

DOI: 10.31116/tsitol.2018.08.08

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ *Gly126Arg* В АЛЬФА-ТРОПОМИОЗИНЕ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИОЗИНА С АКТИНОМ В ЦИКЛЕ ГИДРОЛИЗА АТФ

© Н. А. Рысев,¹ И. А. Невзоров,² О. Е. Карпичева,¹ С. В. Аврова,¹
Д. И. Левицкий,³ Ю. С. Боровиков^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² Институт биотехнологии, Университет Хельсинки, Финляндия, 00014, и

³ Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, 119071;

* электронный адрес: borovikov@incras.ru

Известно, что регуляция мышечного сокращения осуществляется тропомиозином и кальций-чувствительным белком тропонином, которые формируют с Ф-актином тонкую нить мышечного волокна. Неканонический остаток глицина в позиции 126 центральной части скелетного альфа-тропомиозина дестабилизирует структуру этого белка. Замена остатка глицина на остаток аргинина стабилизирует центральную область тропомиозина, смещает тропомиозин в открытую позицию и активирует включение мономеров актина в цикле гидролиза АТФ. Чтобы исследовать, как замена *Gly126Arg* влияет на взаимодействие головки миозина с Ф-актином в цикле гидролиза АТФ, субфрагмент-1 миозина (S1) модифицировали флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS и вводили AEDANS-S1 в теневое мышечное волокно. Многостадийные изменения подвижности и пространственной организации головки миозина при моделировании разных стадий цикла гидролиза АТФ изучали с помощью поляризационной флуоресцентной микроскопии. Было показано, что в регулируемых тонких нитях теневого мышечного волокна при высоких концентрациях Ca^{2+} замена *Gly126Arg* значительно увеличивает количество головок миозина, сильно связанных с Ф-актином, при имитации сильного связывания миозина с актином, но уменьшает количество таких головок при имитации слабого связывания миозина. Такие изменения в поведении миозина в цикле гидролиза АТФ указывают на увеличение эффективности работы миозиновых поперечных мостиков. Существенное увеличение относительного количества миозина, сильно связанного с актином, было обнаружено также при низких концентрациях Ca^{2+} . Это свидетельствует об увеличении чувствительности тонкой нити к ионам Ca^{2+} , инициированном заменой *Gly126Arg*. Полученные данные позволяют предположить, что эффекты стабилизации центральной части тропомиозина заменой *Gly126Arg* реализуются через аномальное поведение тропомиозина и тропонина, что приводит к изменению характера взаимодействия миозина с актином и тропомиозином в цикле гидролиза АТФ.

Ключевые слова: аминокислотная замена в тропомиозине, актин-миозиновое взаимодействие, регуляция мышечного сокращения, мышечное волокно, поляризованная флуоресценция

Принятые сокращения: АТФ — аденозинтрифосфорная кислота, АДФ — аденозиндифосфорная кислота, АТРγS — аденозин-5'-[γ-тио]-трифосфорная кислота, Ф-актин — фибриллярный актин, 1,5-IAEDANS — N-иодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтило)этилендиамин, S1 — субфрагмент-1 миозина.

Мышечное сокращение является результатом циклического взаимодействия головок миозина, выступающих из толстых нитей, с актином тонких нитей и АТФ и осуществляется в процессе скольжения тонких и толстых нитей друг относительно друга (Gordon et al., 2000). Имеется достаточно оснований считать, что тонкая нить, состоящая из Ф-актина и расположенного вдоль него тропонин-тропомиозинового комплекса, представляет собой кооперативно-аллостерическую систему. Тропомиозин, тропонин и актин осуществляют регуляцию актин-миозинового взаимодействия в ответ на изменение концентрации Ca^{2+} (Gordon et al., 2000; Hitchcock-Degregori, 2008). При низкой концентрации Ca^{2+} субдомен-1 тропонина связан с актином и тропомиозином, тропомио-

зин смещен к внешнему домену актина, мономеры актина выключены (т. е. ингибирована способность тонкой нити активировать гидролиз АТФ миозином) (McKillop, Gees, 1993; Lehman et al., 1994; Borovikov et al., 2009; Chalovich, 2012). Это так называемое выключенное состояние тонкой нити (Lehman et al., 2013; Lehman, 2017), в котором тропомиозин и актин препятствуют сильному связыванию миозиновых поперечных мостиков с актином (Borovikov et al., 2009; Lehman et al., 2013) и, следовательно, ингибируют гидролиз АТФ миозином и мышечное сокращение (Gordon et al., 2000).

При повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} последний связывается с субдоменом-С тропонина, некоторые актиновые мономеры изменяют конформацию и

переходят во включенное состояние (Borovikov et al., 2009), и тропомиозин перемещается в направлении внутреннего домена актина (Borovikov et al., 2009; Lehman et al., 2013; Lehman, 2017). Это смещение открывает на актине сайты слабого связывания миозина с актином, но сайты сильного связывания с миозином остаются главным образом закрытыми («закрытое» положение тропомиозина) (Lehman et al., 2013; Lehman, 2017). Когда достаточное количество головок миозина сильно связано с актином, тропомиозин смещается еще дальше к внутреннему домену актина (в «открытую» позицию) (Lehman et al., 2013), и подавляющее большинство мономеров актина «включается» (Borovikov et al., 2009) — это так называемое включенное состояние тонкой нити. В этом состоянии тропомиозин полностью открывает сайты связывания миозина на Ф-актине (Lehman et al., 2013) и вместе с актином (Borovikov et al., 2009) активирует гидролиз АТФ и мышечное сокращение (Gordon et al., 2000). Таким образом, тропомиозин играет важную роль в регуляции взаимодействия миозина с актином.

Согласно современным представлениям, молекула тропомиозина состоит из двух α -спиралей, закрученных в суперспираль, периодические взаимодействия которой с Ф-актином являются критическими для стабилизации тонкой нити и регуляции мышечного сокращения (Perry, 2001). Известно, что образованию суперспирали тропомиозина способствует наличие в полипептидной цепи белка непрерывно следующих друг за другом семичленных повторов типа *a-b-c-d-e-f-g* из чередующихся полярных и неполярных аминокислот. Неполярные аминокислотные остатки располагаются в основном в позициях *a* и *d* на одной и той же стороне α -спирали. Образуя связи с аналогичными остатками в позициях *a* и *d* соседней полипептидной цепи, неполярные аминокислоты формируют гидрофобный кор суперспирали. Гидрофобные взаимодействия стабилизируются ионными связями (солевыми мостиками), которые образуются между заряженными аминокислотными остатками, расположенными в позициях *e* и *g* гептоповторов в разных цепях суперспирали. Несколько неканонических остатков (например, Asp137, Tyr214, Glu218, Tyr221, Gln263, Tyr267 и Gly126), а также Ala, Ser и другие полярные и заряженные остатки на границе раздела двух цепей тропомиозина могут дестабилизировать молекулу в этих точках (Brown et al., 1996; Mason, Arndt, 2004). Например, Gly126 в положении *g* может нарушить α -спиральную структуру и межцепочечный солевой мостик. Недавно было показано, что замещение Gly126 на Arg резко снижает протеолитическую восприимчивость остатка Arg133 тропомиозина скелетных мышц, усиливает стабилизацию центральной части молекулы тропомиозина и повышает актин-активируемую Mg^{2+} -АТФазную активность миозина (Nevzorov et al., 2011).

Молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушений работы регуляторной системы мышечного волокна вследствие различных аминокислотных замен в тропомиозине, изучены недостаточно. Ранее, используя метод поляризованной микроскопии, мы показали, что замена глицина на аргинин в позиции 126 изоформы Trpm1.1 тропомиозина вызывает аномальное смещение мутантного тропомиозина к внутреннему домену актина и увеличивает относительное количество включенных мономеров актина при моделировании различных стадий АТФазного цикла, т. е. ингибирует выключение тонкой нити (Rysev et al., 2014).

Целью настоящей работы являлось исследование ответа миозиновых головок на нарушения в функционировании тонких нитей в мышечном волокне, возникающие вследствие стабилизирующей замены остатка глицина на остаток аргинина (Gly126Arg) в тропомиозине. Впервые показано, что нарушение способности регуляторной системы мышечного волокна выключать тонкую нить приводит к аномальному увеличению относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином, как при низких концентрациях ионов кальция (pCa 9), так и при высоких (pCa 4). Полученные данные позволяют предположить, что аномальное смещение мутантного тропомиозина к внутреннему домену актина и ингибирование способности тропонина выключать момеры актина могут вызвать увеличение чувствительности тонкой нити к ионам Ca^{2+} и повышение эффективности работы поперечных миозиновых мостиков в цикле гидролиза АТФ.

