

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОФОРМ ТРОПОМИОЗИНА Trm4.1 И Trm2.1

© 2023 А.С. Логвинов^{1,2}, В.В. Нефёдова¹, Д.С. Ямпольская¹, С.Ю. Клейменов^{1,3},
Д.И. Левицкий¹, А.М. Матюшенко^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: ammatyushenko@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.03.2023

После доработки 05.05.2023

Принята к публикации 10.05.2023

Тропомиозин (Trm) – это один из важнейших партнёров актинового филамента, во многом определяющий его свойства. В организмах животных существуют разные изоформы Trm, которые, как считается, участвуют в регуляции различных клеточных функций. Однако молекулярные механизмы регуляции функций актиновых филаментов различными цитоплазматическими изоформами Trm до сих пор мало изучены. В нашей работе мы применяли различные методы для исследования свойств изоформ Trm2.1 и Trm4.1 и сравнивали их как между собой, так и со свойствами изоформ Trm, которые уже подвергались ранее более детальному изучению. Изоформы Trm2.1 и Trm4.1 почти не отличались друг от друга по их сродству к фибриллярному актину (F-актину), по термостабильности их молекул и по их устойчивости к ограниченному протеолизу трипсином, но заметно различались по вязкости их растворов и по термостабильности их комплексов с F-актином. Главным отличием Trm2.1 и Trm4.1 от других ранее исследованных изоформ Trm (таких, например, как Trm1.6 и Trm1.7) была их крайне низкая термостабильность, измеренная методами КД и ДСК. Возможные причины этой нестабильности детально рассмотрены при сравнении аминокислотных последовательностей Trm4.1 и Trm2.1 с последовательностями изоформ Trm1.6 и Trm1.7, которые не отличались от Trm4.1 и Trm2.1 соответственно по экзонной структуре их генов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: изоформы тропомиозина; стабильность структуры coiled-coil, актин-ассоциированные белки, актиновые филаменты, дифференциальная сканирующая калориметрия.

DOI: 10.31857/S0320972523060088, **EDN:** EFOAFG

ВВЕДЕНИЕ

Тропомиозин (Trm) представляет собой фибриллярный актин-связывающий белок, присутствующий во многих структурах актинового цитоскелета. Trm широко распространён в организмах животных и представлен во всех их тканях [1]. Trm формирует так называемую структуру coiled-coil, образованную двумя параллельными друг другу α -спиралями [2]. За счёт концевых взаимодействий между молекулами Trm образует вытянутую нить, которая плотно прилегает к поверхности актино-

вого филамента. Считается, что Trm способен регулировать функции актинового цитоскелета в животной клетке и выступает своеобразным «привратником» [3, 4], определяющим, с какими партнёрами будет взаимодействовать актиновый филамент [5, 6]. Было показано, что Trm повышает стабильность актиновых филаментов [7, 8] и предотвращает их деполимеризацию [9, 10]. Trm также участвует в регуляции глобальных клеточных процессов, таких как морфогенез и тканевая дифференцировка [11, 12], везикулярный транспорт [13, 14], клеточная адгезия [15, 16], а также регуляция сокращения скелетных и сердечных мышц [17, 18].

У млекопитающих обнаружено более 40 изоформ Trm [1]. Большое количество изоформ может лежать в основе регуляции различных

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; F-актин – фибриллярный актин; Trm – тропомиозин.

* Адресат для корреспонденции.

функций Trm и обеспечивать взаимодействие с другими актин-связывающими белками [19–21]. Молекулы Trm являются продуктами четырёх генов (*TPM1*, *TPM2*, *TPM3* и *TPM4*), а большая вариабельность в синтезе изоформ возникает в основном в результате альтернативного сплайсинга [1]. Особенности экзонной структуры этих изоформ и их названия представлены в общепринятой номенклатуре Trm [22].

В нашей работе мы изучили свойства двух изоформ Trm: Trm2.1 и Trm4.1. Изоформа Trm2.1 достаточно хорошо изучена, тогда как работ, посвящённых Trm4.1 очень мало. Trm2.1 представляет собой уникальную изоформу, которая экспрессируется как в гладкомышечных, так и в немышечных тканях [23, 24]. В гладкомышечных клетках Trm2.1 является частью сократительного аппарата клетки и участвует в сокращении этого типа мышц [24]. Следует отметить, что в гладких мышцах Trm2.1 в основном образует гетеродимеры с другой изоформой Trm, продуктом гена *TPM1* (Trm1.3 или Trm1.4, старое название – α smooth Tm или просто α Tm [22]) [2, 24]. Функции Trm2.1 в немышечных клетках пока ещё полностью не изучены. Известно, что он принимает участие в формировании стресс-фибрилл в клетках и участвует в передаче механических сигналов от внеклеточного матрикса [23, 25]. Снижение экспрессии Trm2.1 приводит к разрывке стресс-фибрилл и часто коррелирует с развитием опухолевой трансформации и усилением клеточной инвазии [26, 27]. Trm2.1 часто называют раковым супрессором. Так, восстановление экспрессии этой изоформы в раковых клетках приводит к возобновлению нормального функционирования клеток и предотвращению злокачественной трансформации [25, 28].

В литературе также имеются данные о структурно-функциональных свойствах молекулы Trm2.1. Ранее стабильность этой изоформы Trm изучали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) [29]. Плавление всей молекулы происходило в интервале температур 20–50 °С, и при деконволюции кривых избыточного теплопоглощения в молекуле были обнаружены три калориметрических домена (т.е. частей молекулы, которые денатурируют кооперативно и независимо друг от друга). Среди них был идентифицирован калориметрический домен, соответствующий плавлению *N*-концевой части молекулы Trm2.1 [29]. В литературе также имеются данные, хотя и довольно противоречивые, о сродстве Trm2.1 к фибриллярному

актину (F-актину). В одних исследованиях было определено высокое сродство Trm2.1 к F-актину ($K_d \leq 1$ мкМ) [30, 31], тогда как в других исследованиях оно было существенно ниже ($K_d = 5,5$ мкМ) [32].

Гораздо меньше известно о свойствах изоформы Trm4.1. На данный момент имеются только доказательства её существования и была опубликована лишь одна работа, демонстрирующая последствия снижения экспрессии этой изоформы в клетках эпителия молочной железы. В этой работе было показано, что нарушение экспрессии Trm4.1 приводит к разрушению межклеточных контактов и способствует усилению клеточной инвазии [33].

В нашей работе с использованием различных подходов мы оценили свойства изоформ Trm2.1 и Trm4.1 и сравнили их как друг с другом, так и со свойствами других известных изоформ Trm.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Все молекулярно-генетические конструкции изоформ Trm, используемые в этой работе, представляли собой кодирующие последовательности (CDS) с дополнительными триплетами, кодирующими Ala и Ser перед основной последовательностью для имитации естественного *N*-концевого ацетилирования [34]. CDS различных изоформ Trm были синтезированы («Евроген», Россия) и клонированы в вектор pET-23a+ между сайтами рестрикции NdeI и EcoRI. Корректность всех конструкций проверена секвенированием («Евроген»).

