сердца у людей с кардиомиопатической мутацией E56G в гене *MYL3* [14].

Интересные данные были также получены при сравнении эффектов, вызываемых мутациями A57G и M173V в ELC<sub>v</sub> миозина у трансгенных мышей. Было показано, что мутация A57G в ELC<sub>v</sub> миозина повышает  $Ca^{2+}$ -чувствительность развития силы мышечными волокнами намного сильнее, чем мутация M173V; напротив, мутация M173V заметно снижает активируемую актином АТРадную активность сердечного миозина, тогда как мутация A57G не оказывает на неё никакого влияния [15]. И, наконец, нельзя не остановиться на свойствах сердечного миозина с мутацией M149V в ELC<sub>v</sub>, которая раньше всех перечисленных выше была идентифицирована как мутация, приводящая к развитию HCM [16]. В изящных экспериментах, проведённых методом плазмонного резонанса, было показано, что эта мутация значительно снижает сродство ELC<sub>v</sub> к рекомбинантному фрагменту тяжёлой цепи сердечного миозина, содержащему IQ-мотив для связывания ELC<sub>v</sub> [12]. Помимо этого, было обнаружено, что мутация M149V в ELC<sub>v</sub> повышает скорость скольжения актиновых филаментов по поверхности с иммобилизованным сердечным миозином в искусственной системе подвижности [16].

В настоящей работе мы сравнили свойства сердечного миозина и его изолированной головки (S1) с кардиомиопатическими мутациями E56G, M149V или E177G в ELC<sub>v</sub>. Выбор этих мутаций не был случайным. Во-первых, высококонсервативные остатки, подвергавшиеся мутациям, расположены в разных областях первичной последовательности ELC<sub>v</sub>: остаток E56 локализован в *N*-концевой части последовательности поблизости от уникального *N*-концевого сегмента ELC<sub>v</sub>, тогда как остатки M149 и E177 расположены в *C*-концевой части последовательности (рис. 1, *a*). В пространстве остатки M149 и E177 локализованы далеко от остатка E56: они находятся в разных частях ELC<sub>v</sub>, расположенных по разные сторо-



**Рис. 1.** *a* – Положение кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в аминокислотной последовательности ELCv. *б* – Положение кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G на пространственной структуре ELCv (показана светло-серым цветом), ассоциированной с  $\alpha$ -спиралью тяжёлой цепи миозина (с фрагментом тяжёлой цепи, включающим остатки 773–810, показан темно-серым цветом) в регуляторном домене миозиновой головки (PDB entry 5TVU). Остатки E56, M149 и E177 представлены в виде боковых цепей, показанных черным цветом. Гибкий *N*-концевой сегмент ELCv, включающий 52 *N*-концевых остатка, на панели *a* заштрихован, а на панели *б* – не показан

ны от  $\alpha$ -спирали тяжёлой цепи регуляторного домена миозиновой головки (рис. 1, *б*). Во-вторых, мы старались сравнить мутации, влияние которых на свойства миозина было изучено ранее в совершенно разной степени. В этом отношении мутация E56G является одной из наиболее хорошо изученных [9, 11–14], несколько меньше известно о функциональных эффектах мутации M149V [11, 12, 16] и почти ничего не известно о мутации E177G, кроме того, что она была выявлена у 3-месячного младенца с тяжёлой прогрессирующей НСМ, приведшей к его смерти в возрасте 6 месяцев [17].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение белков.** Все препараты ELCv (ELC желудочков сердца человека), использованные в данной работе, были рекомбинантными белками, продуктами гена *MYL3* человека (UniProtKB P08590; MYL3\_HUMAN), содержащими на *N*-конце 6-членный His-tag, необходимый для последующей очистки белков методом аффинной хроматографии. Для этого предварительно был проведён дизайн гена *MYL3*; в частности, в его нуклеотидную

последовательность были добавлены последовательности, кодирующие His-tag и специфический сайт для его последующего удаления при помощи специфической протеазы (Factor Xa). Модифицированный ген *MYL3* был клонирован в вектор pET-9a («Merck, Sigma-Aldrich», Германия) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. На основе кДНК этого гена методом сайт-направленного мутагенеза были получены молекулярно-генетические конструкции ELCv как дикого типа (WT), так и с мутациями E56G, M149V и E177G. Для этого предварительно был сделан дизайн перекрывающихся праймеров (прямого и обратного), которые были затем синтезированы («Евроген», Россия). И использованные в работе праймеры для получения молекулярно-генетических конструкций мутантных форм ELCv (мутантные кодоны подчёркнуты) представлены в табл. 1.

