

ВЛИЯНИЕ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ОДИНОЧНОГО АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МИОКАРДЕ

Набиев С.Р., Копылова Г.В., Щепкин Д.В.

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

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

Поступила в редакцию 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0476

Аннотация. Сокращение миокарда является результатом взаимодействия миозина, составляющего толстую нить, с актином, образующим основу тонкой нити, и регулируется кальцием через регуляторные белки тропонин и тропомиозин. Недавно было установлено, что в регуляции актин-миозинового взаимодействия, кроме регуляторных белков, принимает участие сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С). сМуВР-С является одним из интегральных белков саркомера кардиомиоцита, который имеет сайты связывания с основными белками саркомера, миозином, актином и тропомиозином. сМуВР-С контролирует количество миозиновых головок, взаимодействующих с тонкой нитью, и участвует в её активации. В работе исследовано влияние сМуВР-С на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия, размер шага миозина и продолжительность взаимодействия, используя метод оптической ловушки. Сердечный миозин экстрагировали из миокарда левого желудочка кролика, актин выделяли из быстрых скелетных мышц кролика, а сМуВР-С получали из миокарда левого желудочка курицы. сМуВР-С добавляли к сердечному миозину в физиологическом соотношении 1:5. В *in vitro* подвижной системе обнаружено, что добавление сМуВР-С замедляет скольжение актина по миозину на 30%. С помощью оптической ловушки показано, что сМуВР-С не влияет на величину рабочего шага миозина, но увеличивает продолжительность его взаимодействия с актиновой нитью. Полученные результаты говорят о прямом влиянии сМуВР-С на одиночное актин-миозинное взаимодействие.

Ключевые слова: сердечный миозин-связывающий белок С, актин-миозинное взаимодействие, миокард, оптическая ловушка.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечный миозин-связывающий белок-С (сМуВР-С) является одним из важнейших интегральных белков мышечного саркомера который, как недавно было установлено, участвует в регуляции взаимодействия миозина, составляющего толстую нить, с актином, образующим основу тонкой нити. сМуВР-С представляет собой белок массой 140-150 кДа, ассоциированный с толстыми филаментами. Молекула сМуВР-С представляет собой полипептидную цепь длиной 40 нм и состоит из 11 доменов (8 иммуноглобулиновых I-подобных и три фибронектиновых), обозначенных от С0 до С10 от N- до С-конца. С-конец (домены С7-С10) молекулы связывает стержневую часть молекулы миозина и титин [1,2], N-конец (домены С1-С2) взаимодействует с субфрагментом 2 миозина [3,4], кроме того, Pro-Ala область сМуВР-С между доменами С0 и С1 связывает актин [5,6].

сМуВР-С принимает участие в образовании актин-миозинового комплекса, контролируя количество миозиновых головок, взаимодействующих с тонкой нитью [7,8]. N-концевые домены сМуВР-С участвуют в активации тонкой нити, сдвигая тропомиозин из «блокированного» состояния в «закрытое», открывая тем самым миозин-связывающие сайты на актине [7,8], подобно тому, как это делает Ca^{2+} -тропомиозинный комплекс.

В работе исследовано влияние сМуВР-С на характеристики одиночного актин-миозинового взаимодействия, используя метод оптической ловушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Сердечный миозин (V) экстрагирован из миокарда левого желудочка кролика. Скелетно-мышечный актин выделен из *m. psoas* кролика и окрашен TRITC-фаллоидином (Sigma-Aldrich Inc.). сМуВР-С получен из миокарда левого желудочка курицы согласно стандартной методике [3].

***In vitro* подвижная система.** С помощью *in vitro* подвижной системы оценено влияние сМуВР-С на скорость скольжения актиновых нитей по сердечному миозину в *in vitro* подвижной системе. Суть метода заключается в том, что в присутствии АТФ флуоресцентно-меченые актиновые нити двигаются по поверхности проточной ячейки, покрытой миозином. Движение нитей регистрируется с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Германия) с высокочувствительной iXon EMCCD (Andor, Ирландия) камерой и записывается на диск компьютера для измерения скорости нитей с помощью специализированной программы GMimPro [9]. Протокол эксперимента детально описан в нашей предыдущей работе [9].

Оптическая ловушка. Характеристики (размер шага миозина и продолжительность взаимодействия) одиночного взаимодействия молекул сократительных белков измеряли с помощью метода оптической ловушки.

