

УДК 577.3

К ВОПРОСУ ОБ ОСОБЕННОСТЯХ АГРЕГАЦИИ МУЛЬТИДОМЕННЫХ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

© 2019 г. Л.Г. Бобылёва*, Э.И. Якупова*, А.Д. Уланова*, С.Н. Удальцов**, С.А. Шумейко*, Н.Н. Салмов*, А.Г. Бобылёв*, И.М. Вихлянцев* ***

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

**Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 2

***Пушинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3

E-mail: liamar@rambler.ru, bobylev1982@gmail.com, ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 26.07.2019 г.

После доработки 26.07.2019 г.

Принята к публикации 02.08.2019 г.

Светлой памяти Зои Александровны Подлубной посвящается

Предположение, которое легло в основу данной работы, сделано на основании проведенных нами исследований, которые показали, что гигантские мультидоменные мышечные белки семейства титина (изоформы титина и паралоги миозинсвязывающего белка С) формируют амилоидные агрегаты *in vitro*. С помощью набора методов, в том числе рентгеновской дифракции, мы выявили ряд особенностей амилоидной агрегации вышеупомянутых белков: 1) способность агрегировать при снижении ионной силы и значении рН 7,0; 2) высокую скорость агрегации; 3) формирование агрегатов, имеющих четвертичную структуру, напоминающую кросс- β -структуру, свойственную многим амилоидам; 4) отсутствие изменений во вторичной структуре при формировании амилоидо-подобных агрегатов; 5) частичную обратимость амилоидной агрегации. В данной работе мы задаемся вопросами: «Возможна ли амилоидная агрегация этих белков *in vivo*? И если да, то в чем может заключаться функциональное значение подобной агрегации в мышечной клетке?» Мы полагаем, что в процессе мышечного сокращения в саркомере могут формироваться временно образующиеся амилоидо-подобные структуры при взаимодействии отдельных молекул мультидоменных мышечных белков. Такие изменения, несомненно, будут сопровождаться увеличением жесткости саркомеров и мышцы в целом, что может играть положительную роль в предотвращении неблагоприятных последствий для мышцы при экстремальных физических нагрузках.

Ключевые слова: мультидоменные мышечные белки, титин, миозин-связывающий белок С, амилоиды, амилоидная агрегация, функциональные амилоиды.

DOI: 10.1134/S0006302919050016

Предположение, которое легло в основу данной работы, сделано на основании проведенных нами исследований, которые показали, что гигантские мультидоменные мышечные белки семейства титина (изоформы титина и паралоги миозинсвязывающего белка С) формируют амилоидные агрегаты *in vitro*. Агрегация белков является достаточно распространенным процессом, происходящим в клетках живого организма. В свою очередь, агрегация может быть амилоидной и неамилоидной. Агрегация белков по амилоидному типу вызывает большой интерес у исследователей во всем мире, в связи с ши-

роким распространением у человека и животных амилоидозов — заболеваний, при которых в разных органах и тканях находят амилоидные отложения, в состав которых входят агрегаты неправильно свернутых белков. В настоящее время идентифицированы 36 таких белков/пептидов, в частности, А β -пептид, тяжелые цепи иммуноглобулина, β 2-микроглобулин и другие. В число заболеваний, ассоциированных с амилоидными отложениями, входят амилоидоз печени/почек/селезенки, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, диабет II типа, прионные заболевания, системные амилоидозы и другие [1–5]. Однако все больше исследователей обращают внимание на другой тип амилоидных агрегатов — функцио-

Сокращения: МуВР-С — миозинсвязывающий белок С.

нальные амилоиды, формирование которых не связано с заболеваниями, а наоборот, необходимо для выполнения определенных функций, например защитной у бактерий. К таким белкам, формирующим функциональные амилоиды, входящие в состав биопленок бактерий, относятся: курлин у *E. coli* [6], тафи у *Salmonella* spp. [7], чаплины у *Streptomyces coelicolor* [8]. К функциональным амилоидам относятся фибриллы спидроина, которые входят в состав нитей паутины [9], фибриллы Orb2 в синапсах нейронов *Drosophila* [10], а также фибриллы Pmel17 в меланосомах человека [11]. Известно, что для всех амилоидных агрегатов характерно наличие четвертичной кросс- β -структуры [12]. Однако до сих пор неясно, какие молекулярные механизмы регулируют процесс образования патологических или функциональных амилоидов.

Изучение процесса амилоидной агрегации белков *in vitro* является широко распространенным подходом. Объектом наших исследований были гигантские мультидоменные мышечные белки семейства титина.