Белковые препараты получали в клетках *Escherichia coli* штамма C41 (DE3). Ночную культуру инокулировали в 1 литр свежей среды LB («Ambresco», США) в присутствии 100 мг/литр ампициллина. Клетки росли до тех пор, пока поглощение суспензии (при длине волны 600 нм) не достигало 0,6, после чего индуцировали экспрессию добавлением 1 мМ IPTG. Клетки продолжали инкубировать в течение ночи при 30 °С и постоянном перемешивании. Затем клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 50 мин) и ресуспендировали в буфере для очистки (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0).

Изоформы Trm очищали, как было описано ранее [35]. Сначала Trm подвергали грубой экстракции. Суспензию разрушенных клеток инкубировали при 86 °С в течение 5 мин с последующим центрифугированием при 15 000 g в течение 40 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали изоэлектрическому

осаждению с последующим центрифугированием при 15 000 g в течение 40 мин. Осадок растворяли в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и проводили диализ в течение ночи против этого буфера. На заключительном этапе препараты Trm очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiTrapQ HP («GE Healthcare», США) с использованием линейного градиента NaCl (0–2 М). Концентрацию препаратов Trm определяли спектрофотометрически с использованием коэффициентов экстинкции $E_{1\%}$ при 280 нм, равных 2,1 см^{-1} – для Trm4.1 и 2,73 см^{-1} – для Trm2.1.

Глобулярный мономер АТФ-G-актин экстрагировали из ацетонового порошка мышц кролика по стандартной методике [36]. F-Актин полимеризовали из АТФ-G-актина добавлением 5 мМ MgCl_2 и 100 мМ NaCl. За полимеризацией следили путём регистрации светорассеяния при 350 нм с использованием флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse («Varian Australia Pty Ltd», Австралия). Полная полимеризация F-актина занимала не более 30 мин.

Метод спектроскопии кругового дихроизма (КД). Эксперименты по КД проводили на КД-спектрофотометре Chirascan («Applied Photophysics», Великобритания). Спектры КД для Trm2.1 и Trm4.1 регистрировали при 5 °С в кюветах с длиной оптического пути 0,02 см при концентрации белка 1 мг/мл. Спектры имели стандартный вид с двумя отрицательными максимумами при 222 и 208 нм, характерными для α -спиральных белков. Термостабильность препаратов Trm измеряли путём регистрации молярной эллиптичности при 222 нм в диапазоне температур 5–70 °С со скоростью нагрева 1 °С/мин; другие условия: концентрация Trm составляла 1 мг/мл в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ. Два последовательных нагревания использовали для проверки обратимости термического разворачивания образцов Trm.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Эксперименты методом ДСК проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре MicroCal VP-Capillary DSC («Malvern Instruments», США) при скорости нагревания 1 °С/мин, как описано ранее [37]. Концентрация Trm составляла 2 мг/мл в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl. Профили ДСК анализировали с использованием программного обеспечения Origin 7.0 («MicroCal Inc», США), как описано ранее [37].

Ограниченный протеолиз трипсином. Для проведения ограниченного протеолиза образ-

цы Trm с концентрацией 0,5 мг/мл подвергали воздействию трипсина, обработанного L-1-тозиламидо-2-фенилэтилхлорметилкетонном («Worthington», США). Образцы инкубировали в течение 90 мин при 30 °С в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl. В экспериментах использовали массовое соотношение трипсина к Trm, равное 1 : 300. Аликвоты образцов отбирали в разное время, а реакцию останавливали добавлением буфера для образцов, содержащего 5 мМ фенилметилсульфонил фторида. Протеолиз белка анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном SDS-PAGE. Полученный гель сканировали, и анализировали интегральную плотность с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53q.

Соосаждение Trm с F-актином. Сродство Trm к F-актину оценивали с помощью анализа их совместного осаждения, как описано ранее [35]. Вкратце, 10 мкМ F-актин, стабилизированный фаллоидином, смешивали с Trm в различных концентрациях (0–7,5 мкМ) в 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), содержащем 200 мМ NaCl. Затем актин осаждали вместе со связанным с ним Trm путём ультрацентрифугирования при 100 000 g в течение 40 мин («Beckman Coulter», США). Эквивалентные образцы осадка и супернатанта подвергали анализу с помощью электрофореза в 12,5%-ном SDS-PAGE. Полученные гели сканировали и анализировали интегральную плотность с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53q. Долю F-актина, связанного с молекулами Trm, определяли как отношение количества Trm в осадке к количеству F-актина.

Определение термостабильности комплексов Trm с F-актином. Диссоциацию комплексов Trm с F-актином индуцировали с помощью нагревания и следили за ней по изменению светорассеяния, как описано ранее [35]. Эксперименты проводили при постоянной скорости нагрева 1 °С/мин на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse, оснащённом регулятором температуры и термоприставкой. Образцы содержали F-актин (20 мкМ), стабилизированный фаллоидином, и 10 мкМ Trm. При обработке экспериментальных данных, полученных для комплексов Trm с F-актином, вычитали температурную зависимость светорассеяния свободного F-актина; после этого кривые были аппроксимированы стандартной сигмоидальной функцией Больцмана (Boltzmann function) в программе Origin 7.0. Основным параметром, извлекаемым из этого анализа, является T_{diss} , т.е. та температура, при которой происходит 50%-ное снижение светорассеяния.

Измерение вязкости растворов Трм. Эксперименты проводили на вискозиметре AMVn («Anton Paar GmbH», Австрия) с использованием капилляра объёмом 0,5 мл при 20 °С. Для корректных расчётов вязкости удельную плотность растворов Трм измеряли на приборе DMA 4500 («Anton Paar GmbH»). Все измерения проводили при концентрации Трм 2 мг/мл в 30 мМ Нерес-На (рН 7,3), содержащем 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ. Измерения повторяли трижды, а полученные значения усредняли.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Структурные свойства изоформ Трм2.1 и Трм4.1. Значительная часть работы была посвящена изучению структурных свойств изоформ Трм2.1 и Трм4.1. Мы использовали такие методы, как КД, ДСК и ограниченный протеолиз трипсином, для описания стабильности этих изоформ Трм. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 1–3.

В первую очередь мы применили метод КД для изучения термостабильности изоформ Трм2.1 и Трм4.1 (рис. 1, а и б). Разрушение α -спирали при нагревании для этих видов Трм исследовали путём измерения эллиптичности при 222 нм, которая отражает содержание α -спирали в молекуле Трм. До 30–34 °С изоформы Трм2.1 и Трм4.1 теряют около 20% своей α -спиральности при некооперативном плавлении, а основная потеря спиральности происходит при более высокой температуре, в интервале от 34–35 до 50–52 °С (рис. 1, а). В дифференциальной форме основной тепловой переход наблюдался при ~42 °С для Трм2.1 и при 44 °С – для Трм4.1 (рис. 1, б). В целом, результаты КД показали, что термостабильность Трм4.1 была несколько выше, чем у Трм2.1.