Все эти конструкции были использованы для бактериальной экспрессии рекомбинантных белков (ELCv WT, ELCv E56G, ELCv M149V и ELCv E177G) в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3). Рекомбинантные белки были выделены и очищены с помощью аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP 5 мл («GE Healthcare», США). Кон-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Мутантные формы ELCv	Последовательности праймеров (5'→3')	
	прямой	обратный
ELCv E56G	TCTTAAGTTTCCTCGCAAGTA	TACTTGCGAGGAAACTTAAGA
ELCv M149V	ATGGCAACACCCACGCCTT	AAGGCGTGGGTGTTGCCAT
ELCv E177G	CCAGTCCCTCTGAGATTGC	GCAATCTCAGAGGGACTGG

центрацию препаратов ELCv определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции  $A^{1\%}$  при 280 нм, равный  $0,2 \text{ см}^{-1}$ .

Сердечные миозин и тропонин (Tn) получали по стандартным методикам [18, 19] из левых желудочков сердца свиньи. Тропомиозин (Trm, сердечная изоформа Trm1.1) представлял собой рекомбинантный белок, получение которого было подробно описано ранее [20, 21]. Актин получали стандартным методом из скелетных мышц кролика [22]. Актиновые филаменты (F-актин) полимеризовали, добавляя 4 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 100 мМ  $\text{KCl}$  к раствору мономерного G-актина. Для экспериментов в искусственной подвижной системе F-актин флуоресцентно метили, добавляя к нему двукратный молярный избыток TRITC-фаллоидина («Sigma Chemical Co.», США). Изолированные миозиновые головки (S1) получали, переваривая филаменты сердечного миозина  $\alpha$ -химотрипсином, обработанным TLCK («Sigma Chemical Co.») [23]. Концентрацию S1 определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции  $A^{1\%}$  при 280 нм, равный  $7,5 \text{ см}^{-1}$ .

**Замена собственных ELC в сердечных миозине и S1 на рекомбинантные ELCv.** Методика реассоциации, т.е. замены одних ELC на другие в изолированной головке миозина (S1), неоднократно использовалась нами ранее в исследованиях на S1, полученном из миозина скелетных мышц кролика [7, 8]. Эту же методику мы использовали и для замены собственных ELC на рекомбинантные ELCv в S1, полученном из сердечного миозина. Вкратце, замену проводили, инкубируя S1 30 мин при  $37^\circ\text{C}$  с 8-кратным молярным избытком рекомбинантных ELCv в 50 мМ буфере имидазол- $\text{HCl}$  (pH 7,0), содержащем 5 мМ DTT, 10 мМ  $\text{MgATP}$  и 100 мМ  $\text{NaCl}$ . Реакцию останавливали охлаждением во льду, после чего препарат S1 очищали с помощью хроматографии на колонке с SP-трисакрилом для отделения S1 от избытка свободных ELCv. Однако для замещения собственных ELC на рекомбинантные ELCv в целой молекуле сер-

дечного миозина, нерастворимого при низкой ионной силе, нам пришлось существенно модифицировать эту методику. Сердечный миозин (2 мг/мл, 4 мМ) смешивали с 10-кратным молярным избытком рекомбинантных ELCv (40 мМ) в 50 мМ буфере имидазол- $\text{HCl}$  (pH 7,0), содержащем 5 мМ DTT, 10 мМ  $\text{MgATP}$  и 0,7 М  $\text{KCl}$ , и инкубировали в течение 1 часа при  $37^\circ\text{C}$ . Далее смесь миозина с ELC диализовали против буфера 50 мМ  $\text{Tris-HCl}$  (pH 8,0) для агрегации миозина и центрифугировали при  $8000 \text{ g}$  в течение 10 мин при  $4^\circ\text{C}$ , после чего осадок миозина ресуспендировали и диализовали против того же буфера, содержащего 1 М  $\text{NaCl}$ .