Материал и методика

Получение белков. Миозин из быстрых скелетных мышц кролика был приготовлен по описанному методу (Margossian, Lowey, 1982). Субфрагмент-1 миозина (S1) был получен расщеплением скелетного миозина α -химотрипсином в течение 20 мин при 25 °С (Okamoto, Sekine, 1985). Остаток Cys707 в S1 модифицировали 1,5-IAEDANS (Borejdo, Putnam, 1977). Тропонин был изолирован из быстрых скелетных мышц кролика (Potter, 1982). Рекомбинантный тропомиозин дикого типа (изоформа Trpm1.1) и Gly126Arg-мутантный тропомиозин экспрессировали в клетках BL21 (DE3) и очищали, как описано ранее (Robinson et al., 2007). Все рекомбинантные тропомиозины имели две дополнительные аминокислоты (Ala и Ser), которые компенсировали уменьшенное средство рекомбинантного неацетилированного тропомиозина к Ф-актину (Monteiro et al., 1994). Чистоту получения препаратов белков определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Получение теневых мышечных волокон. Пучки мышечных волокон из *m. psoas* кролика обрабатывали раствором глицерина, как описано ранее (Borovikov et al., 2009). Теневые волокна готовили инкубацией одиночных глицеринизированных волокон в течение 1.5 ч в растворе, содержащем 800 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мМ АТФ и 67 мМ Na, К-фосфатный буфер, pH 7.0. Такие волокна содержали около 80 % актина и белки Z-линии. Тропомиозин, тропонин и S1 были включены в Ф-актиновые нити путем инкубации теневых волокон в растворе, содержащем 50 мМ KCl, 3 мМ $MgCl_2$, 1 мМ DTT и 6.7 мМ Na, К-фосфатный буфер, pH 7.0, и соответствующий белок. Несвязанные белки удаляли при инкубации волокон в том же растворе, не содержащем белков. Молярное отношение тропомиозина дикого типа или мутантного тропомиозина к актину составляло 1 : (6.5 ± 2). В отсутствие нуклеотидов и в присутствии ADP, АТР γ S и АТР молярные отношения S1 к актину составляли 1 : (5 ± 2), 1 : (5 ± 2), 1 : (8 ± 2) и 1 : (14 ± 2) соответственно.

Измерение поляризованной флуоресценции мышечного волокна. Работа выполнена на теневых мышечных волокнах, содержащих реконструированные тонкие нити (Borovikov et al., 2009). S1, меченный флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS, вводили в волокно при 4 °С. Несвязавшийся белок удаляли инкубацией

волокон в растворе, содержащем 50 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT и 6.7 мМ Na, К-фосфатный буфер pH 7.0 (Borovikov et al., 2009, 2017). Флуоресценцию возбуждали при 407 ± 5 нм, интенсивность флуоресценции регистрировали в диапазоне длин волн 500—600 нм. Измерения проводили в проточной камере в отсутствие или в присутствии нуклеотидов (3 мМ ADP, 5 мМ АТРγS или 5 мМ АТФ), имитирующих различные стадии цикла гидролиза АТФ. В экспериментах с тропонином растворы дополнительно содержали 0.1 мМ CaCl₂ или 2 мМ EGTA (Borovikov et al., 2009, 2017).

Интенсивности четырех компонентов поляризованной флуоресценции (I_{\perp} , I_{\parallel} , I_{\perp} и I_{\parallel}) регистрировали с помощью поляризационного флуориметра (Borovikov et al., 2004). Полученные данные обрабатывали с помощью модельзависимого метода (Tregear, Mendelson, 1975; Borovikov et al., 2009). Предполагалось, что в мышечном волокне имеются две популяции флуорофоров — популяция упорядоченных флуорофоров, осцилляторы поглощения и излучения которых расположены под углами Φ_A и Φ_E , и популяция хаотически расположенных флуорофоров N. Параметры поляризованной флуоресценции (Φ_E и N) регистрировали при имитации различных стадий АТФазного цикла. Результаты были получены на 5—11 волокнах (20—55 измерений). Статистическую значимость изменений параметров оценивали с использованием *t*-теста Стьюдента при $P < 0.05$.