Стабильность молекул Трм4.1 и Трм2.1 оценивали также методом ограниченного протеолиза трипсином, позволяющим определить устойчивость этих молекул к протеолизу, которая оказалась одинаковой для обеих изоформ Трм (рис. 2). Вероятно, это связано с тем, что протеолиз происходит преимущественно по центральной части молекулы Трм – наименее стабильной части молекулы из-за наличия в ней ряда неканонических аминокислотных остатков, дестабилизирующих двойную спираль. Ранее было показано, что аминокислотная последовательность этой части молекулы обладает чрезвычайно высокой консервативностью для множества самых разных

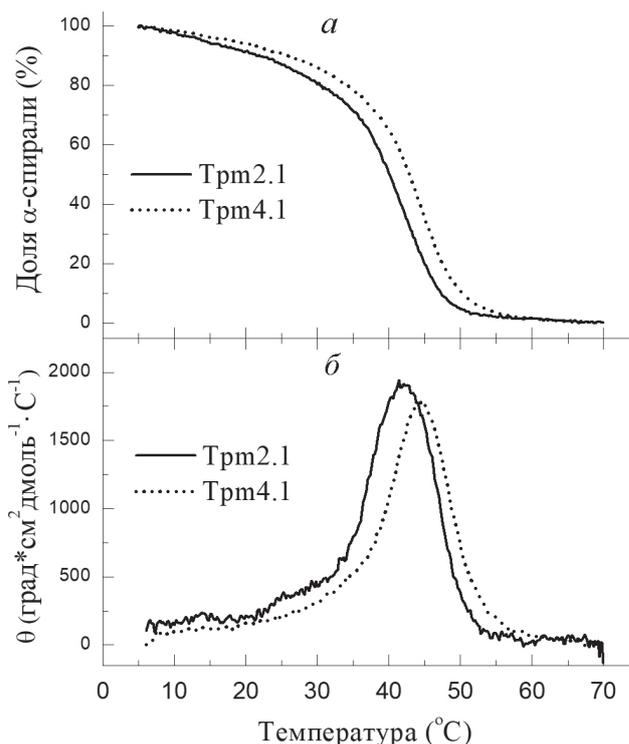


Рис. 1. Стабильность молекул Трм2.1 и Трм4.1, измеренная с помощью КД (а и б). Температурные зависимости содержания α -спиралей измеряли с помощью регистрации эллиптичности при 222 нм при постоянной скорости нагрева (1 °С/мин)

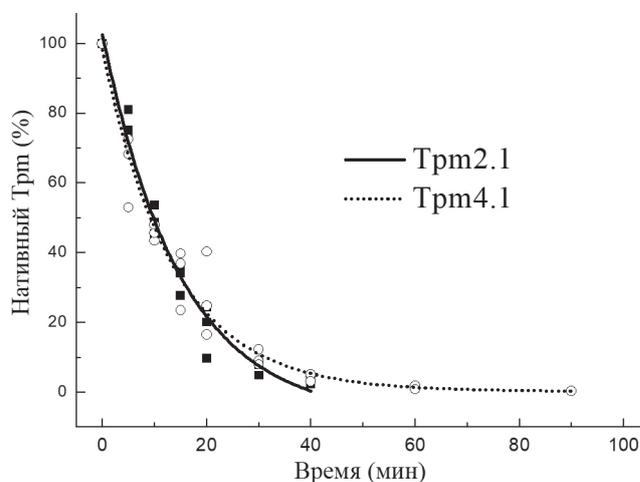


Рис. 2. Стабильность молекул Трм2.1 и Трм4.1, измеренная с помощью ограниченного протеолиза трипсином. Протеолиз проводили при 30 °С при соотношении трипсин : Трм, равном 1 : 300

изоформ Трм [35, 38]. Именно этим можно объяснить тот факт, что изоформы Трм4.1 и Трм2.1, которые мало различаются по последовательности центральной части их молекул, не различаются и по их устойчивости к протеолизу трипсином.

Данные ДСК (рис. 3) достаточно хорошо согласуются с результатами, полученными

методом КД. Деконволюционный анализ показал, что кривую ДСК для Трм2.1 можно разложить на три калориметрических домена (рис. 3, *a*; таблица), что хорошо согласуется с ранее опубликованными результатами [29]. Более того, ранее было показано, что калориметрический домен 2 на кривой ДСК соответствует плавлению *N*-концевой части молекулы Трм2.1 [29]. Напротив, изоформа Трм4.1 продемонстрировала только два калориметрических домена на кривой ДСК (рис. 2, *б*; таблица). Вероятно, некоторые части молекулы Трм4.1 денатурируют вместе как единый калориметрический домен 2 или их тепловые переходы совпадают по положению и потому не могут быть разделены деконволюционным анализом. Что касается наименее термостабильного калориметрического домена 1, то он, вероятно, отражает некооперативное плавление некоторых довольно малых частей молекул Трм2.1 и Трм4.1. В целом, температуры теплового перехода для главных калориметрических доменов близки для изоформ Трм2.1 и Трм4.1, что свидетельствует о сходной стабильности всех частей молекул для этих изоформ Трм.

Функциональные свойства изоформ Трм2.1 и Трм4.1. Параметры взаимодействия Трм2.1 и Трм4.1 с F-актином оценивали методами соосаждения Трм с F-актином и регистрации термостабильности комплексов Трм–F-актин по изменению светорассеяния. Результаты этих исследований представлены на рис. 4. Сродство изоформ Трм к F-актину было практически идентичным (рис. 4, *a*): значение $K_{50\%}$ составляло $2,70 \pm 0,18$ мкМ для Трм2.1 и $3,02 \pm 0,22$ мкМ – для Трм4.1.