На последней стадии очистки миозина или S1 мы использовали металл-аффинную хроматографию на колонке His-Trap HP 1 мл («GE Healthcare»), на которой удерживаются лишь головки миозина, содержащие His-tag на ELCv. Хроматографию проводили в 50 мМ буфере  $\text{Tris-HCl}$  (pH 8,0), содержащем 300 мМ  $\text{NaCl}$  (в случае S1) или 1 М  $\text{NaCl}$  (для целого миозина), используя линейный градиент имидазола 15–500 мМ. Важно отметить, что при такой хроматографии молекулы миозина с заменами собственных ELC на рекомбинантные ELCv в обеих головках освобождались с колонки при более высоких концентрациях имидазола, чем молекулы, содержащие рекомбинантные ELCv лишь в одной из двух головок. Мы собирали с колонки лишь те фракции миозина, в которых собственные ELC были полностью заменены на рекомбинантные ELCv, содержащие N-концевой His-tag, электрофоретическая подвижность которых была ниже, чем у ELC, не содержащих His-tag. Именно эти фракции миозина с рекомбинантными ELCv в обеих головках молекулы использовались в последующих экспериментах. N-Концевой His-tag был впоследствии удалён из ELCv путём обработки специфической протеазой (Factor Xa protease, «NewEngland Biolabs», Великобритания) при  $4^\circ\text{C}$ , которую проводили в течение ночи и останавливали добавлением PMSF.

В результате нам удалось получить препараты сердечного миозина и S1, в которых собственные ELC были полностью заменены на рекомбинантные ELCv (как ELCv WT, так и ELCv с мутациями E56G, M149V или E177G).

**Эксперименты в искусственной системе подвижности (*in vitro motility assay*).** Использование этого метода позволяет исследовать скорость скольжения F-актина или реконструированных тонких филаментов (т.е. актиновых филаментов, содержащих Trm и Tn) по стеклянной поверхности с иммобилизованным на ней миозином, а в случае реконструированных тонких филаментов – определять зависимость скорости такого скольжения от концентрации ионов кальция. Ранее мы неоднократно применяли этот подход для изучения функциональных свойств Trm с кардиомиопатическими мутациями в различных областях молекулы [20, 21]. В настоящей работе мы использовали его для исследования свойств миозина, несущего в обеих головках рекомбинантные ELCv, в т.ч. с кардиомиопатическими мутациями E56G, M149V или E177G. Измерения проводили при 30 °C, как описано ранее [20, 21]. Вкратце, сердечный миозин (300 мкг/мл) с рекомбинантными ELCv загружали в экспериментальную проточную ячейку с внутренней поверхностью, покрытой нитроцеллюлозой. Регулируемые тонкие филаменты получали, добавляя сердечные Trm и Tn до конечных концентраций 100 нМ к раствору 10 нМ F-актина, меченного TRITC-фаллоидином, и помещали их в проточную ячейку с иммобилизованным миозином. Скорость скольжения филаментов измеряли в присутствии 2 мМ АТФ с помощью программы GMimPro [24] при различных концентрациях ионов Ca<sup>2+</sup>. Скорость скольжения F-актина измеряли в тех же условиях, но при отсутствии Trm, Tn и ионов Ca<sup>2+</sup>. Эксперименты с каждым миозином, содержащим в обеих головках рекомбинантные ELCv (как WT ELCv, так и ELCv с мутациями E56G, M149V или E177G), повторяли 3 раза (каждый раз – с заново приготовленным миозином) и полученные значения скоростей скольжения тонких филаментов или F-актина выражали как среднее ± SD. Кальциевую зависимость скорости скольжения тонких филаментов аппроксимировали уравнением Хилла, как описано ранее [20, 25].

**Измерения АТФазной активности.** Концентрация миозина, содержащего рекомбинантные ELCv, как и его количество, были слишком малы после всех стадий реассоциации и очистки белка, что не позволяло нам воспользоваться стандартной методикой определения АТФазной активности миозина по измерению