Результаты

В соответствии с нашими более ранними результатами (Borovikov et al., 2009; Karpicheva et al., 2017), связывание S1, модифицированного флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS, с Ф-актином инициирует появление поляризованной флуоресценции теневого мышечного волокна. Анализ флуоресценции (см. раздел «Материал и методика») показал, что величина угла (Φ_E) между осью волокна и диполем излучения зонда AEDANS для головок миозина, связанных с Ф-актином в отсутствие тропомиозина и тропонина, была 42.7°, относительное количество неупорядоченных зондов (N) составляло 0.37 отн. ед. ($P < 0.05$). Это свидетельствует о том, что зонд жестко связан с головкой миозина и модифицированные головки располагаются в мышечных волокнах упорядоченно (Borovikov et al., 2009, 2017; Karpicheva et al., 2017). Упорядоченное расположение головок миозина на актине позволило нам определить их ориентацию и связывание с Ф-актином на разных стадиях АТФазного цикла. Отсутствие нуклеотидов имитировало состояние актомиозина AM, где A и M обозначают конформационные состояния актина и головки миозина соответственно. ADP, АТРγS и АТР в комплексе с Mg использовали для имитации промежуточных структурных состояний актомиозина AM[^]·ADP, AM*·ADP и AM**·ADP·Pi соответственно (Roopnarine, Thomas, 1996; Goody, Hofmann, 1980), где M[^], M* и M** — различные конформационные состояния головки миозина, Pi — неорганический фосфат. В цикле гидролиза АТФ головки миозина в различных состояниях, по-видимому, находятся в быстром динамическом равновесии (Geeves, 1991). Поэтому принимается, что при моделировании каждое промежуточное состояние миозина, соответствующее определенной стадии АТФазного цикла, может быть представлено смесью указанных выше подсостояний с преобладанием одного из

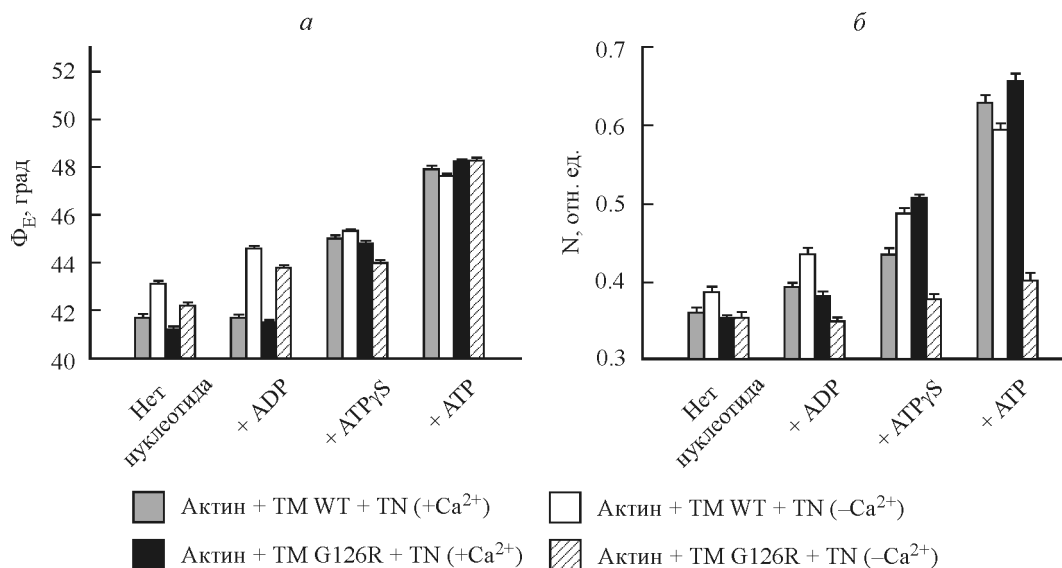
них (Borovikov et al., 2009). Следует заметить, что в наших стационарных (steady-state) экспериментах было невозможно различить каждое из подсостояний, поэтому мы предположили, что в отсутствие нуклеотидов и в присутствии MgADP моделируются состояния AM и AM[^]·ADP, в которых миозин сильно связан с актином, тогда как в присутствии MgАТРγS или MgАТР моделируются состояния AM*·ADP и AM**·ADP·Pi АТФазного цикла, в которых миозин и актин связаны слабо (Borovikov et al., 2009).

Величина угла Φ_E и доля неупорядоченных флуорофоров N в присутствии тропонина и тропомиозина дикого типа или мутантной формы при высоких (pCa 4) и низких (pCa 9) концентрациях Ca²⁺ при имитации различных стадий цикла гидролиза АТФ были разными (см. рисунок). Так, присоединение к тонким нитям, декорированным AEDANS-S1, тропомиозина дикого типа и тропонина при pCa 9 приводит к уменьшению значений угла Φ_E от 42.7 до 41.7°, $P < 0.05$, и N от 0.37 до 0.36 отн. ед., $P < 0.05$ (см. рисунок). Такие изменения параметров Φ_E и N можно интерпретировать как увеличение количества головок миозина, сильно связанных с актином в конформации AM (Borovikov et al., 2009, 2017; Karpicheva et al., 2017). Наоборот, при низких концентрациях Ca²⁺ (pCa 9) параметры Φ_E и N увеличиваются (на 0.3° и 0.017 отн. ед. соответственно, $P < 0.05$; см. рисунок), следовательно, относительное количество головок миозина, сильно связанных с актином тонких нитей (т. е. в конформации AM), уменьшается (Borovikov et al., 2009, 2017; Karpicheva et al., 2017).