Титин (тайтин/коннектин) был открыт в конце 70-х годов XX века [13,14]. К настоящему времени показано, что альтернативный сплайсинг гена титина (*TTN*) приводит к образованию в поперечнополосатых мышцах изоформ с молекулярной массой 700–3700 кДа [15]. В гладких мышцах позвоночных обнаружены изоформы титина с молекулярной массой 500–2000 кДа [16,17]. Все изоформы титина имеют общее строение: белок состоит из последовательности повторяющихся тандемов гомологичных фиброннектин III-подобных и иммуноглобулин-подобных доменов [18,19]. В саркомерах сердечной и скелетных мышц позвоночных титин является третьим по количеству (после актина и миозина) белком. Его молекулы длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм перекрывают половину саркомера от М-зоны до Z-диска, формируя третий тип нитей, получивших название эластичных [19]. В А-зоне саркомера титин связан с миозиновыми нитями. В I-зоне эластичная часть молекулы титина способна развивать пассивное напряжение при растяжении и возвратную силу при сокращении саркомера. Биофизические исследования показали, что эта часть молекулы титина ведет себя как «нелинейная энтропийная пружина», которая распрямляется при воздействии на нее силы от 20 до 30 пН и оказывает упругое сопротивление при сжатии с силой 2,5 пН [20]. Титин – полифункциональный белок. Обсуждается его роль в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры, в регуляции актин-миозинового взаимодействия и процессов клеточной сигнализации [21].

Миозинсвязывающий белок С (МуВР-С) относится к белкам семейства титина. Белок локализуется на поверхности миозиновых нитей в середине каждой половины А-диска в саркомерах

поперечнополосатых мышц позвоночных. В быстрых и медленных волокнах скелетных мышц, а также в сердечной мышце экспрессируются три паралога МуВР-С [22,23]. Каждый паралог кодируется отдельным геном, но все эти белки имеют сходную структурную организацию и состоят из последовательности иммуноглобулин-подобных и фиброннектин III-подобных доменов [23]. Предполагается, что этот белок может нести структурную функцию и участвовать в регуляции актин-миозинового взаимодействия.

В 2003 г. З.А. Подлубной было сделано предположение, что титин и МуВР-С могут формировать амилоидные агрегаты *in vitro*. Это предположение было высказано на основании морфологического сходства амилоидных фибрилл А β -пептида и спирально-скрученных фибрилл МуВР-С (Х-белка), обнаруженных ранее в работе [24]. Проведенные нами впоследствии эксперименты по связыванию агрегатов титина и МуВР-С поперечнополосатых мышц кролика с красителями на амилоиды Конго красным и тиофлавином Т подтвердили их амилоидную природу [25–27]. Однако, учитывая неспецифичность связывания вышеуказанных красителей, в частности Конго красного, с амилоидами [28], полученных данных было недостаточно, чтобы с уверенностью утверждать, что исследуемые нами белки формируют амилоидные агрегаты. Из литературных источников известно, что основной особенностью всех амилоидных агрегатов является наличие у них четвертичной кросс- β -структуры [29]. Поиск ответов на вопросы о том, происходит ли формирование четвертичной кросс- β -структуры при агрегации *in vitro* титина и МуВР-С и какие структурные изменения при этом происходят в молекулах этих белков, стал целью наших дальнейших исследований.

Для исследования агрегации титина и МуВР-С *in vitro* нами были применены следующие методы: атомно-силовая и электронная микроскопия, динамическое светорассеяние, рентгеновская дифракция, малоугловое рентгеновское рассеяние, круговой дихроизм, инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье. Мы показали наличие кросс- β -структуры у агрегатов титина [30,31], а также получили предварительные данные о наличии кросс- β -структуры в агрегатах МуВР-С (неопубликованные данные). Были выявлены также следующие особенности амилоидной агрегации титина и МуВР-С, которые в совокупности не были показаны ни для одного из известных амилоидных белков: 1) способность агрегировать при снижении ионной силы и значении рН 7,0; 2) высокую скорость агрегации; 3) частичную обратимость амилоидной агрегации; 4) отсутствие изменений во вторичной структуре при формировании амилоидных агрегатов с кросс- β -структурой. Обращая внимание на последнюю особенность амилоидной агрега-