количества выделяемого неорганического фосфата, требующей значительно более высоких концентраций белка. Поэтому для определения АТФазной активности нам пришлось воспользоваться значительно более чувствительной методикой, позволяющей с высокой точностью измерять снижение количества АТФ в пробе непосредственно в процессе АТФазной реакции по снижению интенсивности люминесценции, измеряемой при помощи люциферин-люциферазной системы. В наших экспериментах мы использовали специальный коммерческий набор – смесь люциферина и люциферазы («Sigma-Aldrich», США), который позволяет детектировать пикомолярные концентрации АТФ в исследуемом образце. Однако даже этого оказалось недостаточно для измерения АТФазной активности целого миозина, содержащего рекомбинантные ELCv, концентрация которого была слишком уж мала для таких измерений. Поэтому все эксперименты по изучению актин-активируемой Mg<sup>2+</sup>-зависимой АТФазы проводились на препаратах изолированных головок сердечного миозина (S1), содержащих рекомбинантные ELCv. Образцы содержали 5 мМ имидазол (pH 7,0), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 87 нМ S1 и 4,7 мкМ F-актин. АТФазную реакцию инициировали добавлением 10 мМ АТФ. Поскольку люцифераза способна сама расщеплять АТФ (хотя и с невысокой скоростью) и вносить таким образом некоторые изменения в кинетику реакции, в качестве главного параметра скорости реакции мы использовали время полного тушения люминесценции. Измерения снижения интенсивности люминесценции проводили при 560 нм и 20 °C на планшетном ридере фирмы PerkinElmer (Multimode Plate Reader, «PerkinElmer», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональные свойства миозина, содержащего в обеих головках рекомбинантные ELCv, изучали, используя метод искусственной системы подвижности. В первую очередь исследовали скорость скольжения актиновых филаментов (F-актина, не содержащего Trm и Tn) по поверхности, на которой был иммобилизован миозин. Оказалось, что мутация E177G в ELCv не оказывает влияния на скорость скольжения F-актина, тогда как мутации E56G и M149V снижают её почти в 2 раза (табл. 2). В случае мутации E56G полученные нами данные коррелируют с данными, известными из литературы и указывающими на то, что эта мутация в ELCv может заметно

**Таблица 2.** Влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в ELCv миозина на скорость скольжения F-актина и на характеристики кальциевой зависимости скорости скольжения регулируемых тонких филаментов, содержащих Trm и Tn, в искусственной системе подвижности

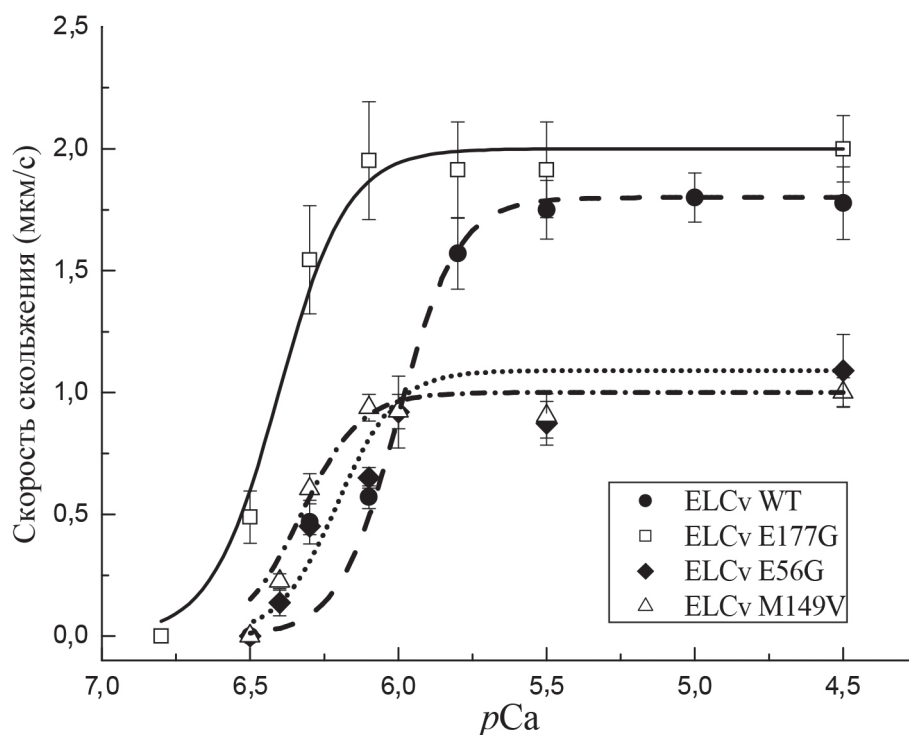
ELCv	Скорость скольжения F-актина, мкм/с	Характеристики кальциевой зависимости скорости скольжения тонких филаментов	
		$pCa_{50}$	$V_{max}$ , мкм/с
WT ELCv	$1,9 \pm 0,07$	$6,00 \pm 0,01$	$1,8 \pm 0,1$
E177G ELCv	$1,9 \pm 0,1$	$6,40 \pm 0,01^*$	$2,0 \pm 0,1$
E56G ELCv	$1,0 \pm 0,05^*$	$6,21 \pm 0,01^*$	$1,1 \pm 0,1^*$
M149V ELCv	$1,1 \pm 0,1^*$	$6,33 \pm 0,01^*$	$1,0 \pm 0,1^*$

