

УДК 577.3

Стабилизация центральной части тропомиозина изменяет чувствительность актин-миозинового взаимодействия к ионам кальция

Д. В. Щепкин¹, А. М. Матюшенко², Г. В. Копылова¹, Н. В. Артемова², С. Ю. Бершицкий¹, А. К. Цатурян³, Д. И. Левицкий^{2,4*}

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33

³Институт механики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Мичуринский просп., 1

⁴НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Поступило в редакцию 23.04.2013

РЕФЕРАТ Показано, что мутации D137L и G126R, стабилизирующие центральную часть молекулы тропомиозина (ТМ), увеличивают максимальную скорость скольжения регулируемых актиновых филаментов в искусственной подвижной системе при высоких концентрациях Ca^{2+} и повышают Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение. На основе анализа опубликованных данных о структуре комплекса актин-ТМ-миозин высказано предположение, что физиологические эффекты этих мутаций в ТМ могут быть обусловлены влиянием на взаимодействия между центральной частью ТМ и определенными участками головки миозина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актин, искусственная подвижная система, миозин, регуляция мышечного сокращения, тропомиозин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПС – искусственная подвижная система; ТМ – тропомиозин.

ВВЕДЕНИЕ

Тропомиозин (ТМ) является одним из ключевых компонентов регуляторного аппарата тонких филаментов всех типов мышц. Согласно теории «стерического блокирования», лежащей в основе современных представлений о механизме регуляции сокращения скелетной и сердечной мышц, ТМ способен перемещаться по поверхности актинового филамента, открывая или закрывая участки взаимодействия актлина с головками молекул миозина [1]. Молекула ТМ представляет собой димер α -спиралей, образующих левозакрученную суперспираль (coiled-coil) [2]. В последнее время накапливаются данные о том, что структура молекулы ТМ далеко не так проста, как считалось ранее. Отмечаются такие необычные, характерные только для ТМ черты структуры, как наличие участков с повышенной конформационной подвижностью. В центральной части молекулы ТМ обнаружены консервативные неканонические остатки, нарушающие coiled-coil-структуру в этой

области, – Asp137 [3] и Gly126 [4]. Замена этих остатков на канонические (мутации D137L, G126R и G126A) приводила к стабилизации центральной части молекулы ТМ, полностью предотвращая расщепление ТМ трипсином по близлежащему Arg133 [3, 4]. Более того, в обеих работах было показано, что стабилизирующие мутации D137L и G126R (но не G126A) вызывают значительное увеличение активности актин-активируемой АТФ-азы головок миозина при высоких концентрациях кальция ($pCa \leq 5$) при их взаимодействии с актиновыми нитями, содержащими ТМ и тропонин, но при этом не оказывают влияния ни на Ca^{2+} -чувствительность АТФ-азы, ни на сродство ТМ к актину [3, 4]. В настоящей работе мы более подробно исследовали влияние этих мутаций на регуляторные свойства ТМ, впервые используя для этой цели более чувствительный метод искусственной подвижной системы (ИПС, *in vitro* motility assay), позволяющий регистрировать скорость движения реконструированных тонких фила-