ции мультидоменных мышечных белков, следует отметить, что в некотором смысле мы получили парадоксальные результаты, которые не укладываются в рамки существующей концепции амилоидогенеза. Ведь по существующим представлениям формирование кросс- β -структуры в процессе амилоидной агрегации белков происходит с увеличением процентного содержания β -складчатой структуры и уменьшением содержания α -спиральных и неупорядоченных участков [32]. Подобные изменения не наблюдались во вторичной структуре исследуемых нами белков при их амилоидной агрегации [30,31]. Кроме того, во вторичной структуре агрегированных молекул титина и МуВР-С остается большое количество неупорядоченных участков (более 30%). Можно предположить, что при формировании кросс- β -структуры в процессе амилоидной агрегации мультидоменных мышечных белков происходят незначительные внутримолекулярные перестройки, возможно, с частичным раскрытием доменов. Этим трансформациям достаточно, чтобы сформировать кросс- β -структуру при сохранении вторичной структуры белка. В пользу этого предположения можно привести следующие данные. Известны результаты *in vitro* исследований, свидетельствующие о возможности разворачивания доменов титина и МуВР-С [33–38]. В частности, показано, что для разворачивания доменов титина требуется приложить силу ~ 10 пН [37,38] и ~ 30 пН – для разворачивания доменов МуВР-С [33]. На основании измерений *in situ* растяжимости молекул титина в саркомерах изолированных миофибрилл, высказано предположение о возможности разворачивания иммуноглобулин-подобных доменов титина в I-зоне интактной мышцы [37]. По мнению этих авторов, подобные трансформации в титине могут вносить вклад в генерацию силы при развитии мышечного сокращения. Однако возможна ли при этом амилоидная агрегация этих белков и в чем может заключаться функциональное значение подобной агрегации в мышечной клетке?

Впервые предположение о возможной амилоидной агрегации мультидоменных мышечных белков *in vivo* и возможном функциональном значении подобной агрегации было сделано З.А. Подлубной в 2012 г. [39]. В частности, она сделала допущение о том, что существует вероятность перехода саркомерных белков семейства титина в некое суперструктурированное состояние (подобное амилоидной агрегации) для того, чтобы избежать повышенного протеолиза этих белков при изменении физиологических условий, например, при зимней спячке. Учитывая полученные нами новые данные и результаты исследований вышеупомянутых авторов [33–38], мы можем предполагать, что в саркомерах за счет взаимодействия β -цепей частично развернутых доменов соседних молекул титина или МуВР-С

может происходить формирование кросс- β -структуры. Это, несомненно, будет сопровождаться увеличением жесткости саркомеров и мышцы в целом, поскольку известно, что амилоидные структуры обладают высокой жесткостью [40]. Функциональное значение подобных изменений может заключаться в противодействии сверхрастяжению саркомеров и, вследствие этого, в предотвращении неблагоприятных последствий для мышцы при экстремальных физических нагрузках. Учитывая наши данные об обратимости амилоидной агрегации титина [31], можно полагать, что формирование функционально-значимых кросс- β -структур будет временное, без перехода в патологическую агрегацию, которая является необратимой.

Справедливости ради нужно отметить, что нет прямых доказательств для сделанных нами предположений и вряд ли в ближайшее время появится техническая возможность для регистрации *in vivo* амилоидной агрегации мультидоменных мышечных белков. Однако мы надеемся, что полученные нами данные вносят вклад в расширение фундаментальных представлений об особенностях белковой агрегации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центров коллективного пользования ИТЭБ РАН и ИБК РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00268).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. D. Sipe, M. D. Benson, J. N. Buxbaum, et al., *Amyloid* **23** (4), 209 (2016).
2. T. P. Knowles, M. Vendruscolo, and C. M. Dobson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15** (6), 384 (2014). DOI: 10.1038/nrm3810.
3. C. M. Dobson, *Methods* **34**, 4 (2004).
4. J. N. Buxbaum and R. P. Linke, *J. Mol. Biol.* **421**, 142 (2000).
5. C. M. Dobson, *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 3 (2004).
6. A. Olsen, A. Jonsson, and S. Normark, *Nature* **338**, 652 (1989).
7. U. Römling, Z. Bian, M. Hammar, et al., *J. Bacteriol.* **180**, 722 (1998).
8. D. Claessen, R. Rink, W. de Jong, et al., *Genes Dev.* **17**, 1714 (2003).
9. U. Slotta, S. Hess, K. Spiess, et al., *Macromol. Biosci.* **7**, 183 (2007).
10. R. Hervás, L. Li, A. Majumdar, et al., *PLoS Biol.* **14** (1), e1002361 (2016).