Примечание. Знаком \* обозначены статистически значимые отличия характеристик миозина с ELCv, несущими кардиомиопатические мутации, от характеристик миозина с WT ELCv ( $p < 0,05$ ).

(~ на 25%) снижать скорость скольжения F-актина по поверхности с иммобилизованным миозином [13]. Напротив, в случае мутации M149V в ELCv в литературе имеются данные о том, что она не снижает, а повышает почти на 40% скорость скольжения F-актина по поверхности с иммобилизованным миозином [16]. Такие различия в результатах можно объяснить получением препаратов миозина: в наших экспериментах мы использовали препараты миозина из сердца свиньи, которые различались лишь замещённой рекомбинантной ELCv, тогда как в экспериментах, описанных в работе Poetter et al. [16], сердечный миозин выделяли из биоптатов пациентов как с мутацией M149V

в ELCv, так и без неё. Препараты миозина, использованные в наших экспериментах и в работе Poetter et al. [16], различались не только по составу тяжёлых цепей сердечного миозина, но могли различаться и по иным параметрам (таким, например, как степень фосфорилирования ELCv в миозине, полученном из биоптатов, но не в полностью дефосфорилированных рекомбинантных ELCv).

Важно отметить, что мы исследовали в искусственной системе подвижности влияние мутаций в ELCv сердечного миозина не только на скорость скольжения F-актина, что делалось и ранее [13, 16], но впервые исследовали в этой системе влияние таких мутаций на скольжение ре-



**Рис. 2.** Влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в ELCv миозина на кальциевую зависимость скорости скольжения регулируемых тонких филаментов по сердечному миозину в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay). Экспериментальные значения скоростей (среднее  $\pm$  SD) аппроксимированы уравнением Хилла. Значения параметров уравнения Хилла представлены в табл. 2

конструированных тонких филаментов (т.е. актиновых филаментов, содержащих Trp и Tn), определяя при этом зависимость скорости такого скольжения от концентрации ионов кальция, т.е. выявляя влияние исследуемых мутаций на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия, как возможного механизма развития HCM. Результаты этих исследований представлены на рис. 2 и в табл. 2. Сразу отметим, что максимальная скорость скольжения тонких филаментов ( $V_{max}$ ), измеренная при высоких концентрациях  $Ca^{2+}$  (при  $pCa$  4,5), почти не отличалась от скорости скольжения F-актина при отсутствии регуляторных белков (табл. 2). При этом все мутации в ELCv заметно повышали  $Ca^{2+}$ -чувствительность скорости скольжения тонких филаментов, смещая кривые зависимости скорости от  $pCa$  в сторону более низких концентраций  $Ca^{2+}$  (рис. 2) и снижая таким образом концентрацию  $Ca^{2+}$ , при которой достигается полумаксимальная скорость скольжения ( $pCa_{50}$ ). Наиболее существенное повышение  $Ca^{2+}$ -чувствительности наблюдалось в случае ELCv с мутацией E177G (табл. 2). Важно отметить, что повышение  $Ca^{2+}$ -чувствительности взаимодействия миозина с актином является одним из характерных признаков HCM.

Мы также исследовали влияние кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в ELCv миозина на активность АТРАЗы актомиозина. По ряду описанных выше причин (см. «Материалы и методы») мы не смогли использовать для этих целей ни традиционные методы измерения АТРАЗной активности, ни целый миозин с мутациями в ELCv обеих головок его молекулы. Поэтому мы использовали методику, позволяющую измерять снижение количества АТФ в пробе непосредственно в процессе АТРАЗной реакции S1 по снижению интенсивности люминесценции, измеряемой при помощи люциферин-люциферазной системы. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что среди исследованных мутаций в ELCv S1 лишь одна, M149V, заметно повышала АТРАЗную активность акто-S1, почти в 2 раза снижая время, необходимое для полного тушения люминесценции, которое составляло  $26,0 \pm 1,2$  мин для S1 с ELCv WT и  $15,3 \pm 1,9$  мин для S1 с мутацией M149V в ELCv (представлены данные 7 независимых измерений, среднее значение  $\pm$  SD). Две другие мутации в ELCv, E56G и E177G, не оказывали существенного влияния на АТРАЗную активность акто-S1; по времени, необходимому для полного тушения люминесценции ( $26,5 \pm 2,3$  мин), препараты S1 с этими мутациями в ELCv практически не отличались от S1 с ELCv WT. В слу-