Как видно на рисунке, замена тропомиозина дикого типа на мутантный (*Gly126Arg*) существенно увеличивает количество головок миозина, сильно связанных с актином, как при высоких, так и при низких концентрациях Ca²⁺. Такой вывод можно сделать на основании характера изменения параметров Φ_E и N. Оказалось, что такая замена существенно уменьшает значения Φ_E и N — на 0.5° и 0.007 отн. ед. при pCa 4 и на 0.9° и 0.033 отн. ед. при pCa 9 ($P < 0.05$). Таким образом, замена *Gly126Arg* существенно увеличивает относительное количество головок миозина, сильно связанных с актином при имитации состояния AM АТФазного цикла, как при высоких, так и при низких концентрациях ионов кальция. Следовательно, замена *Gly126Arg* увеличивает количество головок миозина в конформации AM в присутствии как высоких, так и низких концентраций Ca²⁺.

Увеличение относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином, наблюдали также при моделировании сильной формы связывания AM[^]·ADP и слабой формы связывания AM*·ADP стадии АТФазного цикла. Однако при моделировании слабой формы связывания — стадии AM**·ADP·Pi — заметных различий параметра Φ_E для экспериментов с тропомиозином дикого типа и мутантным тропомиозином не обнаружили (см. рисунок, а). Таким образом, замена *Gly126Arg* может существенно изменять характер взаимодействия миозина с актином только на некоторых стадиях АТФазного цикла: может увеличить количество головок миозина, сильно связанных с актином, например в конформации AM. Однако при моделировании расслабления мышечного волокна заметных изменений ориентации головок миозина под влиянием замены *Gly126Arg* не было обнаружено.

Интересно отметить, что в экспериментах с мутантным тропомиозином величина параметра N при pCa 9 была существенно ниже соответствующих значений N в экспериментах с тропомиозином дикого типа (см. рису-



Влияние замены *Gly126Arg* в тропомиозине, Ca^{2+} и тропонина на значения угла излучения флуорофоров Φ_E (а) и относительного количества хаотически расположенных флуорофоров N (б) поляризованной флуоресценции субфрагмента-1 миозина, меченного 1,5-IAEDANS, при имитации различных стадий цикла гидролиза АТФ актомиозином.

Параметры Φ_E и N существенно изменяются под влиянием аминокислотной замены, концентрации Ca^{2+} и нуклеотидов. Все изменения достоверны ($P < 0.05$). Вертикальные отрезки показывают стандартную ошибку среднего значения. TM WT — тропомиозин дикого типа, G126R — тропомиозин с заменой *Gly126Arg*, TN — тропонин.

нок, б). Так как уменьшение значения N свидетельствует об увеличении жесткости связывания головки миозина с Ф-актином и тропомиозином (Borovikov et al., 2009), уменьшение величины N для тонкой нити, содержащей мутантный тропомиозин, при моделировании стадий $\text{AM}^* \cdot \text{ADP}$ и $\text{AM}^{**} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ АТФазного цикла можно объяснить задерживанием небольшого количества головок миозина в конформации сильных форм актин-миозинового взаимодействия, например головок миозина в конформации AM или $\text{AM}^{\wedge} \cdot \text{ADP}$ (Borovikov et al., 2017).

Как видно на рисунке, мутантный тропомиозин увеличивает амплитуду изменения параметра Φ_E при изменении конформации головки миозина из состояния $\text{AM}^{**} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}_i$ в состояние AM. Действительно, для мутантного тропомиозина Φ_E уменьшается от 48.2 до 41.2°, $P < 0.05$, тогда как для тропомиозина дикого типа этот параметр уменьшался от 47.9 до 41.7°, т. е. в случае мутантного тропомиозина амплитуда изменений Φ_E возросла на 13 % по сравнению с тропомиозином дикого типа. Поскольку считается, что изменение положения SH1-спирали (область локализации зонда) передается на «рычаг» (регуляторный домен) миозина, вращение которого играет ключевую роль в развитии силы поперечным миозиновым мостиком, увеличение амплитуды движения SH1-спирали в АТФазном цикле указывает на то, что замена в тропомиозине увеличивает среднестатистическую эффективность работы миозиновых мостиков (Fujita et al., 2004).