ментов по поверхности, на которой иммобилизован миозин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный скелетно-мышечный α -ТМ с мутациями D137L и G126R получали, как описано ранее [4], используя в качестве белка дикого типа ТМ, в котором Cys190 заменен на Ala (мутация C190A) [3]. Эксперименты и измерения характеристик скольжения регулируемых тонких нитей в ИПС при разных концентрациях Ca^{2+} проводили согласно описанной ранее методике [5]. Проточную камеру, покрытую изнутри нитроцеллюлозой, загружали раствором миозина из скелетных мышц кролика в концентрации 0.5 мкМ (0.2 мг/мл). Неприсоединившийся миозин отмывали и загружали регулируемые тонкие нити, состоящие из 10 нМ F-актина, меченного родамин-фаллоидином, 0.1 мкМ тропонина и 0.1 мкМ ТМ в буфере, содержащем 25 мМ KCl, 25 мМ имидазол, 2 мМ АТФ, 4 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 20 мМ ДТТ, 3.5 мг/мл глюкозы, 20 мкг/мл каталазы и 0.15 мг/мл глюкозооксидазы, рН 7.5. (Такие условия оптимальны для изучения скорости скольжения реконструированных тонких филаментов в ИПС [6].) Концентрации свободного кальция задавали соотношением EGTA/ Ca -EGTA, рассчитанным с помощью программы WebMaxC Standard (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>). Эксперименты проводили при 30°C, скорость скольжения тонких нитей измеряли с помощью программы GMimPro [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что мутации D137L и G126R, стабилизирующие центральную часть молекулы ТМ, не только увеличивают на 20–30% максимальную скорость скольжения регулируемых тонких нитей в ИПС при высоких концентрациях Ca^{2+} (рис. 1А), но и повышают чувствительность скорости скольжения к Ca^{2+} , смещая кривую Ca -зависимости в сторону более низких концентраций Ca^{2+} (рис. 1Б). Величина pCa_{50} (т.е. отрицательный логарифм концентрации свободного Ca^{2+} , при которой скорость скольжения полумаксимальна) составляла 6.06 ± 0.04 (здесь и далее приведены средние значения \pm ошибка среднего) для регулируемых тонких филаментов, содержащих контрольный ТМ с мутацией C190A, 6.36 ± 0.05 для филаментов, содержащих ТМ с мутациями D137L/C190A, и 6.42 ± 0.03 для филаментов с мутациями ТМ G126R/C190A. Таким образом, нам впервые удалось показать, что стабилизирующие мутации D137L и G126R в центральной части молекулы ТМ заметно повышают Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, лежащего

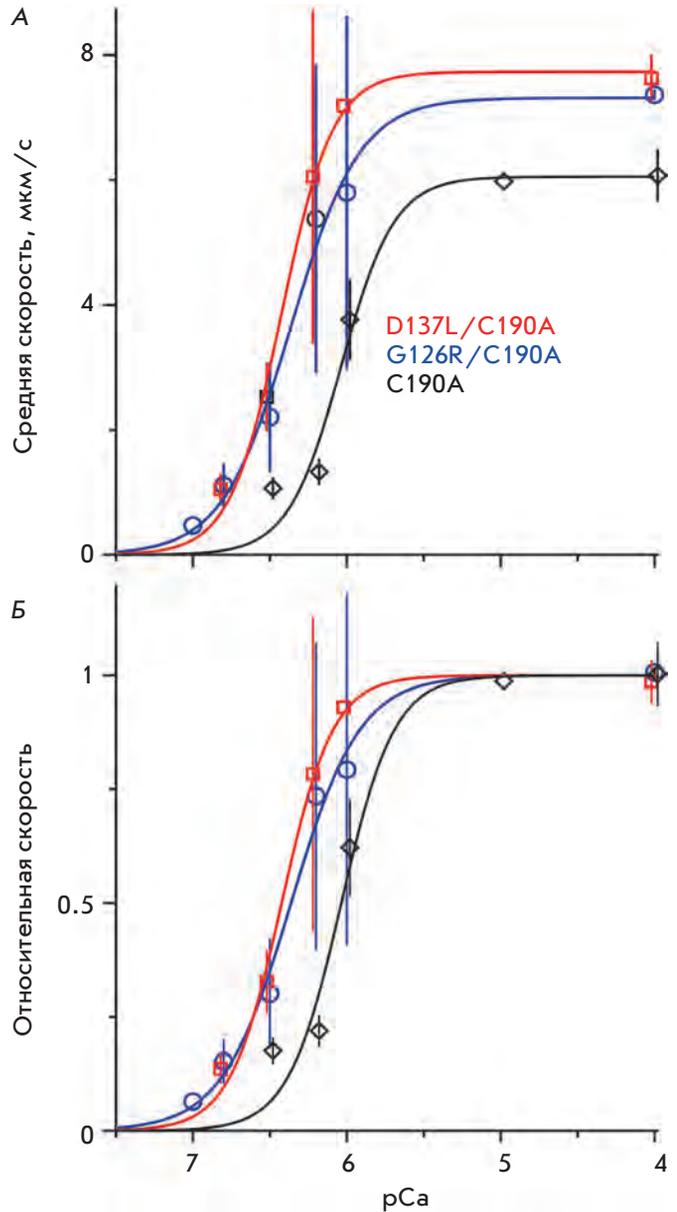


Рис. 1. Зависимость средней скорости скольжения регулируемых тонких нитей по поверхности, покрытой миозином, от концентрации Ca^{2+} . А — Средние данные по 2–3 экспериментам с каждым из мутантов ТМ. Вертикальные линии — среднеквадратичные отклонения. Б — Нормализованные зависимости для данных, представленных на части А