чае мутации E56G эти результаты хорошо соответствуют известным из литературы данным, указывающим на то, что мутация E56G в ELCv не оказывает влияния на актин-активируемую АТРАЗу S1 [14].

При сравнении эффектов, вызываемых мутациями E56G и M149V в ELCv, можно отметить их различие в зависимости от используемого метода исследования. Так, при экспериментах в искусственной системе подвижности обе мутации сходным образом снижали скорость скольжения F-актина и тонких филаментов (рис. 2, табл. 2), тогда как лишь одна из них, M149V, повышала АТРАЗную активность акто-S1, а другая, E56G, не оказывала на неё особого влияния. Это противоречие можно объяснить тем, что эксперименты в искусственной системе подвижности проводились на целом миозине с мутациями в ELCv, ассоциированных с обеими головками молекулы, а измерения АТРАЗной активности – на изолированных головках миозина (S1). В то же время имеются данные о том, что свойства целого миозина и S1 могут довольно сильно различаться. Это связано, во-первых, с кооперативным взаимодействием между двумя головками в молекуле миозина [26–28], а во-вторых – с возможным взаимодействием между ELC и RLC в головках целого миозина [29], но не в S1, который не содержит RLC.

Анализируя полученные данные, следует особо отметить эффект, оказываемый мутациями E56G и M149V в ELCv на скорость скольжения F-актина и тонких филаментов в искусственной системе подвижности, который выражается в двукратном снижении скорости (рис. 2, табл. 2). Этот эффект обусловлен, скорее всего, тем, что обе эти мутации снижают сродство ELCv к тяжёлой цепи миозина в регуляторном домене миозиновой головки [12], нарушая таким образом нормальное функционирование этого домена, важное для работы головки в качестве молекулярного мотора. Интересно также отметить, что такого эффекта не было обнаружено в случае мутации E177G (рис. 2, табл. 2), влияние которой на свойства сердечного миозина ранее вообще ещё не исследовалось. Не исключено, что влияние этой мутации на развитие HCM обусловлено не снижением скорости взаимодействия миозина с актином в сердечной мышце, а значительным повышением  $Ca^{2+}$ -чувствительности этого взаимодействия (табл. 2). Стоит также отметить, что аминокислотный остаток в положении 177 с мутацией E177G в структуре ELCv находится в неупорядоченной подвижной петле, тогда как аминокислотные остатки в

положениях 56 и 149 (мутации E56G и M149V) расположены либо в  $\alpha$ -спирали (E56), либо в короткой петле, соединяющей участки  $\beta$ -складки и  $\alpha$ -спирали (M149) [11] (см. рис. 1, б). Этим можно объяснить, хотя бы отчасти, тот факт, что мутация E177G не оказывает влияния на скорость взаимодействия миозина с актином, повышая при этом её  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность, которая определяется наличием регуляторных белков, Trm и Tn, в реконструированных тонких филаментах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, следует сказать, что на основании проведённых экспериментов нам удалось получить новую информацию о влиянии кардиомиопатических мутаций E56G, M149V и E177G в гене *MYL3*, кодирующем ELCv, на функциональные свойства сердечного миозина и его изолированной головки (S1). В частности, при сравнительном анализе эффектов, вызываемых этими мутациями, нам удалось показать, что мутация E177G, эффекты которой на свойства миозина ранее не исследовались, заметно отличается от других исследованных мутаций, E56G и M149V, по её влиянию на скорость скольжения F-актина или реконструированных тонких филаментов в искусственной системе подвижности. Так, эта мутация не оказывала влияния на скорость скольжения F-актина и на максимальную скорость скольжения тонких филаментов при высокой концентрации ионов кальция, тогда как мутации E56G и M149V сни-

жали её почти в 2 раза. С другой стороны, мутация E177G повышала  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность скорости скольжения тонких филаментов сильнее, чем другие исследованные мутации. Всё это позволяет предположить, что механизм развития гипертрофической кардиомиопатии, вызываемой кардиомиопатическими мутациями в ELCv, в случае мутации E177G отличается от такового для мутаций E56G и M149V.