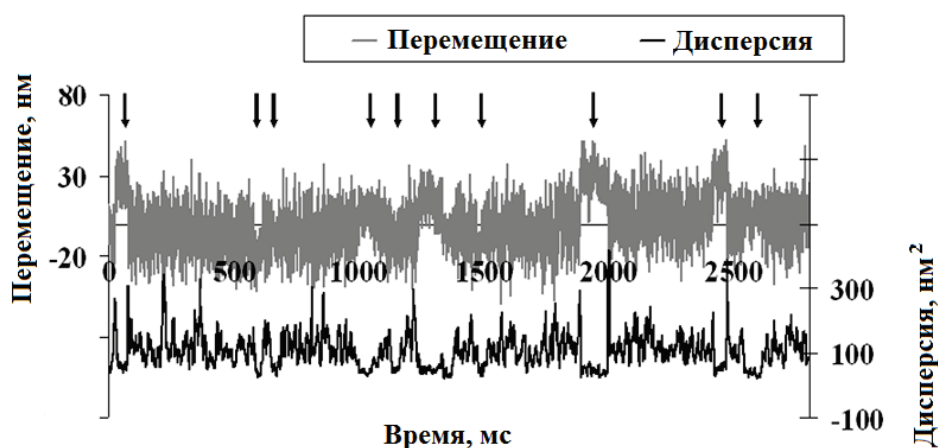


Рисунок 1. Пример экспериментальной записи измерения шага молекулы миозина при взаимодействии с актиновой нитью гантели. Серым показан сигнал смещений одного из шариков гантели, а черным – его дисперсия

Экспериментальная установка оптической ловушки и процедура проведения эксперимента подробно описаны в работе [10]. Экспериментальная установка двухлучевой оптической ловушки построена на базе инвертирующего флуоресцентного микроскопа (AxioObserver, Carl Zeiss, Германия). Коротко суть метода заключается в следующем. В проточной экспериментальной камере собирали гантелеподобный измерительный зонд [11], состоящий из двух полистироловых шариков диаметром 1,09 мкм (Sigma-Aldrich Co. LLC) и фрагментом флуоресцентно-меченой актиновой нити, приклеенной концами к этим шарикам с помощью NEM-модифицированного миозина, необратимо связывающего актин [12]. Шарики удерживаются в фокусах двух независимых лучей инфракрасного лазера (Ventus, Laser Quantum, США). В присутствии 10 мкм АТФ преднатянутая примерно на 2 пН «гантель» подводится к поверхности 2 мкм стеклянных шариков (Fluka), так называемых «пьедесталов», фиксированных на поверхности экспериментальной камеры и покрытой одиночными молекулами миозина.

Взаимодействия молекул миозина на поверхности пьедестала с актиновой нитью «гантели» наблюдали в виде одиночных событий (рис. 1). Каждое из таких событий сопровождается снижением уровня дисперсии колебаний шариков в оптических ловушках вследствие увеличения жёсткости гантели при присоединении молекулы миозина к актиновой нити. На рисунке 1 эти события показаны вертикальной стрелкой.

Размер шага миозиновой головки во время события и его продолжительность измеряли, как описано в работе [13]. Средний размер шага рассчитывался как отклонение шарика из ловушки, вызванное присоединением молекулы миозина к актиновой нити, усреднённое по всем событиям.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализировано влияние сМуВР-С на скорость скольжения актиновых нитей в *in vitro* подвижной системе. Обнаружено, что добавление сМуВР-С к сердечному миозину в физиологическом соотношении 1:5 замедляет скольжение актина по миозину примерно на 30% с $0,7 \pm 0,1$ мкм/с до $0,5 \pm 0,1$ мкм/с. Эти эффект можно объяснить тем, что сМуВР-С, связывающий субфрагмент миозина 2 с актином, облегчает взаимодействие миозина с актином [3-6], но одновременно работает как тормоз. Этот результат хорошо согласуется с ранее полученными данными [14].

Измерена средняя величина рабочего шага молекулы сердечного миозина (V) при взаимодействии с актиновой нитью и его продолжительность в присутствии и отсутствие сМуВР-С. Распределения величины рабочего шага сердечного миозина без сМуВР-С и в его присутствии показаны на рисунке 2. Соотношение концентрации сМуВР-С, загружаемого в проточную экспериментальную камеру, по отношению к концентрации миозина составляло 1:5, что соответствует физиологически нормальному соотношению этих белков в мышце. Обнаружено, что сМуВР-С не влияет на величину шага миозина (табл. 1).

Распределение продолжительности взаимодействия одиночной молекулы сердечного миозина с актиновой нитью в присутствии и отсутствие сМуВР-С показано на рисунке 3. сМуВР-С увеличивает продолжительность одиночного актин-миозинового взаимодействия (табл. 1). Увеличение продолжительности актин-миозинового взаимодействия в присутствии сМуВР-С хорошо согласуется с уменьшением скорости скольжения актиновых нитей по поверхности, покрытой миозиновыми молекулами в *in vitro* подвижной системе. Скорость скольжения нитей по поверхности миозина в *in vitro* подвижной системе прямо пропорциональна величине шага миозина и обратно пропорциональна продолжительности взаимодействия [15,16].