В отличие от сродства изоформ Трм к F-актину (рис. 4, *a*), термостабильность комплексов Трм–F-актин была значительно выше для Трм4.1 ($T_{\text{diss}} = 45,4 \pm 0,3$ °C), чем для Трм2.1 ($T_{\text{diss}} = 40,4 \pm 0,3$ °C) (рис. 4, *б*). Примечательно,

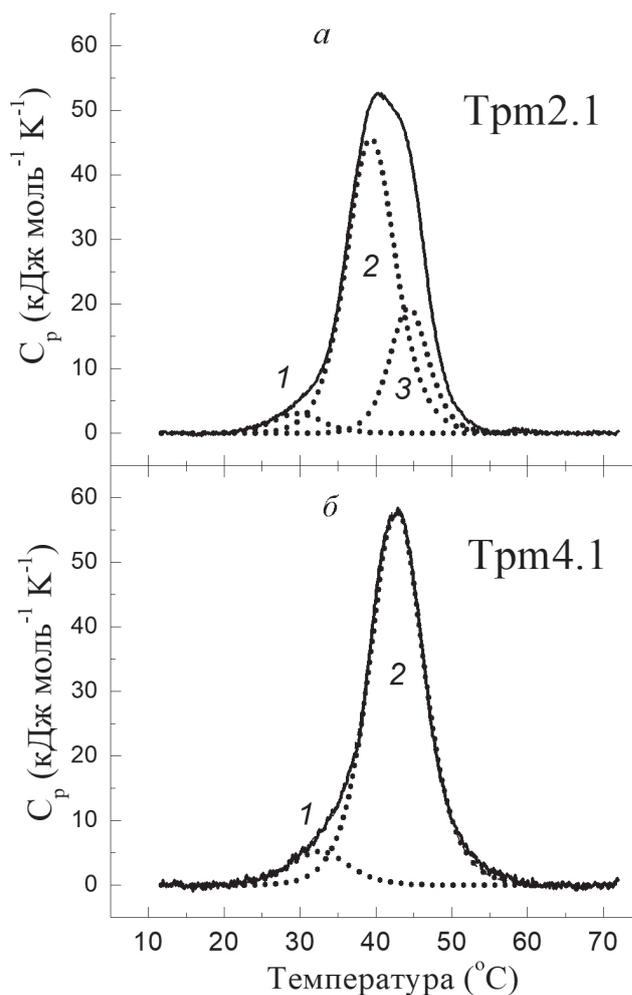


Рис. 3. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения (C_p) для изоформ Трм2.1 (*a*) и Трм4.1 (*б*), полученные методом ДСК. Сплошные линии представляют собой экспериментальные кривые после вычитания инструментальных и химических базовых линий, а пунктирными линиями показаны отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), полученные путём деконволюции этих кривых. Каждый калориметрический домен обозначен цифрами по мере увеличения термостабильности

Калориметрические параметры для изоформ Трм2.1 и Трм4.1, полученные после анализа кривых ДСК

Изоформы Трм	Калориметрические параметры***						$\Sigma \Delta H_{\text{cal}}^{**}$, кДж/моль
	Домен 1		Домен 2		Домен 3		
	T_m^* , °C	ΔH_{cal} , кДж/моль	T_m , °C	ΔH_{cal} , кДж/моль	T_m , °C	ΔH_{cal} , кДж/моль	
Трм2.1	29,4	30	39,3	390	44,3	200	620
Трм4.1	32,6	50	42,7	550	–	–	600

Примечание. * T_m – температура калориметрического домена; ** ΔH_{cal} – значение калориметрической энтальпии; *** Погрешность приведённых значений температуры не превышала $\pm 0,2$ °C; для значений калориметрической энтальпии погрешность не превышала 10%.

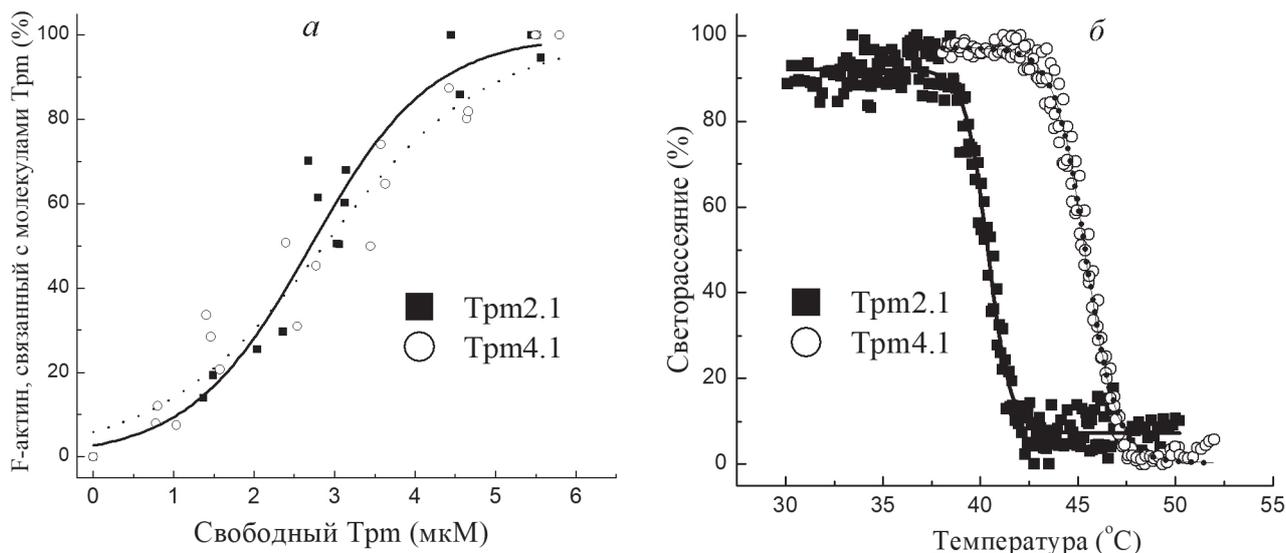


Рис. 4. Функциональные свойства молекул Trpm. *a* – Сродство Trpm2.1 и Trpm4.1 к F-актину, полученное с помощью соосаждения Trpm с F-актином. Результаты представлены на графике как доля F-актина, декорированного Trpm, в зависимости от концентрации свободного Trpm, обнаруженного в супернатанте. Значения $K_{50\%}$, соответствующие концентрациям Trpm при полунасыщении, составляют $2,70 \pm 0,18$ мкМ для Trpm2.1 и $3,02 \pm 0,22$ мкМ – для Trpm4.1. *б* – Нормализованные температурные зависимости диссоциации Trpm2.1 и Trpm4.1 с поверхности F-актина. Снижение интенсивности светорассеяния отражает диссоциацию комплекса Trpm–F-актин. Значения T_{diss} (т.е. той температуры, при которой интенсивность светорассеяния снижается на 50%) составляют $40,4 \pm 0,3$ °C для Trpm2.1 и $45,4 \pm 0,3$ °C – для Trpm4.1

что для Trpm2.1 значение T_{diss} ($40,4 \pm 0,3$ °C) (рис. 4, б) было сравнимо с температурой плавления основного калориметрического домена 2 ($39,3$ °C) (рис. 3, а). Это указывает на то, что стабильность комплексов Trpm2.1 с F-актином зависит в первую очередь от стабильности самой молекулы Trpm. Однако стабильность комплексов F-актина с Trpm4.1 была значительно выше, чем термостабильность молекулы Trpm4.1. Это означает, что в случае Trpm4.1 существуют и другие факторы, которые могут влиять на стабильность его комплекса с F-актином. Мы предположили, что дополнительный вклад могут вносить концевые взаимодействия между молекулами Trpm, и оценили их силу методом вискозиметрии. Действительно, вязкость раствора Trpm составила $0,484 \pm 0,001$ мПа·с для Trpm4.1, что существенно выше, чем значение, полученное для Trpm2.1 – $0,321 \pm 0,002$ мПа·с.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение свойств Trpm2.1 и Trpm4.1 с другими изоформами Trpm. Trpm4.1 – одна из наименее стабильных изоформ Trpm. Она обладает довольно уникальными структурными свойствами. Почти все части молекулы Trpm4.1 денатурируют вместе как единый калориметрический домен 2 (рис. 3, б) и довольно значи-

тельная часть Trpm4.1 (около 25%) не структурирована в диапазоне физиологических температур (рис. 1, а). Такие структурные особенности, вероятно, придают молекуле Trpm4.1 высокую лабильность, что может влиять на её функциональные свойства.

