

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ИЗГИБНУЮ ЖЕСТКОСТЬ АКТИНОВОЙ НИТИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

Набиев С.Р.¹, Никитина Л.В.¹, Матюшенко А.М.², Щепкин Д.В.¹, Копылова Г.В.¹

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

ул. Первомайская, 91, г. Екатеринбург, 620041, РФ; e-mail: salavatik2003@gmail.com

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Ленинский просп., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ

Поступила в редакцию 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0475

Аннотация. Для обеспечения сократительной функции мышц важна стабильность тонкой нити, в поддержании которой принимают участие актин-связывающие белки тропомиозин и тропомодулин (Tmod). Известно, что наличие регуляторного белка тропомиозина на актиновой нити увеличивает её жёсткость. Тропомодулин представляет собой актин-кэпирующий белок, который связывается с минус-концом актиновой нити, предотвращает её разборку, регулирует её длину и определяет её стабильность. В сократительном аппарате поперечно-полосатых мышц экспрессируется две изоформы тропомодулина – Tmod1 и Tmod4. Изоформа Tmod1 экспрессируется в миокарде, и обе изоформы экспрессируются в быстрых скелетных мышцах. Используя метод оптической ловушки, проанализировано влияние актин-связывающих белков, тропомиозина и тропомодулина (изоформ Tmod1 и Tmod4), на изгибную жёсткость актиновой нити. Обнаружено, что присутствие регуляторных белков тропомиозин и тропонина на актиновой нити увеличивает её изгибную жёсткость. Изоформы тропомодулина по-разному влияли на неё. Изоформа Tmod4 уменьшала изгибную жёсткость тонкой нити, реконструированной из актина, тропонина и тропомиозина, а изоформа Tmod1 не влияла на неё. Полученные результаты говорят об изоформ специфическом взаимодействии тропомодулина с актином и тропомиозином.

Ключевые слова: актин, тропомиозин, тропомодулин, изгибная жесткость, оптическая ловушка.

ВВЕДЕНИЕ

В сократительном аппарате саркомера кардиомиоцита актин связан с актин-связывающими белками, к которым относятся тропомиозин и тропомодулин, определяющие стабильность тонкой нити, что является важным условием для осуществления сократительной функции саркомера. Тропомиозин вместе с тропонином принимает участие в кальциевой регуляции сокращения миокарда. Молекула тропомиозина представляет собой двойную супер-спираль. Соседние молекулы тропомиозина взаимодействуют N- и C-концами, образуя непрерывный тяж на поверхности актиновой нити.

Тропомодулин (Tmod) является кэпирующим белком, который связывается с медленно растущим минус-концом актиновой нити, предотвращает её разборку и присоединение новых глобул актина [1], тем самым регулируя её длину [2], а также определяя стабильность актиновой нити [3,4]. В сократительном аппарате поперечно-полосатых мышц экспрессируется две изоформы тропомодулина Tmod1 и Tmod4. N-концевая часть Tmod1 содержит два тропомиозин-связывающих сайта и один тропомиозин-зависимый сайт кэпирования актина [5,6]. Благодаря наличию двух сайтов связывания молекула Tmod1 связывает две молекулы тропомиозина на минус конце актиновой нити [7].

Для поддержания нормальной длины тонкой нити саркомера необходимо взаимодействие Tmod и другого белка семейства тропомодулинов, лейомодина, с минус-концом тонкой нити. Важную роль в этом взаимодействии играет N-терминальная часть молекулы тропомиозина [8]. Взаимодействие Tmod с тропомиозином предотвращает деполимеризацию тонкого филамента. Тропомиозин в 1000 раз усиливает связывание Tmod1 с минус концом актиновой нити [6].

Тропомодулин является одним из белков, который одновременно взаимодействует с актиновой нитью и тропомиозином, и для нормального функционирования саркомера важна координация взаимодействия этих трех белков. В работе с помощью метода оптической ловушки исследовано влияние сердечной изоформы тропомиозина, альфа-тропомиозина, и двух изоформ тропомодулина – Tmod1 и Tmod4, на изгибную жёсткость актиновой нити.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Скелетно-мышечный актин и сердечный тропонин выделены из *m. psoas* кролика и миокарда левого желудочка быка, соответственно, с помощью стандартных методов [9,10]. Tmod1, Tmod4 и сердечный альфа-Трп человека экспрессированы в *E. coli* [11]. Для визуализации во время эксперимента в оптической ловушке актиновая нить метится TRITC-фаллоидином (Sigma-Aldrich Inc.).