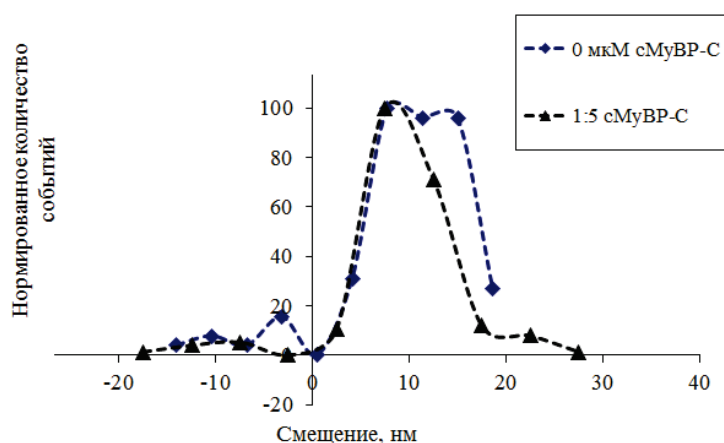


Рисунок 2. Распределение величины рабочего шага молекулы сердечного миозина (V) при взаимодействии с актином в присутствии и отсутствии сердечного миозин связывающего белка C(сМуВР-С)

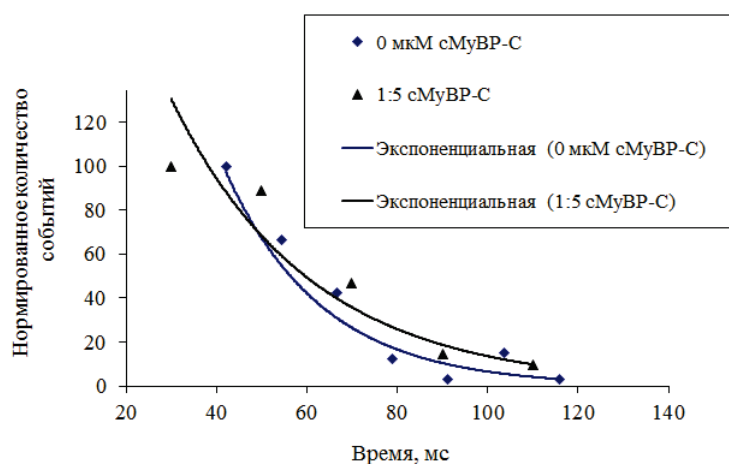


Рисунок 3. Распределение продолжительности событий взаимодействия молекулы сердечного миозина с актиновой нитью в присутствии и отсутствии сердечного миозин-связывающего белка C (сМуВР-С). Символы представляют собой экспериментальные точки, непрерывные линии – их экспоненциальные аппроксимации

Таблица 1. Характеристики одиночного взаимодействия сердечного миозина с актиновой нитью

Объект исследования	Размер шага, нм (среднее \pm стандартное отклонение) (N – число событий)	Продолжительность шага, мс (среднее \pm стандартная ошибка среднего)
V	9,5 \pm 4,0 (N = 623)	58,5 \pm 3,6
V + 1: 5 сМуВР-С	10,4 \pm 4,1 (N = 678)	68,8 \pm 4,4*

Символом * обозначена статистически значимое отличие величин, по сравнению с сердечным миозином V, оценённое с помощью критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Таким образом, сМуВР-С не влияет на величину рабочего шага миозина, но увеличивает продолжительность его взаимодействия с актиновой нитью. Полученные результаты говорят о прямом влиянии сМуВР-С на одиночное актин-миозиновое взаимодействие.

Работа поддержана РФФ (грант №22-14-00174) и выполнена на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН.

Список литературы / References:

1. Freiburg A., Gautel M. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Biochem.*, 1996, no. 235, pp. 317-323, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00317x.
2. Okagaki T., Weber F.E., Fischman D.A., Vaughan K.T., Mikawa T., Reinach. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J. Cell. Biol.*, 1993, no. 123, pp. 619-626, doi: 10.1083/jcb.123.3.619.