Результаты, полученные методом ДСК и свидетельствующие о низкой термостабильности изоформы Trpm2.1 (рис. 3, а), хорошо согласуются с данными, полученными ранее [29]. По своей стабильности изоформы Trpm2.1 и Trpm4.1 очень похожи друг на друга (рис. 1–3). Отметим, что Trpm2.1, Trpm4.1 и ранее изученная изоформа Trpm2.2 [37] составляют когорту нестабильных изоформ Trpm. С большой долей вероятности уникально низкая термостабильность этих изоформ Trpm может быть важна для их функционирования.

Сродство Trpm4.1 и Trpm2.1 к F-актину можно оценить как среднее по сравнению с другими изоформами Trpm. Аффинность этих изоформ уступает некоторым продуктам гена *TPM1*, таким как Trpm1.5 (1,1 мкМ) и Trpm1.7 (0,4 мкМ) [39]; но, с другой стороны, их сродство значительно выше, чем у Trpm1.12 (15,5 мкМ) [39] или Trpm3.7 (3,7 мкМ) [40]. Примечательно, что сродство Trpm4.1 и Trpm2.1 к F-актину ниже, чем у других продуктов генов *TPM4* и *TPM2* (1,07 мкМ – для Trpm4.2 и 0,33 мкМ – для Trpm2.2) [39, 41]. Сродство Trpm2.1 к F-актину, полученное в наших экс-

периментах, отличается от предыдущих исследований [30–32, 39–41]. Эти различия в значениях аффинности можно объяснить значительными различиями в экспериментальных условиях, таких как используемая ионная сила, различия в изоформах актина и др.

Стабильность комплекса Трм4.1 с F-актином ($T_{\text{diss}} = 45,4 \text{ } ^\circ\text{C}$) также находится на уровне средних значений для различных изоформ Трм; однако она значительно ниже, чем у другого продукта гена *TRM4* – Трм4.2 ($T_{\text{diss}} = 49,8 \text{ } ^\circ\text{C}$) [39]. Что касается изоформы Трм2.1, то она образует один из самых нестабильных комплексов с F-актином среди других изоформ Трм [39–41].

В целом, можно отметить, что основным отличием изучаемых нами препаратов Трм от других изоформ является их низкая термостабильность. Довольно сложно разобраться, к каким функциональным последствиям это может привести. Однако можно понять, почему изоформы Трм4.1 и Трм2.1 крайне нестабильны, если обратиться к их аминокислотным последовательностям и использовать то свойство, что структура coiled-coil строго определяется её первичной последовательностью.

Возможные причины низкой стабильности изоформ Трм2.1 и Трм4.1. Предыдущие работы показали важность первичной последовательности Трм для формирования его стабильной структуры. Особую роль в стабильности молекулы Трм играют переменные экзоны генов Трм [38]. Так, было продемонстрировано, что стабильность многих изоформ Трм зависит от того, какие экзоны входят в состав его последовательности [38]. Исследования по множественному выравниванию изоформ Трм показали, что основное различие в последовательностях между разными изоформами Трм достигается за счёт использования альтернативно сплайсированных экзонов [42]. В то же время одни и те же экзоны высоко консервативны между разными генами [1, 42]. Это означает, что изоформы Трм, кодируемые разными генами с одними и теми же экзонами, должны быть похожи друг на друга по своим свойствам.

Изоформы Трм2.1 и Трм4.1 имеют переменные экзоны 1a2b6a9d и 1a2b6b9d соответственно. Легко видеть, что эти изоформы отличаются друг от друга только экзонами 6 (6a или 6b), если не учитывать экспрессию с разных генов. Экзон 6 приходится на центральную часть молекулы Трм, одну из самых нестабильных частей во всей молекуле, как было показано ранее [43], и, вероятно, поэтому эти изоформы так близки по своей стабильности.

Ген *TRM1* также экспрессирует две изоформы Трм с идентичным набором экзонов, изоформы Трм1.6 и Трм1.7. Структуры экзонов Трм1.6 и Трм1.7 идентичны структурам Трм4.1 и Трм2.1 соответственно. Однако термостабильность молекул Трм1.6 и Трм1.7 значительно выше, чем у изученных изоформ. Особенно это касается калориметрического домена 3, соответствующего плавлению *N*-концевой части молекул Трм1.6 и Трм1.7 [39]. Термическая стабильность этого домена была выше на $7,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ в случае Трм1.7 по сравнению с Трм2.1 и на $6,7 \text{ } ^\circ\text{C}$ – в случае Трм1.6 по сравнению с главным (объединённым) доменом 2 в случае Трм4.1.

Для того чтобы понять, в чём может быть причина такого различия, мы сравнили последовательности этих изоформ (рис. 5). Трм1.6 отличается от Трм4.1 42 аминокислотными остатками, что составляет 14,7% от общей последовательности. Однако 19 аминокислотных замен аналогичны (рис. 5). В свою очередь, Трм1.7 отличается от Трм2.1 49 остатками, т.е. несколько больше по сравнению с предыдущей парой. Отличие от общей последовательности составляет 17,2%, а 27 остатков из 49 аналогичны (рис. 5). В целом, можно сказать, что последовательности очень похожи друг на друга, однако в случае молекулы Трм даже единичная замена может сильно повлиять на её стабильность. Поэтому мы решили внимательно посмотреть на последовательности. Особое внимание при анализе уделялось положениям *a* и *d* в гептадах, так как они отвечают за стабильность гидрофобного кора структуры coiled-coil. Во-вторую очередь, внимание было сосредоточено на позициях *e* и *g*, которые могут дополнительно стабилизировать структуру суперспирали. Поскольку наибольшая разница в стабильности наблюдается в *N*-концевой части молекул, последовательность этой части анализировали в первую очередь.