Измерение изгибной жёсткости актиновой и реконструированной тонкой нити с помощью метода оптической ловушки. Метод оптической ловушки позволяет провести прямое измерение изгибной жёсткости

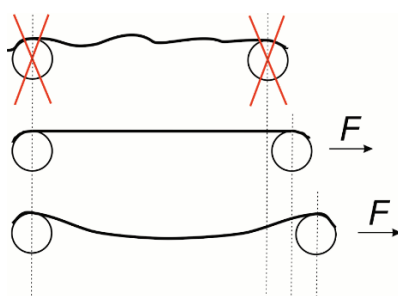


Рисунок 1. Растяжение «гантели» с помощью оптической ловушки. Процедура растяжения начинается из состояния провисшей нити. Увеличение растягивающей силы приводит к одновременному вращению полистироловых шариков в ловушках и изгибу исследуемой нити

актиновой нити, ассоциированной с актин-связывающими белками. Описание экспериментальной установки и подробная методика измерения изгибной жесткости тонких нитей с помощью метода оптической ловушки описаны в нашей предыдущей работе [12]. Экспериментальная установка двухлучевой оптической ловушки построена на базе инвертирующего флуоресцентного микроскопа (AxioObserver, Carl Zeiss, Германия). Суть метода заключается в следующем. Для вычисления изгибной жёсткости актиновой и реконструированной тонкой нити экспериментально регистрируется кривая «удлинение-сила». Для этой цели, два полистироловых шарика диаметром 0,9 мкм захватываются и удерживаются в двух независимых лучах инфракрасного лазера (Ventus, Laser Quantum, США), сфокусированных высокоапертурным объективом (AxioObserver, Carl Zeiss, Германия). К этим шарикам с помощью NEM-модифицированного миозина, который необратимо связывается с актином, приклеивается фрагмент актиновой или реконструированной тонкой нити длиной 5-7 мкм. Формируется так называемая «гантель». Смещением одного из ИК лучей вдоль оси нити с шагом 50 нм гантель растягивается из состояния провисшей нити (рис. 1). После каждого шага растяжения записывается броуновский шум колебаний шарика в неподвижном луче, который с учетом жёсткости оптической ловушки, является мерой силы, растягивающей гантель.

Изменения расстояния между шариками вычисляется по микрофотографии шариков, записанных с видекамеры высокого разрешения (CoolSnap HQ2, Photometrics, Великобритания) в режиме светлого поля, с помощью специально написанной для этих целей программы анализа изображения. Полученная экспериментальная кривая «удлинение-сила» (рис. 2) аппроксимируется численным решением механической задачи изгиба тонкого упругого стержня, из которого получаем значение изгибной жёсткости исследуемого объекта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе с помощью метода оптической ловушки измерена изгибная жёсткость актиновой нити (F-актин), а также тонкой нити, реконструированной из актина, тропонина и тропомиозина, без тропомодулина и в присутствии двух его изоформ – Tmod1 и Tmod4. Полученные значения изгибной жёсткости приведены в таблице 1 и представлены на рисунке 3. Обнаружено, что наличие регуляторных белков тропонина и тропомиозина на актиновой нити увеличивает изгибную жёсткость F-актина, что согласуется с ранее полученными данными [12]. Изоформы тропомодулина по-разному влияют на изгибную жёсткость тонкой нити. Tmod4 уменьшает изгибную жёсткость, а Tmod1 не влияет на неё. Этот результат говорит о том, что взаимодействие разных изоформ тропомодулина с тропомиозином отличается. Ранее было показано, что изоформы Tmod1 и Tmod3 с разной аффинностью связывают изоформы немыечных тропомиозинов и альфа-тропомиозин [13]. Аминокислотная последовательность N-терминальной части изоформ Tmod1 и Tmod4 имеет значительные отличия [14], что определяет особенности взаимодействия тропомодулина с тропомиозином.

