

## ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ МУТАЦИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЧАСТИ $\alpha$ -ЦЕПИ ТРОПОМИОЗИНА НА СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЕГО $\alpha\beta$ -ГЕТЕРОДИМЕРОВ

© 2016 г. А.М. Матюшенко\* \*\*, Н.В. Артемова\*, Д.В. Щепкин\*\*\*, Г.В. Копылова\*\*\*, Д.И. Левицкий\* \*\*\*\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33;

\*\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12;

\*\*\*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106;

\*\*\*\*НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1/40

E-mail: Levitsky@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 06.06.16 г.

Исследовано влияние на свойства  $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина двойной мутации D137L/G126R в центральной части его  $\alpha$ -цепи, т.е. одновременной замены двух высококонсервативных неканонических остатков – Asp137 и Gly126 – на канонические остатки Leu и Arg. Методом спектроскопии кругового дихроизма показано, что эта мутация заметно повышает термостабильность  $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина, которая, тем не менее, остается более низкой, чем у  $\alpha\alpha$ -гомомеров, несущих такие мутации в обеих  $\alpha$ -цепях. Также исследована стабильность комплексов тропомиозина с F-актином с помощью измерения температурной зависимости диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению светорассеяния. Показано, что  $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина с заменами D137L/G126R в  $\alpha$ -цепи диссоциируют с поверхности актиновых филаментов при значительно более высокой температуре, чем  $\beta\beta$ -гомомеры, но все-таки при более низкой температуре, чем  $\alpha\alpha$ -гомомеры тропомиозина с такими заменами в обеих  $\alpha$ -цепях. В экспериментах, проведенных в искусственной системе подвижности (*in vitro* motility assay), показано, что замена D137L/G126R в  $\alpha$ -цепи, повышающая скорость скольжения регулируемых актиновых филаментов в случае  $\alpha\alpha$ -гомомеров, заметно снижает ее в случае  $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина. Сделан вывод, что мутации в одной из цепей димерной молекулы тропомиозина могут по-разному влиять на свойства его гомодимеров и гетеродимеров.

**Ключевые слова:** тропомиозин,  $\alpha\beta$ -гетеродимеры, круговой дихроизм, искусственная подвижная система.

Тропомиозин (ТМ) – это актинсвязывающий белок, играющий ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Молекула ТМ представляет собой димер, состоящий из двух цепей, образующих двойную левозакрученную суперспираль (coiled coil), способную взаимодействовать с актиновым филаментом. В быстрых скелетных мышцах экспрессируются две изоформы ТМ –  $\alpha$  и  $\beta$  (по новой номенклатуре – Trpm1.1 и Trpm2.2 [1]), являющиеся продуктами разных генов

(TRPM1 и TRPM2 соответственно). Вследствие этого димерные молекулы ТМ обычно представлены  $\alpha\alpha$ -гомомерами и  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ( $\beta\beta$ -гомомеры нестабильны и потому встречаются очень редко) [2,3]. Актуальность исследования  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ в немалой степени обусловлена тем, что при различных патологиях скелетных и сердечных мышц в них часто наблюдается повышение экспрессии  $\beta$ -цепей ТМ, приводящее к повышению содержания  $\alpha\beta$ -гетеродимеров. Неоднократно высказывались предположения, что  $\alpha\alpha$ -гомомеры и  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ могут существенно различаться

Сокращения: ТМ – тропомиозин, ИПС – искусственная подвижная система.

чаться по структуре, свойствам и выполняемым функциям. Однако до недавнего времени практически все работы с использованием рекомбинантных препаратов ТМ (в частности, все исследования эффектов мутаций в молекуле ТМ на его структуру и свойства) проводились исключительно на препаратах гомодимеров ТМ. Это связано с тем, что получение изолированных  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ представляет собой чрезвычайно сложную и трудоемкую задачу. Лишь относительно недавно, в 2012 г., в лаборатории М. Дживса был разработан новый эффективный метод, основанный на введении N-концевого His-*taq* в одну из двух цепей ТМ, экспрессируемых в *E. coli* (в  $\beta$ -цепь), и позволяющий отделять методом аффинной хроматографии  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ от  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -гомо-димеров, получая таким образом чистые препараты  $\alpha\beta$ -гетеродимеров [4]. Используя этот подход, авторы показали, что  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ отличаются по термостабильности как от  $\alpha\alpha$ -, так и от  $\beta\beta$ -гомо-димеров. Именно этот новый метод мы и применили в наших исследованиях, главная задача которых состояла в том, чтобы выяснить, как влияют различные мутации лишь в одной из двух цепей ТМ ( $\alpha$ - или  $\beta$ -цепи) на свойства  $\alpha\beta$ -гетеродимеров. В частности, в настоящей работе мы исследовали влияние стабилизирующих замен D137L и G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи на структуру и свойства  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ. (Исследования  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ с такими мутациями в обеих  $\alpha$ -цепях уже проводились ранее [5–8,12].)