Имеется 5 замен в выбранных положениях между изоформами Трм1.7 и Трм2.1 в *N*-концевой части их молекул. Это замены L43Q, L57V, L64V и L71Q в позиции *a* и A63S – в позиции *g* (первая буква кода соответствует изоформе Трм1.7, а вторая – Трм4.1). Ни одна из этих замен не может быть отмечена как критическая для структуры двойной суперспирали. Однако, с точки зрения теоретической стабильности спиральных структур [2, 44], все замены в позиции *a* имеют несколько худшие параметры стабилизации гидрофобного кора в случае изоформы Трм2.1. По-видимому, снижение стабильности *N*-концевой части молекулы Трм2.1 по сравнению с Трм1.7 можно

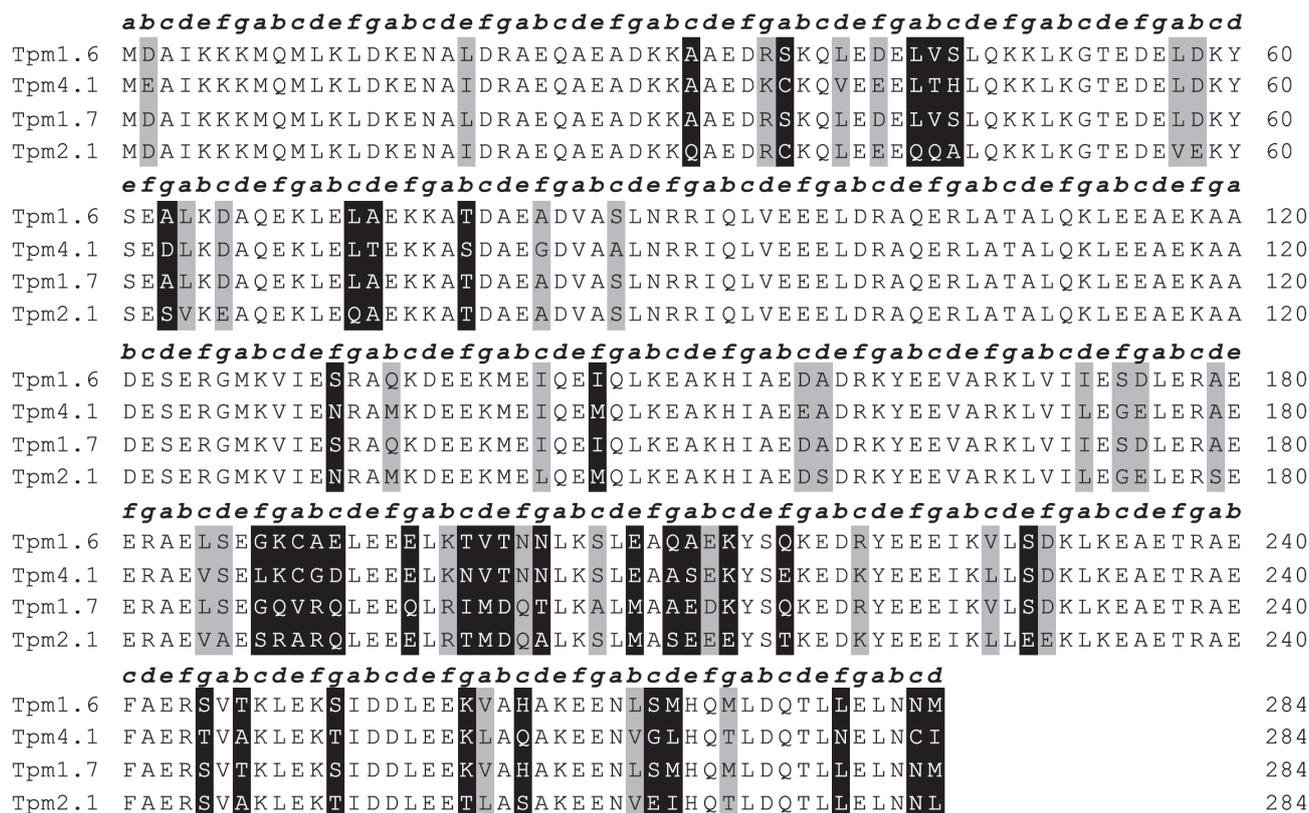


Рис. 5. Результаты множественного выравнивания, полученные для изоформ тропомииозина Trpm1.6, Trpm1.7, Trpm2.1 и Trpm4.1. Светло-серый цвет указывает на сходные аминокислоты в первичной последовательности молекул Trpm, темно-серый цвет – на аминокислоты, существенно различающиеся по своим свойствам, а без окраски приведены идентичные аминокислоты. Положения аминокислот в структуре гептад выделены курсивом *a–g*

объяснить кумулятивным эффектом небольшого снижения стабильности, вызванного заменами в положении *a*. В *C*-концевой части молекулы имеется большое количество замен между этими двумя изоформами (рис. 5). Однако все они в основном приходятся на позиции *b*, *c* и *f*, меньше – на позиции *e* и *g*, и только две воздействуют на гидрофобный кор молекулы. Эти замены, V190A и K213E, размещены в положениях *a* и *d* соответственно. Первая из них (V190A) может вызвать незначительную дестабилизацию в структуре суперспирали, а другая (K213E) не должна приводить к существенным изменениям, поскольку заряд в гидрофобном коре молекулы независимо от его знака приводит к дестабилизации структуры coiled-coil.

Аналогичная ситуация наблюдается и при сравнительном анализе последовательностей изоформ Trpm1.6 и Trpm4.1 (рис. 5). Как и в предыдущем случае, основное отличие в стабильности приходится на *N*-концевую часть молекулы Trpm, в которой не так много замен. Особое внимание следует уделить трём из них. Две из этих замен (L39V и A74T) размещены в позиции *d* и одна (A63D) – в позиции *g*. Все они могут вызывать эффект дестабилизации

структуры coiled-coil. Аминокислотных замен в *C*-концевой части молекулы Trpm также больше, как и в предыдущем случае. Однако только 2 замены, A211S и V260L, находящиеся в положении *a*, могли бы повлиять на стабильность суперспирали. Однако предсказать их действие сложно. Замена в положении 211 должна приводить к небольшой дестабилизации *C*-концевой части молекулы Trpm4.1 по сравнению с Trpm1.6, но этот эффект, вероятно, устраняется заменой V260L. В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что калориметрический домен 2 на кривых ДСК имеет одинаковую температуру плавления как для Trpm4.1, так и для Trpm1.6 [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены различные свойства изоформ Trpm2.1 и Trpm4.1. Показано, что основным отличием этих изоформ от других изоформ Trpm является их низкая стабильность (термостабильность). Причина сниженной стабильности этих изоформ кроется в группе аминокислотных остатков в гидрофоб-

ном коре молекулы, которая может дестабилизировать структуру двойной спирали (coiled-coil). Кроме того, изоформы Trm2.1 и Trm4.1 очень похожи друг на друга по своим свойствам. Единственным выявленным различием является термостабильность их комплексов с F-актином, обусловленная, по-видимому, различиями в силе концевых взаимодействий молекул этих изоформ. Принимая во внимание, что функциональные свойства Trm часто связаны с устойчивостью структуры coiled-coil его молекулы, можно предположить, что сниженная стабильность этих изоформ может иметь функциональное значение.