**Вклад авторов.** Д.С. Ямпольская, А.М. Матюшенко и Д.И. Левицкий – концепция и руководство работой; Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин и С.Ю. Бершицкий – проведение экспериментов в искусственной системе подвижности; Д.С. Ямпольская – проведение экспериментов по измерению АТРазной активности; Д.С. Ямпольская и Д.И. Левицкий – написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00059).

**Благодарности.** Авторы выражают глубокую благодарность Валентине Юрьевне Берг за помощь в проведении экспериментов в искусственной системе подвижности.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Levitsky, D. I. (2004) Actomyosin systems of biological motility, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1177-1189, doi: 10.1007/s10541-005-0063-x.
- Rayment, I., Rypniewski, W., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D., et al. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment 1: a molecular motor, *Science*, **261**, 50-58, doi: 10.1126/science.8316857.
- Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **271**, 15850-15853, doi: 10.1074/jbc.271.27.15850.
- Milligan, R. A. (1996) Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 21-26, doi: 10.1073/pnas.93.1.21.
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., and Cohen, C. (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state, *Cell*, **94**, 559-571, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81598-6.
- Borejdo, J., Ushakov, D. S., Moreland, R., Akopova, I., Reshetnyak, Y., et al. (2001) The power stroke causes changes in the orientation and mobility of the termini of essential light chain 1 of myosin, *Biochemistry*, **40**, 3796-3803, doi: 10.1021/bi002527u.
- Logvinova, D. S., Markov, D. I., Nikolaeva, O. P., Sluchanko, N. N., Ushakov, D. S., et al. (2015) Does interaction between the motor and regulatory domains of the myosin head occur during ATPase cycle? Evidence from thermal unfolding studies on myosin subfragment 1, *PLoS One*, **10**, e0137517, doi: 10.1371/journal.pone.0137517.
- Logvinova, D. S., Matyushenko, A. M., Nikolaeva, O. P., and Levitsky, D. I. (2018) Transient interaction