в основе молекулярного механизма мышечного сокращения и регулируемого изменениями концентрации Ca^{2+} в мышечном волокне. Данные об увеличении скорости скольжения нитей в ИПС (рис. 1А) хорошо коррелируют с увеличением скорости АТФ-азы миозина в присутствии регулируемых тонких нитей

с мутациями D137L и G126R в центральной части ТМ при насыщающей концентрации Ca^{2+} [3, 4].

Для интерпретации результатов мы избрали новый подход, основанный на анализе недавно опубликованных данных о структуре комплекса актин–ТМ–миозин, полученной с разрешением 8 Å методом криоэлектронной микроскопии [8]. Важной особенностью этой структуры являются непосредственные контакты между молекулой ТМ, расположенной на поверхности актинового филамента, и определенными участками головки миозина. Поскольку эта структура была получена с использованием немусечного миозина-I, мы при построении нашей модели (рис. 2) заменили участки взаимодействия с ТМ в миозине-I на соответствующие участки головки миозина-II скелетных мышц, использованного в наших опытах. При построении модели мы искали те остатки в головке миозина, которые находятся достаточно близко от остатков в положениях 126 и 137 в центральной части ТМ и могли бы вступать с ними во взаимодействия. Результаты этого поиска представлены на рис. 2. Оказалось, что остаток Gly126 не способен к каким-либо взаимодействиям с миозином, однако вследствие мутации G126R остаток Arg126 в ТМ оказывается вблизи от остатка Lys399 в головке миозина, и между положительно заряженными атомами этих остатков возникнет электростатическое отталкивание (рис. 2А). В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что замена остатка Gly126 в ТМ не на заряженный Arg, а на маленький и гидрофобный Ala не влияла на АТФ-азную активность миозина в комплексе с регулируемым актиновыми филаментами [3]. С другой стороны, отрицательно заряженный остаток Asp137 находится близко от положительно заряженного остатка Arg371 в головке миозина и вступает с ним в электростатическое взаимодействие (рис. 2Б), которое нарушается при замене остатка Asp137 на остаток лейцина вследствие мутации D137L.

Таким образом, в обоих случаях мутации в центральной части ТМ должны приводить к уменьшению энергии взаимодействия ТМ с головкой миозина, прочно присоединенной к актину. Величина такого уменьшения энергии мала по сравнению с энергией прочного связывания миозина с актином [8], но сопоставима с энергией, нужной для перемещения ТМ по поверхности актинового филамента. Согласно теории «стерического блокирования» [1, 9], в отсутствие Ca^{2+} тропонин удерживает ТМ в положении, в котором он закрывает участки связывания на актине от миозина. При повышении концентрации Ca^{2+} тропонин отсоединяется от актлина и ТМ смещается, приоткрывая эти участки. Головки миозина вначале присоединяются к актину «слабо» и непрочно, а за-