Таким образом, замена *Gly126Arg* в тропомиозине увеличивает относительное количество головок миозина, которые находятся в конформации сильного связывания, при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТФ как при высоких, так и при низких концентрациях Ca^{2+} . Обнаружено задерживание небольшого количества головок миозина в конформации AM или $\text{AM}^{\wedge} \cdot \text{ADP}$ и увеличение амплитуды движения головок миозина (или SH1-спирали миозина) в цикле гидролиза АТФ. Предпо-

лагается, что аномальное смещение тропомиозина к внутреннему домену актина и ингибирование способности тропонина включать и выключать мономеры актина (Rysev et al., 2014) могут вызвать увеличение Ca^{2+} -чувствительности тонкой нити и повысить эффективность работы миозинового поперечного мостика.

Обсуждение

Известно, что тропомиозин представляет собой суперспираль, состоящую из двух α -спиралей (Hitchcock-Degregori, 2008). В тонкой нити мышечного волокна молекулы тропомиозина собираются в два непрерывных тяжа, симметрично расположенных вдоль желобков Ф-актина по всей его длине (Gordon et al., 2000). Тяжи тропомиозина обладают способностью смещаться относительно внутреннего домена актина в зависимости от концентрации Ca^{2+} и в ответ на связывание S1 и таким способом осуществлять регуляцию взаимодействия миозина с актином в цикле гидролиза АТФ (Lehman et al., 1994, 2013; Lehman, 2017). Недавно было показано, что замена *Gly126* на *Arg* в изоформе тропомиозина Trpm1.1 из быстрых скелетных мышц вызывает снижение гибкости центральной части молекулы (Nevzorov et al., 2011). Помимо влияния на среднюю часть замена *Gly126Arg* изменяет гибкость С-конца тропомиозина. При этом изменяется также гибкость Ф-актина (Rysev et al., 2014). Было выдвинуто предположение о том, что изменения гибкости тропомиозина и Ф-актина являются следствием конформационных изменений этих белков, вызванных изменением электростатических связей между цепями тропомиозина и Ф-актином. Оказалось, что замена *Gly126Arg* индуцирует также изменение взаимного расположения тропомиозина и мономеров актина (Rysev et al., 2014). Это означает, что замена вызывает такие конформационные изменения тропомиозина и Ф-актина, которые могут

распространяться на области, участвующие в контакте между этими белками. Оказалось, что замена Gly126Arg сдвигает тяжи тропомиозина к центру нитей в открытую позицию, т. е. в позицию, при которой тропомиозин и актин не мешают головкам миозина образовывать с актином существенную для генерации силы сильную форму связывания. Кроме того, этот мутантный тропомиозин активирует включение мономеров актина на всех стадиях АТФазного цикла (Rysev et al., 2014). Предполагается, что эффект замены Gly126Arg обусловлен изменением электростатического взаимодействия между тропомиозином, Ф-актином и миозином в цикле гидролиза АТФ (Rysev et al., 2014).

В настоящей работе мы обнаружили, что аномальное смещение тропомиозина к внутреннему домену Ф-актина и увеличение количества включенных мономеров актина в АТФазном цикле (Rysev et al., 2014) активируют образование сильных форм связывания миозина с актином, существенных для генерации силы, при моделировании различных стадий АТФазного цикла (см. рисунок). Появление аномально высокого количества головок миозина, сильно связанных с актином при низких концентрациях Ca²⁺ демонстрирует увеличение Ca²⁺-чувствительности тонких нитей (Borovikov et al., 2017).

Следует отметить, что увеличение Ca²⁺-чувствительности (Shchepkin et al., 2013; Matyushenko et al., 2017) и увеличение силы, развиваемой поперечными миозиновыми мостиками (Shchepkin et al., 2017), были обнаружены также для тропомиозина, имеющего две замены — Gly126Arg и Cys190Ala. Поскольку замена Cys190Ala, по-видимому, не оказывает существенного влияния на функциональные свойства тропомиозина дикого типа (Matyushenko et al., 2017), можно предположить, что нарушения регуляции актин-миозинового взаимодействия, ассоциированные с заменами Gly126Arg и Cys190Ala, обусловлены главным образом заменой Gly126Arg, которая, как известно, вызывает аномальное поведение тропомиозина и тропонина в АТФазном цикле — «замораживание» тропомиозина недалеко от внешнего домена актина и увеличение количества включенных мономеров актина (Rysev et al., 2014). Если действительно замена Cys190Ala не оказывает существенного влияния на функциональные свойства тропомиозина (Matyushenko et al., 2017), то повышение Ca²⁺-чувствительности тонких нитей, содержащих замены Gly126Arg и Cys190Ala в тропомиозине (Shchepkin et al., 2013), и увеличение силы в экспериментах с таким мутантным тропомиозином (Shchepkin et al., 2017) могут быть ассоциированы с аномальным смещением мутантного тропомиозина в направлении внутреннего домена актина и увеличением количества включенных мономеров актина в АТФазном цикле.