- between the N-terminal extension of the essential light chain-1 and motor domain of the myosin head during the ATPase cycle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 163-167, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.172.
9. Logvinova, D. S., and Levitsky, D. I. (2018) Essential light chains of myosin and their role in functioning of the myosin motor, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 944-960, doi: 10.1134/S0006297918080060.
  10. Schaub, M.C., Hefti, M. A., Zuellig, R. A., and Morano, I. (1998) Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms, *Cardiovasc. Res.*, **37**, 381-404, doi: 10.1016/s0008-6363(97)00258-7.
  11. Yadav, S., Sitbon, Y. H., Kazmierczak, K., and Szczesna-Cordary, D. (2019) Hereditary heart disease: pathophysiology, clinical presentation, and animal models of HCM, RCM, and DCM associated with mutations in cardiac myosin light chains, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **471**, 683-699, doi: 10.1007/s00424-019-02257-4.
  12. Lossie, J., Ushakov, D. S., Ferenczi, M. A., Werner, S., Keller, S., et al. (2012) Mutations of ventricular essential myosin light chain disturb myosin binding and sarcomeric sorting, *Cardiovasc. Res.*, **93**, 390-396, doi: 10.1093/cvr/cvr320.
  13. Lossie, J., Köhncke, C., Mahmoodzadeh, S., Steffen, W., Canepari, M., et al. (2014) Molecular mechanism regulating myosin and cardiac functions by ELC, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 464-469, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.142.
  14. Guhathakurta, P., Prochniewicz, E., Roopnarine, O., Rohde, J. A., and Thomas, D. D. (2017) A cardiomyopathy mutation in the myosin essential light chain alters actomyosin structure, *Biophys. J.*, **113**, 91-100, doi: 10.1016/j.bpj.2017.05.027.
  15. Huang, W., and Szczesna-Cordary, D. (2015) Molecular mechanisms of cardiomyopathy phenotypes associated with myosin light chain mutations, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 433-445, doi: 10.1007/s10974-015-9423-3.
  16. Poetter, K., Jiang, H., Hassanzadeh, S., Master, S. R., Chang, A., et al. (1996) Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle, *Nat. Genet.*, **13**, 63-69, doi: 10.1038/ng0596-63.
  17. Jay, A., Chikarmane, R., Poulik, J., and Misra, V. K. (2013) Infantile hypertrophic cardiomyopathy associated with a novel MYL3 mutation, *Cardiology*, **124**, 248-251, doi: 10.1159/000347138.
  18. Margossian, S. S., and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, **85**, 55-71, doi: 10.1016/0076-6879(82)85009-x.
  19. Potter, J. D. (1982) Preparation of troponin and its subunits, *Methods Enzymol.*, **85** (Part B), 241-263, doi: 10.1016/0076-6879(82)85024-6.
  20. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Popruga, K. E., Artemova, N. V., et al. (2017) Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in the troponin T-binding region of cardiac tropomyosin, *Biochemistry*, **56**, 250-259, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00994.
  21. Matyushenko, A. M., Koubassova, N. A., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Nabiev, S. R., et al. (2019) The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of  $\alpha$ -tropomyosin on its properties and interaction with actin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **125**, 1266-1274, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.105.
  22. Pardee, J. D., and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin, *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181, doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9.
  23. Weeds, A. G., and Taylor, R. S. (1975) Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin, *Nature*, **257**, 54-56, doi: 10.1038/257054a0.
  24. Mashanov, G. I., and Molloy, J. E. (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells, *Biophys. J.*, **92**, 2199-2211, doi: 10.1529/biophysj.106.081117.
  25. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershitsky, S. Y., et al. (2014) Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of  $\alpha$ -tropomyosin molecule, *FEBS J.*, **281**, 2004-2016, doi: 10.1111/febs.12756.
  26. Schaub, M. C., Watterson, J. G., and Waser, P. G. (1977) Evidence for head-head interactions in myosin from cardiac and skeletal muscles, *Basic Res. Cardiol.*, **72**, 124-132, doi: 10.1007/BF01906350.
  27. Tyska, M. J., Dupuis, D. E., Guilford, W. H., Patlak, J. B., Waller, G. S., et al. (1999) Two heads of myosin are better than one for generating force and motion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4402-4407, doi: 10.1073/pnas.96.8.4402.
  28. Albet-Torres, N., Bloemink, M. J., Barman, T., Candau, R., Froölander, K., et al. (2009) Drug effect unveils inter-head cooperativity and strain-dependent ADP release in fast skeletal actomyosin, *J. Biol. Chem.*, **284**, 22926-22937, doi: 10.1074/jbc.M109.019232.
  29. Houdusse, A., and Cohen, C. (1996) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 Å resolution: implications for regulation, *Structure*, **4**, 21-32, doi: 10.1016/s0969-2126(96)00006-8.

**PROPERTIES OF CARDIAC MYOSIN  
WITH CARDIOMYOPATHIC MUTATIONS IN ESSENTIAL LIGHT CHAINS**

**D. S. Yampolskaya<sup>1</sup>, G. V. Kopylova<sup>2</sup>, D. V. Shchepkin<sup>2</sup>, S. Y. Bershitsky<sup>2</sup>,  
A. M. Matyushenko<sup>1</sup>, and D. I. Levitsky<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,  
119071 Moscow, Russia; e-mail: Levitsky@inbi.ras.ru*

<sup>2</sup> *Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
620049 Yekaterinburg, Russia*

The effect of cardiomyopathic mutations E56G, M149V, and E177G in the *MYL3* gene, which encodes essential light chains of human ventricular myosin (ELCv), on the functional properties of cardiac myosin and its isolated head (myosin subfragment 1, S1) was investigated. It has been shown that only one mutation, M149V, significantly increases the actin-activated ATPase activity of S1. All mutations significantly increased the Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the sliding velocity of thin filaments on the surface with immobilized myosin in the *in vitro* motility assay. At the same time, mutations E56G and M149V reduced the sliding velocity of actin filaments and regulated thin filaments by almost 2 times, while the mutation E177G in ELCv did not have such an effect on the sliding velocity. Thus, despite the fact that all the studied mutations in ELCv are involved in the development of hypertrophic cardiomyopathy, the mechanisms of their influence on actin-myosin interaction are different.

*Keywords:* myosin, essential light chains, cardiomyopathic mutations, cardiac muscle, molecular mechanism of muscle contraction