3. Starr R., Offer G. The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2. *Biochem. J.*, 1978, no. 171, pp. 813-816, doi: 10.1042/bj1710813.
4. Gruen M., Gautel M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C. *J. Mol. Biol.*, 1999, no. 286, pp. 933-949, doi: 10.1006/jmbi.1998.2522.
5. Squire J.M., Luther P.K., Knupp C. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J. Mol. Biol.*, 2003, no. 331, pp. 713-724, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00781-2.
6. Moos C., Mason C.M., Besterman J.M., Feng I.N., Dubin J.H. The binding of skeletal muscle C-protein to F-actin, and its relation to the interaction of actin with myosin subfragment-11. *J. Mol. Biol.*, 1978, no. 124, pp. 571-586, doi: 10.1016/0022-2836(78)90172-9.
7. Mun J.Y., Previs M.J., Yu H.Y., Gulick J., Tobacman L.S., Previs S.B., Robbins J., Warshaw D.M., Craig R. Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, no. 111, pp. 2170-2175, doi: 10.1073/pnas.1316001111.
8. Wang L., Geist J., Grogan A., Hu L.R., Kontrogianni-Konstantopoulos A. Thick filament protein network, functions, and disease association. *Compr. Physiol.*, 2018, no. 8, pp. 631-709, doi: 10.1002/cphy.c170023.
9. Matyushenko A.M., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Popruga K.E., Artemova N.V., Pivovarova A.V., Bershtitsky S.Y., Levitsky D.I. Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in the troponin T-binding region of cardiac tropomyosin. *Biochemistry*, 2017, no. 56, pp. 250-259, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00994.
10. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Tsaturyan A.K., Bershtitsky S.Y. The lifetime of the actomyosin complex in vitro under load corresponding to stretch of contractile muscle. *Eur. Biophys. J.*, 2015, no. 44, pp. 457-463, doi: 10.1007/s00249-015-1048-3.
11. Finer J.T., Simmons R.M., Spudich J.A. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps. *Nature*, 1994, no. 368, pp. 113-119, doi: 10.1038/368113a0.
12. Haerberle J.R. Calponin decreases the rate of cross-bridge cycling and increases maximum force production by smooth muscle myosin in an in vitro motility assay. *J. Biol. Chem.*, 1994, no. 269, pp. 12424-12431.
13. Knight A.E., Veigel C., Chambers C., Molloy J.E. Analysis of single-molecule mechanical recordings: application to acto-myosin interactions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2001, no. 77, pp. 45-72, doi: 10.1016/s0079-6107(01)00010-4.
14. Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Nikitina L.V., Katsnelson L.B., Bershtitsky S.Y. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an in vitro motility assay. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, no. 401, pp. 159-163, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.040.
15. Alpert N.R., Brosseau C., Federico A., Krenz M., Robbins J., Warshaw D. M. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002, no. 283, pp. 1446-1454, doi: 10.1152/ajpheart.00274.2002.
16. Palmiter K.A., Tyska M.J., Dupius D.E., Alpert N.R., Warshaw D.M. Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms. *J. Physiol.*, 1999, no. 519, pp. 669-678, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0669n.x.

EFFECTS OF CARDIAC MYOSIN-BINDING PROTEIN C ON THE CHARACTERISTICS OF A SINGLE ACTIN-MYOSIN INTERACTION IN THE MYOCARDIUM

Nabiev S.R., Kopylova G.V., Shchepkin D.V.

Institute of Immunology and Physiology of the UB RAS

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

Received 01.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0476

Abstract. Myocardial contraction is the result of the interaction of myosin, which makes up the thick filament, with actin, which forms the basis of the thin filament, and is regulated by calcium through the regulatory proteins troponin and tropomyosin. Recently, it was found that, in addition to regulatory proteins, cardiac myosin-binding protein-C (cMyBP-C) is involved in the regulation of actin-myosin interaction. cMyBP-C is one of the integral proteins of the cardiomyocyte sarcomere, which has binding sites for the main sarcomere proteins, myosin, actin, and tropomyosin. cMyBP-C controls the number of myosin heads interacting with the thin filament and participates in its activation. In this work, the influence of cMyBP-C on the characteristics of a single actin-myosin interaction, myosin step size and interaction duration, was studied using an optical trap method. Cardiac myosin was extracted from rabbit left ventricular myocardium, actin was isolated from rabbit fast skeletal muscle, and cMyBP-C was obtained from chicken ventricles. cMyBP-C was added to cardiac myosin in a physiological ratio of 1:5. In an *in vitro* motility assay, the addition of cMyBP-C was found to slow actin sliding velocity over myosin by 30%. It was found that cMyBP-C does not affect step size of myosin but increases the duration of its interaction with the actin filament. The results obtained indicate a direct effect of cMyBP-C on a single actin-myosin interaction.

Key words: cardiac myosin-binding protein C, actin-myosin interaction, myocardium, optical trap.