Вклад авторов. А.М. Матюшенко – концепция и руководство работой; А.С. Логвинов,

Д.С. Ямпольская и В.В. Нефёдова – получение препаратов Trm и постановка экспериментов; С.Ю. Клейменов – выполнение экспериментов методом ДСК; А.М. Матюшенко 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 № 22-74-10106).

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

- Gunning, P., O'Neill, G., and Hardeman, E. (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space, *Physiol. Rev.*, **88**, 1-35, doi: 10.1152/physrev.00001.2007.
- Nevzorov, I. A., and Levitsky, D. I. (2011) Tropomyosin: double helix from the protein world, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1507-1527, doi: 10.1134/S0006297911130098.
- Tardiff, J. C. (2010) Tropomyosin and dilated cardiomyopathy: revenge of the actinomyosin "gatekeeper", *J. Am. Coll. Cardiol.*, **55**, 330-332, doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.018.
- Manstein, D. J., and Mulvihill, D. P. (2016) Tropomyosin-mediated regulation of cytoplasmic myosins, *Traffic*, **17**, 872-877, doi: 10.1111/tra.12399.
- Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P., and Mulvihill, D. P. (2015) Tropomyosin – master regulator of actin filament function in the cytoskeleton, *J. Cell Sci.*, **128**, 2965-2974, doi: 10.1242/jcs.172502.
- Khaitlina, S. Y. (2015) Tropomyosin as a regulator of actin dynamics, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **318**, 255-291, doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.06.002.
- Goldmann, W. H. (2000) Binding of tropomyosin-troponin to actin increases filament bending stiffness, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 1225-1228, doi: 10.1006/bbrc.2000.3608.
- Nabiev, S. R., Ovsyannikov, D. A., Kopylova, G. V., Shchepkin, D. V., Matyushenko, A. M., Koubassova, N. A., Levitsky, D. I., Tsaturyan, A. K., and Bershtitsky, S. Y. (2015) Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament, *Biophys. J.*, **109**, 373-379, doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.006.
- Weigt, C., Schoepper, B., and Wegner, A. (1990) Tropomyosin-troponin complex stabilizes the pointed ends of actin filaments against polymerization and depolymerization, *FEBS Lett.*, **260**, 266-268, doi: 10.1016/0014-5793(90)80119-4.
- Broschat, K. O. (1990) Tropomyosin prevents depolymerization of actin filaments from the pointed end, *J. Biol. Chem.*, **265**, 21323-21329, doi: 10.1016/S0021-9258(17)45363-4.
- Schevzov, G., Vrhovski, B., Bryce, N. S., Elmir, S., Qiu, M. R., O'Neill, G. M., Yang, N., Verrills, N. M., Kavallaris, M., and Gunning, P. W. (2005) Tissue-specific tropomyosin isoform composition, *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 557-570, doi: 10.1369/jhc.4A6505.2005.
- Weinberger, R. P., Henke, R. C., Tolhurst, O., Jeffrey, P. L., and Gunning, P. (1993) Induction of neuron-specific tropomyosin mRNAs by nerve growth factor is dependent on morphological differentiation, *J. Cell Biol.*, **120**, 205-215, doi: 10.1083/jcb.120.1.205.
- Pelham, R. J. Jr., Lin, J. J., and Wang, Y. L. (1996) A high molecular mass non-muscle tropomyosin isoform stimulates retrograde organelle transport, *J. Cell Sci.*, **109** (Pt 5), 981-989, doi: 10.1242/jcs.109.5.981.
- Thoms, J. A., Loch, H. M., Bamburg, J. R., Gunning, P. W., and Weinberger, R. P. (2008) A tropomyosin 1 induced defect in cytokinesis can be rescued by elevated expression of cofilin, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **65**, 979-990, doi: 10.1002/cm.20320.
- Caldwell, B. J., Lucas, C., Kee, A. J., Gaus, K., Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Yap, A. S., and Gomez, G. A. (2014) Tropomyosin isoforms support actomyosin biogenesis to generate contractile tension at the epithelial zonula adherens, *Cytoskeleton*, **71**, 663-676, doi: 10.1002/cm.21202.
- McMichael, B. K., and Lee, B. S. (2008) Tropomyosin 4 regulates adhesion structures and resorptive