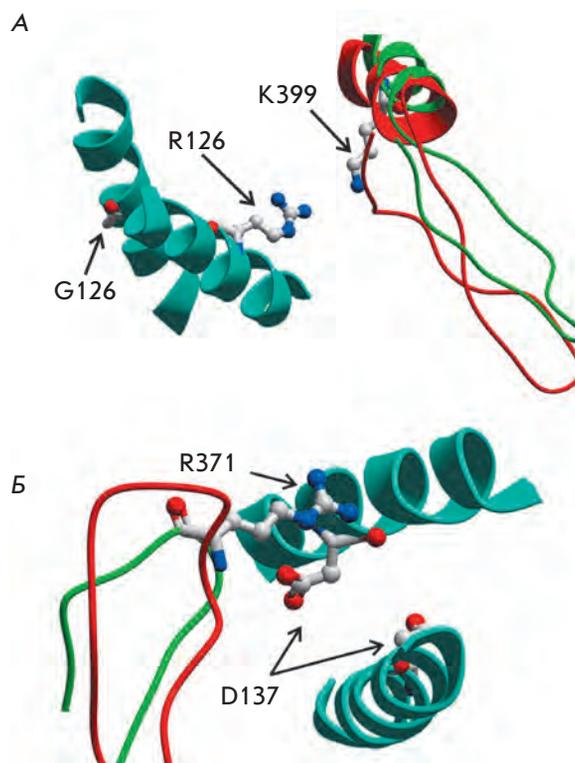


Рис. 2. Структурная модель области контакта миозиновой головки с ТМ на поверхности актинового филамента при прочном связывании миозина с актином. Показаны только участки миозиновой головки, прилегающие к аминокислотным остаткам 126 (А) и 137 (Б) в центральной части ТМ (актин и остальные части миозина и ТМ не показаны). Модель получена из структуры комплекса актин–ТМ–миозин ([8], код pdb 4A7H) встраиванием верхнего 50-кДа домена головки миозина-II быстрых скелетных мышц цыпленка (код pdb 2MYS) вместо головки миозина-I. Сегменты двойной α -спирали ТМ показаны голубыми лентами, участки головки миозина-I, использованного в работе [8], – красным, а участки головки скелетно-мышечного миозина-II – зеленым. В атомном представлении показаны остатки R126 в ТМ с мутацией G126R (А) и «неканонический» остаток D137 в молекуле ТМ (Б), замененный на Leu в мутантном белке D137L/C190A, а также заряженные остатки миозиновой головки K399 (А) и R371 (Б), расположенные в непосредственной близости от этих остатков ТМ. Расстояния между заряженными атомами остатков K399 в миозине и R126 в ТМ (А) составили в модели 8.8 Å, а между R371 миозина и D137 в ТМ (Б) – 4.7 Å. Модель и рисунок подготовлены с помощью программы ICM-Browser (MolSoft, Калифорния, США)

тем переходят в состояние «сильного» связывания и еще дальше смещают тяжи ТМ, освобождая все больше мест связывания миозина на соседних мономерах актина. Судя по нашим данным, исследованные мутации в центральной части ТМ усиливают его смещение по поверхности актиновой нити в результате прочного связывания миозиновой головки и соответственно дают возможность большему количеству соседних миозиновых головок присоединиться к актину и совершать работу. Именно этим можно, по-видимому, объяснить заметное влияние

таких мутаций в молекуле ТМ на скорость и Ca^{2+} -чувствительность скольжения регулируемых актиновых филаментов в ИПС. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 12-04-00411-а, 11-04-00750-а,
11-04-00908-а и 12-04-31328-мол-а,
13-04-40099, 13-04-40100, 13-04-40101)
и Программой «Молекулярная и клеточная
биология» Президиума РАН.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McKillop D.F.A., Geeves M.A. // *Biophys. J.* 1993. V. 65. P. 693–701.
2. Невзоров И.А., Левицкий Д.И. // *Успехи биол. химии.* 2011. Т. 51. С. 283–334.
3. Sumida J.P., Wu E., Lehrer S.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 6728–6734.
4. Nevzorov I.A., Nikolaeva O.P., Kainov Y.A., Redwood C.S., Levitsky D.I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 15766–15772.
5. Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nikitina L.V., Katsnelson L.B., Bershitsky S.Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 401. № 1. P. 159–163.
6. Homsher E., Kim B., Bobkova A., Tobacman L.S. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. № 4. P. 1881–1892.
7. Mashanov G.I., Molloy J.E. // *Biophys. J.* 2007. V. 92. № 6. P. 2199–2211.
8. Behrmann E., Müller M., Penczek P.A., Mannherz H.G., Manstein D.J., Raunser S. // *Cell.* 2012. V. 150. № 2. P. 327–338.
9. Lehman W., Craig R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. V. 644. P. 95–109.