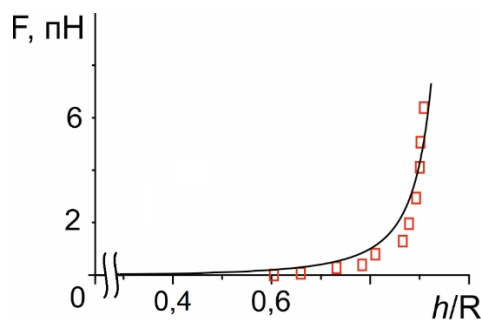


Рисунок 2. Экспериментальная зависимость «удлинение-сила» и её аппроксимация численным решением механической задачи изгиба тонкого упругого стержня. По оси абсцисс отложено безразмерное удлинение, которое определяется отношением изменения полурасстояния между центрами шариков (h) к радиусу шарика (R)

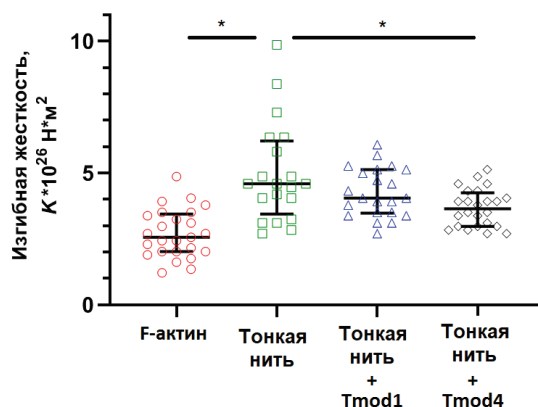


Рисунок 3. Изгибная жёсткость актиновой и тонкой нити, реконструированной из F-актина, тропомиозина, в присутствии разных изоформ тропомодулина Tmod1 и Tmod4. Значения жёсткости показаны, как медиана и межквартильный диапазон. Символом * обозначены статистически значимые отличия жёсткости. Оценка значимости отличий проведена с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Уровни значимости отличий приведены в таблице 1

Таблица 1. Изгибная жёсткость актиновой и реконструированной тонкой нити в присутствии изоформ тропомодулина

Исследуемый объект	Изгибная жёсткость, $K \times 10^{26} \text{ Н}\cdot\text{м}^2$, медиана (межквартильный диапазон) (N – число экспериментов)
F-актин	2,57 (1,42) (N = 25)
Тонкая нить	4,59 (2,77) # p <0,0001 (N = 20)
Тонкая нить + Tmod1	4,05 (1,65) (N = 22)
Тонкая нить + Tmod4	3,65 (1,28) * p <0,0001 (N = 24)

Символами # и * обозначено статистически значимое отличие жёсткости тонкой нити от жёсткости F-актина и жёсткость тонкой нити в присутствии Tmod от жёсткости тонкой нити без Tmod, соответственно. Оценка значимости отличий проведена с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Уровни значимости отличий приведены в таблице

Таким образом, изоформы тропомодулина специфически взаимодействуют с актином и тропомиозином тонкой нити, что может иметь значение для реализации сократительной функции разных типов поперечно-полосатых мышц.

Работа поддержана РФФ (грант №22-24-00729) и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

Список литературы / References:

- Weber A., Pennise C.R., Babcock G.G., Fowler V.M. Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *The Journal of cell biology*, 1994, vol. 127, pp. 1627-1635, doi: 10.1083/jcb.127.6.1627.
- Littlefield R., Almenar-Queralt A., Fowler V.M. Actin dynamics at pointed ends regulates thin filament length in striated muscle. *Nature cell biology*, 2001, vol. 3, pp. 544-551, doi: 10.1038/35078517.
- Gokhin D.S., Fowler V.M. Tropomodulin capping of actin filaments in striated muscle development and physiology. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, e103069, doi: 10.1155/2011/103069.
- Yamashiro S., Gokhin D.S., Kimura S., Nowak R.B., Fowler V.M. Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton*, 2012, vol. 69, pp. 337-370, doi: 10.1002/cm.21031.
- Tsukada T., Kotlyanskaya L., Huynh R., Desai B., Novak S.M., Kajava A.V., Gregorio C.C., Kostyukova A.S. Identification of residues within tropomodulin-1 responsible for its localization at the pointed ends of the actin filaments in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, no. 3, pp. 2194-2204, doi: 10.1074/jbc.M110.186924.
- Tolkatchev D., Smith G.E. Jr., Schultz L.E., Colpan M., Helms G.L., Cort J.R., Gregorio C.C., Kostyukova A.S. Leiomodulin creates a leaky cap at the pointed end of actin-thin filaments. *PLoS Biology*, 2020, vol. 18, no. 9, e3000848, doi: 10.1371/journal.pbio.3000848.
- Kostyukova A.S., Choy A., Rapp B.A. Tropomodulin binds two tropomyosins: a novel model for actin filament capping. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, pp. 12068-12075, doi: 10.1021/bi060899i.
- Colpan M., Moroz N.A., Kostyukova A.S. Tropomodulins and tropomyosins: working as a team. *Journal of muscle research and cell motility*, 2013, vol. 34, pp. 247-260, doi: 10.1007/s10974-013-9349-6.