- capacity in osteoclasts, *Exp. Cell Res.*, **314**, 564-573, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.10.018.
17. Craig, R., and Lehman, W. (2001) Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **311**, 1027-1036, doi: 10.1006/jmbi.2001.4897.
18. Sweeney, H. L., and Hammers, D. W. (2018) Muscle contraction, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, a023200, doi: 10.1101/cshperspect.a023200.
19. Fath, T. (2013) Tropomodulins and tropomyosins – organizers of cellular microcompartments, *Biomol. Concepts*, **4**, 89-101, doi: 10.1515/bmc-2012-0037.
20. Gray, K. T., Kostyukova, A. S., and Fath, T. (2017) Actin regulation by tropomodulin and tropomyosin in neuronal morphogenesis and function, *Mol. Cell. Neurosci.*, **84**, 48-57, doi: 10.1016/j.mcn.2017.04.002.
21. Hardeman, E. C., Bryce, N. S., and Gunning, P. W. (2020) Impact of the actin cytoskeleton on cell development and function mediated via tropomyosin isoforms, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **102**, 122-131, doi: 10.1016/j.semdb.2019.10.004.
22. Geeves, M. A., Hitchcock-DeGregori, S. E., and Gunning, P. W. (2015) A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**, 147-153, doi: 10.1007/s10974-014-9389-6.
23. Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P. W., and Lappalainen, P. (2011) A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers, *Curr. Biol.*, **21**, 539-550, doi: 10.1016/j.cub.2011.03.007.
24. Sanders, C., Burtinck, L. D., and Smillie, L. B. (1986) Native chicken gizzard tropomyosin is predominantly a beta gamma-heterodimer, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12774-12778, doi: 10.1016/S0021-9258(18)67160-1.
25. Wolfenson, H., Meacci, G., Liu, S., Stachowiak, M. R., Iskratsch, T., Ghassemi, S., Roca-Cusachs, P., O'Shaughnessy, B., Hone, J., and Sheetz, M. P. (2016) Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices, *Nat. Cell. Biol.*, **18**, 33-42, doi: 10.1038/ncb3277.
26. Boyd, J., Risinger, J. I., Wiseman, R. W., Merrick, B. A., Selkirk, J. K., and Barrett, J. C. (1995) Regulation of microfilament organization and anchorage-independent growth by tropomyosin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11534-11538, doi: 10.1073/pnas.92.25.11534.
27. Stehn, J. R., Schevzov, G., O'Neill, G. M., and Gunning, P. W. (2006) Specialisation of the tropomyosin composition of actin filaments provides new potential targets for chemotherapy, *Curr. Cancer Drug Targets*, **6**, 245-256, doi: 10.2174/156800906776842948.
28. Mahadev, K., Raval, G. S., Bharadwaj, S., Willingham, M. C., and Lange, E. M. (2002) Suppression of the transformed phenotype of breast cancer by tropomyosin-1, *Exp. Cell Res.*, **279**, 40-51, doi: 10.1006/excr.2002.5583.
29. Nevzorov, I., Redwood, C., and Levitsky, D. I. (2008) Stability of two beta-tropomyosin isoforms: effects of mutation Arg91Gly, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **29**, 173-176, doi: 10.1007/s10974-009-9171-3.
30. Gateva, G., Kremneva, E., Reindl, T., Kotila, T., and Kogan, K. (2017) Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations *in vitro*, *Curr. Biol.*, **27**, 705-713, doi: 10.1016/j.cub.2017.01.018.
31. Coulton, A., Lehrer, S. S., and Geeves, M. A. (2006) Functional homodimers and heterodimers of recombinant smooth muscle tropomyosin, *Biochemistry*, **45**, 12853-12858, doi: 10.1021/bi0613224.
32. Janco, M., Bonello, T. T., Byun, A., Coster, A. C. F., Lebhar, H., Dedova, I., Gunning, P. W., and Böcking, T. (2016) The impact of tropomyosins on actin filament assembly is isoform specific, *Bioarchitecture*, **6**, 61-75, doi: 10.1080/19490992.2016.1201619.
33. Jeong, S., Lim, S., Schevzov, G., Gunning, P. W., and Helfman, D. M. (2017) Loss of Tpm4.1 leads to disruption of cell-cell adhesions and invasive behavior in breast epithelial cells via increased Rac1 signaling, *Oncotarget*, **8**, 33544-33559, doi: 10.18632/oncotarget.16825.
34. Monteiro, P. B., Lataro, R. C., Ferro, J. A., and Reinach, F.-C. (1994) Functional α -tropomyosin produced in *Escherichia coli*. A dipeptide extension can substitute the amino-terminal acetyl group, *J. Biol. Chem.*, **269**, 10461-10466, doi: 10.1016/S0021-9258(17)34082-6.
35. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershtitsky, S. Y., Tsaturyan, A. K., Sluchanko, N. N., and Levitsky, D. I. (2014) Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule, *FEBS J.*, **281**, 2004-2016, doi: 10.1111/febs.12756.
36. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871, doi: 10.1016/S0021-9258(18)62016-2.
37. Matyushenko, A. M., Kleymenov, S. Y., Susorov, D. S., and Levitsky, D. I. (2018) Thermal unfolding of homodimers and heterodimers of different skeletal-muscle isoforms of tropomyosin, *Biophys. Chem.*, **243**, 1-7, doi: 10.1016/j.bpc.2018.09.002.
38. Nefedova, V. V., Marchenko, M. A., Kleymenov, S. Y., Datskevich, P. N., Levitsky, D. I., and Matyushenko, A. M. (2019) Thermal unfolding of various human non-muscle isoforms of tropomyosin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **514**, 613-617, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.008.
39. Marchenko, M., Nefedova, V., Artemova, N., Kleymenov, S., Levitsky, D., and Matyushenko, A. (2021) Structural and functional peculiarities of cytoplasmic tropomyosin isoforms, the products of

- TPM1 and TPM4 genes, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5141, doi: 10.3390/ijms22105141.
40. Marchenko, M. A., Nefedova, V. V., Yampolskaya, D. S., Borzova, V. A., Kleymenov, S. Y., Nabiev, S. R., Nikitina, L. V., Matyushenko, A. M., and Levitsky, D. I. (2021) Comparative structural and functional studies of low molecular weight tropomyosin isoforms, the TPM3 gene products, *Arch. Biochem. Biophys.*, **710**, 108999, doi: 10.1016/j.abb.2021.108999.
41. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershitsky, S. Y., and Levitsky, D. I. (2020) Unique functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin, *Biochimie*, **174**, 1-8, doi: 10.1016/j.biochi.2020.03.013.
42. Lees-Miller, J. P., and Helfman, D. M. (1991) The molecular basis for tropomyosin isoform diversity, *Bioessays*, **13**, 429-437, doi: 10.1002/bies.950130902.
43. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Sluchanko, N. N., and Levitsky, D. I. (2015) Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin on the domain structure of its molecule, *Biophys. Chem.*, **196**, 77-85, doi: 10.1016/j.bpc.2014.10.001.
44. Arndt, K. M., Pelletier, J. N., Müller, K. M., Plückthun, A., and Alber, T. (2002) Comparison of *in vivo* selection and rational design of heterodimeric coiled coils, *Structure*, **10**, 1235-1248, doi: 10.1016/s0969-2126(02)00838-9.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF TROPOMYOSIN ISOFORMS Tpm4.1 AND Tpm2.1

A. S. Logvinov^{1,2}, V. V. Nefedova¹, D. S. Yampolskaya¹, S. Y. Kleymenov^{1,3},
D. I. Levitsky¹, and A. M. Matyushenko^{1*}

¹ *Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: ammatyushenko@mail.ru*

² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Tropomyosin (Tpm) is one of the most important partners of the actin filament, largely determining its properties. In animal organisms, there are different isoforms of Tpm, which are believed to be involved in the regulation of various cellular functions. However, the molecular mechanisms of regulation of the functions of actin filaments by various cytoplasmic isoforms of Tpm are still poorly understood. In our work, we used various methods to study the properties of Tpm2.1 and Tpm4.1 isoforms and compared them both with each other and with the properties of Tpm isoforms that had already been subjected to more detailed study earlier. The isoforms Tpm2.1 and Tpm4.1 almost did not differ from each other in their affinity for F-actin, in the thermal stability of their molecules and in their resistance to limited proteolysis by trypsin, but they differed markedly in viscosity of their solutions and in the thermal stability of their complexes with F-actin. The main difference of Tpm2.1 and Tpm4.1 from other previously studied Tpm isoforms (such, for example, as Tpm1.6 and Tpm1.7) is their extremely low thermal stability measured by CD and DSC methods. The possible causes of this instability are considered in detail when comparing the amino acid sequences of Tpm4.1 and Tpm2.1 with the sequences of isoforms Tpm1.6 and Tpm1.7, which did not differ from Tpm4.1 and Tpm2.1, respectively, by the exon structure of their genes.

Keywords: tropomyosin isoforms; coiled-coil stability, actin-associated proteins, actin filaments, differential scanning calorimetry