Таким образом, применение метода поляризационной микроскопии и мышечных волокон с реконструированными тонкими нитями позволило исследовать влияние замены Gly126Arg в тропомиозине на взаимодействие миозина с актином в цикле гидролиза АТФ. Было показано, что нуклеотиды и Ca²⁺ вызывают изменение конформационного состояния этих белков и могут нарушить равновесное состояние ансамбля тропомиозина с тропонином, тем самым индуцируя переход тонкой нити во включенное состояние. Результаты, полученные нами ранее, указывают на то, что образование вследствие замены Gly126Arg нового солевого мостика может вызвать стабилизацию тонкой нити — ингибировать переход тонкой нити из включенного состояния в выключенное. Это мо-

жет быть причиной увеличения Ca²⁺-чувствительности тонкой нити и активации формирования сильных форм связывания миозина с актином в цикле гидролиза АТФ (см. рисунок). По-видимому, данная замена может действовать посредством изменения электростатического взаимодействия между тропомиозином, тропонином, актином и миозином (Rysev et al., 2014).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-14-01224). Работа по получению рекомбинантных препаратов тропомиозина дикого типа и Gly126Arg-мутантной формы была выполнена при финансовой поддержке FEBS Collaboration Scholarship.

Список литературы

- Borejdo J., Putnam S. 1977. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibres in rigor and relaxation. *Biochim. biophys. acta.* 459 : 578—595.
- Borovikov Y. S., Karpicheva O. E., Avrova S. V., Redwood C. S. 2009. Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and Ca²⁺. *Biochim. biophys. acta.* 1794 : 985—994.
- Borovikov Y. S., Rysev N. A., Avrova S. V., Karpicheva O. E., Borys D., Moraczewska J. 2017. Molecular mechanisms of deregulation of the thin filament associated with the R167H and K168E substitutions in tropomyosin Tpm 1.1. *Arch. Biochem. Biophys.* 614 : 28—40.
- Brown J. H., Cohen C., Parry D. A. 1996. Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins.* 26 : 134—145.
- Chalovich J. M. 2012. Disease causing mutations of troponin alter regulated actin state distributions. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 33 : 493—499.
- Fujita H., Lu X., Suzuki M., Ishiwata S., Kawai M. 2004. The effect of tropomyosin on force and elementary steps of the cross-bridge cycle in reconstituted bovine myocardium. *J. Physiol.* 556 : 637—649.
- Geeves M. A. 1991. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem. J.* 274 : 1—14.
- Goody R. S., Hofmann W. 1980. Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1 : 101—115.
- Gordon A. M., Homsher E., Regnier M. 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 80 : 853—924.
- Hitchcock-Degregori S. E. 2008. Tropomyosin: function follows structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 644 : 60—72.
- Karpicheva O. E., Sirenko V. V., Rysev N. A., Simonyan A. O., Borys D., Moraczewska J., Borovikov Y. S. 2017. Deviations in conformational rearrangements of thin filaments and myosin caused by the Ala155Thr substitution in hydrophobic core of tropomyosin. *Biochim. biophys. acta.* 1865 : 1790—1799.
- Lehman W. 2017. Switching muscles on and off in steps: the McKillop—Geeves three-state model of muscle regulation. *Bioophys J.* 112 : 2459—2466.
- Lehman W., Craig R., Vibert P. 1994. Ca²⁺-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature.* 368 : 65—67.
- Lehman W., Orzechowski M., Li X. E., Fischer S., Raunser S. 2013. Gestalt-binding of tropomyosin on actin during thin filament activation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 34 : 155—163.
- Margossian S., Lowey S. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzym.* 85 : 55—71.
- Mason J. M., Arndt K. M. 2004. [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760737](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760737) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem.* 5 : 170—176.