9. Pardee J.D., Spudich J.A. Purification of muscle actin. *Methods Enzymology*, 1982, vol. 85, pp. 164–179, doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9.
10. Potter J.D. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzymology*, 1982, vol. 85, pp. 241-263, doi: 10.1016/0076-6879(82)85024-6.
11. Kopylova G.V., Berg V.Y., Kochurova A.M., Matyushenko A.M., Bershitsky S.Y., Shchepkin D.V. The effects of the tropomyosin cardiomyopathy mutations on the calcium regulation of actin-myosin interaction in the atrium and ventricle differ. *Biochemical and biophysical research communications*, 2022, vol. 588, pp. 29-33, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.051.
12. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Matyushenko A.M., Koubassova N.A., Levitsky D.I., Tsaturyan A.K., Bershitsky S.Y. Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament. *Biophysical Journal*, 2015, vol. 109, no. 2, pp. 373-379, doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.006.
13. Yamashiro S., Gokhin D.S., Sui Z., Bergeron S.E., Rubenstein P.A., Fowler V.M. Differential actin-regulatory activities of Tropomodulin1 and Tropomodulin3 with diverse tropomyosin and actin isoforms. *The Journal of biological chemistry*, 2014, vol. 289, pp. 11616-11629, doi: 10.1074/jbc.M114.555128.
14. Greenfield N.J., Kostyukova A.S., Hitchcock-DeGregori S.E. Structure and tropomyosin binding properties of the N-terminal capping domain of tropomodulin 1. *Biophysical Journal*, 2005, vol. 88, no. 1, pp. 372-383, doi: 10.1529/biophysj.104.051128.

STUDY OF THE EFFECT OF ACTIN-BINDING PROTEINS ON THE BENDING STIFFNESS OF ACTIN FILAMENT USING THE OPTICAL TRAP METHOD

Nabiev S.R.¹, Nikitina L.V.¹, Matyushenko A.M.², Shchepkin D.V.¹, Kopylova G.V.¹

¹ Institute of Immunology and Physiology of the UB RAS

Pervomayskaya str. 15, Yekaterinburg, 620041, Russia; e-mail: salavatik2003@gmail.com

² A.N. Bach Institute of Biochemistry of the RAS

Leninsky ave., 33, build. 2, Moscow, 119071, Russia

Received 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0475

Abstract. To ensure the contractile function of muscles, the stability of a thin filament is important, which is maintained by the actin-binding proteins tropomyosin and tropomodulin (Tmod). It is known that the presence of the regulatory protein tropomyosin on the actin filament increases its stiffness. Tropomodulin is an actin-capping protein that binds to the minus end of the actin filament, prevents its disassembly, regulates its length, and determines its stability. Two isoforms of tropomodulin, Tmod1 and Tmod4, are expressed in the contractile apparatus of striated muscles. The Tmod1 isoform is expressed in the myocardium, and both isoforms are expressed in fast skeletal muscles. Using an optical trap method, the effect of actin-binding proteins, tropomyosin and tropomodulin (Tmod1 and Tmod4 isoforms), on the bending stiffness of the actin filament was analyzed. It was found that the presence of the regulatory proteins tropomyosin and troponin on the actin filament increases its flexural rigidity. Tropomodulin isoforms affected it differently. The Tmod4 isoform reduced the bending stiffness of a thin filament reconstructed from actin, troponin, and tropomyosin, while Tmod1 did not affect it. The results obtained indicate an isoform-specific interaction of tropomodulin with actin and tropomyosin.

Key words: *actin, tropomyosin, tropomodulin, bending stiffness, optical trap.*