11. D. M. Fowler, A. V. Koulov, C. Alory-Jost., et al., *PLoS Biol.* **4** (1), e6 (2006). DOI: 10.1371/journal.pbio.0040006.
12. R. Nelson and D. Eisenberg, *Adv. Prot. Chem.* **73**, 235 (2006).
13. K. Wang, J. McClure, and A. Tu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (8), 3698 (1979).
14. K. Maruyama, S. Kimura, K. Ohashi, and Y. Kuwano, *J. Biochem.* **89**, 701 (1981).
15. W. Guo, S. J. Bharmal, K. Esbona, and M. L. Greaser, *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 753675 (2010). DOI: 10.1155/2010/753675. Epub 2010 Mar 21.
16. K. Kim and T.C. Keller, 3rd, *J. Cell Biol.* **156**, 101 (2002).
17. S. Labeit, S. Lahmers, C. Burkart, et al., *Mol. Biol.* **362**, 664 (2006).
18. S. Labeit and B. Kolmerer, *Science* **270**, 293 (1995).
19. L. Tskhovrebova and J. Trinick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 679 (2003).
20. M. S. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante, *Science* **276** (5315), 1112 (1997).
21. I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biochemistry (Moscow)* **77** (13), 1515 (2012). doi: 10.1134/S0006297912130093.
22. K. Yamamoto and C. Moos, *J. Biol. Chem.* **258**, 8395 (1983).
23. L. Carrier, G. Bonne, and K. Schwartz, *Circ. Res.* **80**, 427 (1997).
24. P. Bennett, R. Craig, R. Starr, and G. Offer, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **7** (6), 550 (1986).
25. Л. Г. Марсагишвили, М. Д. Шпагина, В. И. Емельяненко и З. А. Подлубная, *Биофизика* **50** (5), 803 (2005).
26. Л. Г. Марсагишвили, М. Д. Шпагина, Ю. В. Шаталин и др., *Биофизика* **51** (5), 799 (2006).
27. З. А. Подлубная, Л. Г. Марсагишвили и Л. М. Чайлахян, *Докл. РАН* **418** (4), 553 (2008).
28. E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, I. M. Vikhlyantsev, and A. G. Bobylev, *Biosci. Rep.* **39** (1), pii: BSR20181415 (2019). DOI: 10.1042/BSR20181415.
29. A. E. Langkilde and B. Vestergaard, *FEBS Lett.* **583** (16), 2600 (2009).
30. A. G. Bobylev, O. V. Galzitskaya, R. S. Fadeev, et al., *Biosci. Rep.* **36** (3), pii: e00334 (2016). DOI: 10.1042/BSR20160066.
31. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., *J. Biomol. Structure & Dynamics* **36** (9), 2237 (2018). DOI: 10.1080/07391102.2017.1348988.
32. R. Nelson and D. Eisenberg, *Adv. Prot. Chem.* **73**, 235 (2006).
33. Á. Karsai, M. S. Z. Kellermayer, and S. P. Harris, *Biophys. J.* **101** (8): 1968 (2011). DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.030.
34. P. Bianco, Z. Mártonfalvi, K. Naftz, et al., *Biophys. J.* **109** (2), 340 (2015).
35. Z. Mártonfalvi, P. Bianco, K. Naftz, et al., *Prot. Sci.* **26**, 1380 (2017). DOI: 10.1002/pro.3117.
36. D. Giganti, K. Yan, C. L. Badilla, et al., *Nature Communications* **9**, 185 (2018). DOI: 10.1038/s41467-017-02528-7.
37. J. A. Rivas-Pardo, E. C. Eckels, I. Popa, et al., *Cell Reports* **14**, 1339 (2016).
38. E. C. Eckels, Sh. Haldar, R. Tapia-Rojo, et al., *Cell Reports* **27**, 1836 (2019).
39. З. А. Подлубная и А. Г. Бобылёв, *Биофизика* **57** (5), 751 (2012).
40. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, M. Y. Lobanov, et al., *Biochemistry (Moscow)* **82** (13), 1675 (2017).

On Peculiarities of the Aggregation of Multidomain Muscle Proteins

L.G. Bobyleva*, E.I. Yakupova*, A.D. Ulanova*, S.N. Udaltsov**, S.A. Shumejko*, N.N. Salmov*, A.G. Bobylev*, and I.M. Vikhlyantsev* ***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Pushchino State Institute of Natural Sciences, Prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

This article is based on our previous studies which have shown that giant multidomain muscle proteins from the titin family (isoforms of titin and myosin-binding protein C) form amyloid aggregates in vitro. Using different methods, including X-ray diffraction, we identified a number of features of amyloid aggregation of the above-mentioned proteins: (1) the ability to aggregate with a decrease in ionic strength of a solution and at a pH value of 7.0; (2) a high protein aggregation rate; (3) formation of aggregates with a quaternary structure like cross- β , which is considered to be a common property of many amyloids; (4) no changes in the secondary structure during the formation of amyloid-like aggregates; (5) partial disaggregation of amyloid aggregates. In this article we ask questions “Is amyloid aggregation of these proteins possible in vivo? If so, what could be the functional significance of such aggregation in the muscle cells? We suppose that individual molecules of multidomain muscle proteins may interact together and form temporarily amyloid-like structures during muscle contraction. In this case, an increase in stiffness of the sarcomeres and the muscle as a whole would be observed, which can play a positive role in preventing adverse effects on the muscle during intense physical exercise.

Keywords: multidomain muscle proteins, titin, myosin-binding protein C, amyloids, amyloid aggregation, functional amyloid