- Matyushenko A. M., Artemova N. V., Shchepkin D. V., Kopylova G. V., Nabiev S. R., Nikitina L. V., Levitsky D. I., Bershitsky S. Y. 2017. The interchain disulfide cross-linking of tropomyosin alters its regulatory properties and interaction with actin filament. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 : 305—309.
- McKillop D. F., Geeves M. A. 1993. Regulation of the interaction between actin and myosin S1 : evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* 65 : 693—701.
- Monteiro P. B., Lataro R. C., Ferro J. A., Reinach C. 1994. Functional alpha-tropomyosin produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269 : 10 461—10 466.
- Nevzorov I. A., Nikolaeva O. P., Kainov Y. A., Redwood C. S., Levitsky D. I. 2011. *J. Biol. Chem.* 286 : 15 766—15 772.
- Okamoto Y., Sekine T. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biol. Chem.* 98 : 1143—1145.
- Perry S. V. 2001. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22 : 5—49.
- Potter J. D. 1982. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzym.* 85 : 241—263.
- Robinson P., Lipscomb S., Preston L. C., Altin E., Watkins H., Ashley C. C., Redwood C. S. 2007. Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and beta-tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function. *FASEB J.* 21 : 896—905.
- Roopnarine O., Thomas D. D. 1996. Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* 70 : 2795—2806.
- Rysev N. A., Nevzorov I. A., Avrova S. V., Karpicheva O. E., Redwood C. S., Levitsky D. I., Borovikov Y. S. 2014. Gly126Arg substitution causes anomalous behaviour of α -skeletal and β -smooth tropomyosins during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 543 : 57—66.
- Shchepkin D. V., Matyushenko A. M., Kopylova G. V., Artemova N. V., Bershitsky S. Y., Tsaturyan A. K., Levitsky D. I. 2013. Stabilization of the central part of tropomyosin molecule alters the Ca^{2+} -sensitivity of actin-myosin interaction. *Acta Nat.* 5 : 126—129.
- Shchepkin D. V., Nabiev S. R., Kopylova G. V., Matyushenko A. M., Levitsky D. I., Bershitsky S. Y., Tsaturyan A. K. 2017. Cooperativity of myosin interaction with thin filaments is enhanced by stabilizing substitutions in tropomyosin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 38 : 183—191.
- Tregear R. T., Mendelson R. A. 1975. Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle. *Biophys. J.* 15 : 455—467.

Поступила 16 IV 2018

THE EFFECT OF THE *Gly126Arg* SUBSTITUTION IN ALPHA-TROPOMYOSIN ON THE INTERACTION BETWEEN MYOSIN AND ACTIN IN ATP HYDROLYSIS CYCLE

N. A. Rysev,¹ I. A. Nevzorov,² O. E. Karpicheva,¹ S. V. Avrova,¹
D. I. Levitsky,³ Yu. S. Borovikov^{1,*}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland, 00014, and

³ A. N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, 119071;

* e-mail: borovikov@incras.ru

It is known that the regulation of muscle contraction is carried out by tropomyosin and Ca^{2+} -sensitive protein troponin which form together with F-actin thin filaments in muscle fibre. The non-canonical glycine residue at the 126th position in the central part of skeletal alpha-tropomyosin destabilizes the structure of this protein. Replacing this amino acid with arginine stabilizes the central region of tropomyosin, displaces tropomyosin to the open position and activates the switching on of actin monomers in the ATP hydrolysis cycle. In order to investigate how the *Gly126Arg* substitution affects the interaction of the myosin head with F-actin in the ATP hydrolysis cycle, we labeled the myosin subfragment-1 (S1) with fluorescent probe 1,5-IAEDANS and incorporated AEDANS-S1 into the ghost muscle fibre. Multistage changes in the mobility and spatial organization of the myosin head during modeling of different stages of the ATP hydrolysis cycle were studied using polarization fluorescence microscopy. It has been shown that in the regulated thin filaments of the ghost muscle fibre at high concentrations of Ca^{2+} , the *Gly126Arg* substitution significantly increases the number of myosin heads strongly associated with F-actin when simulating strong binding of myosin to actin, but reduces the number of such heads when imitating weak binding of myosin. Such changes in the behavior of myosin in the ATP hydrolysis cycle indicate an increase in the efficiency of myosin cross-bridges. A significant increase in the relative amount of myosin strongly bound to actin was also observed at low Ca^{2+} concentrations. This indicates an increase in the sensitivity of the thin filament to Ca^{2+} ions initiated by the *Gly126Arg* substitution. The obtained data suggest that the effects of stabilization of the central part of tropomyosin by the *Gly126Arg* substitution are realized through the abnormal behavior of tropomyosin and troponin, which lead to a change in the nature of the interaction of myosin with actin and tropomyosin in the ATP hydrolysis cycle.

Key words: substitution in tropomyosin, actin-myosin interaction, regulation of muscle contraction, muscle fibre, polarized fluorescence microscopy