Ранее в центральной части молекулы ТМ были обнаружены два высококонсервативных неканонических остатка – Asp137 [5] и Gly126 [6], дестабилизирующих эту область молекулы, и было показано, что замена этих неканонических остатков в обеих цепях  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ на канонические остатки лейцина (мутация D137L) или аргинина (мутация G126R) стабилизирует центральную часть ТМ [5,6]. Недавно мы впервые одновременно заменили оба эти остатка в центральной части обеих  $\alpha$ -цепей  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ на канонические остатки Leu или Arg (мутация D137L/G126R) и показали, что такая замена значительно стабилизирует не только эту часть ТМ, но и всю его молекулу, включая N-концевой и C-концевой домены [7]. Помимо этого, было показано, что такая двойная замена оказывает сильное влияние на функциональные свойства  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ. Так, например, она повышала ста-

бильность комплексов ТМ с F-актином, увеличивала максимальную скорость скольжения регулируемых актиновых филаментов, содержащих ТМ и тропонин, в искусственной подвижной системе (*in vitro* motility assay) при высоких концентрациях  $Ca^{2+}$  [8] и заметно повышала жесткость актиновых филаментов, содержащих ТМ [9]. В настоящей работе мы исследовали влияние такой двойной замены D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи ТМ на структуру и свойства  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение белков.** Рекомбинантный скелетно-мышечный  $\alpha$ -ТМ (Tpm1.1) с мутацией D137L/G126R получали, как описано ранее [7,8], используя в качестве белка дикого типа ТМ с мутацией C190A, в котором единственный остаток Cys190 был заменен на Ala. Это было сделано для того, чтобы в дальнейшем избежать образования дисульфидной шивки между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями в  $\alpha\beta$ -гетеродимерах ТМ, которая может сильно исказить получаемые результаты. Ранее было показано, что такой  $\alpha$ -ТМ C190A практически не отличается по характеру тепловой денатурации от  $\alpha$ -ТМ с SH-группами остатков Cys190 в восстановленном состоянии [7].

Молекулярно-генетическая конструкция His- $\beta$ -цепи ТМ (т.е.  $\beta$ -цепи ТМ, содержащей N-концевой His-*taq*) была любезно предоставлена нам проф. М. Дживсом (Prof. M.A. Geeves, Department of Biosciences, University of Kent at Canterbury, Canterbury, Kent, UK). Рекомбинантные  $\beta\beta$ -гомо-димеры ТМ экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3)pLysS, после чего клетки обрабатывали ультразвуком, центрифугировали 20 мин при 15000 g и супернатант, содержащий His- $\beta$ -ТМ, очищали методом металло-аффинной хроматографии на колонке His-Trap HP.

$\alpha\beta$ -Гетеродимеры ТМ получали согласно описанной ранее методике [4] с некоторыми введенными нами модификациями. Суть модифицированной методики вкратце сводится к следующему.  $\alpha\alpha$ -Гомодимеры ТМ C190A (с мутациями D137L/G126R в центральной части ТМ или без них) смешивали с  $\beta\beta$ -гомо-димерами, содержащими N-концевой His-*taq*, в молярном отношении, равном 3:1. Смесь прогревали до определенной температуры (до 58°C в случае  $\alpha\alpha$ -ТМ C190A или до 65°C в случае препаратов  $\alpha\alpha$ -ТМ с мутациями D137L/G126R в централь-

ной части, термостабильность которых была значительно выше) для разделения димеров на отдельные мономеры, после чего охлаждали до 25°C и инкубировали при этой температуре для реассоциации цепей ТМ с образованием димеров. При этом образуется смесь  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -гомомеров и  $\alpha\beta$ -гетеродимеров. Затем полученную смесь гомодимеров и гетеродимеров ТМ подвергали металло-аффинной хроматографии на колонке His-Trap HP, на которой удерживаются лишь  $\alpha\beta$ -гетеродимеры и  $\beta\beta$ -гомомеры, содержащие His-tag в  $\beta$ -цепи, которые впоследствии разделяли градиентом имидазола. На последней стадии His-tag отщепляли от  $\beta$ -цепи  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, обрабатывая их протеазой FХa (инкубацию с протеазой проводили не при комнатной температуре, как в исходно описанной методике, а при 4°C). Применение этой методики позволило получить чистые препараты  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ.

Актин получали из скелетных мышц кролика по стандартной методике [10]. Мономерный G-актин полимеризовали в филаменты F-актина, добавляя к нему KCl и MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 100 мМ и 2 мМ соответственно.

**Круговой дихроизм.** Температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм ( $\theta_{222}$ ) регистрировали на дихрографе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics, Великобритания) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0,2 мм в интервале от 5 до 70°C при скорости нагрева 1°C/мин. Эксперименты проводили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,3), содержащем 100 мМ NaCl; концентрация белка составляла 1 мг/мл.

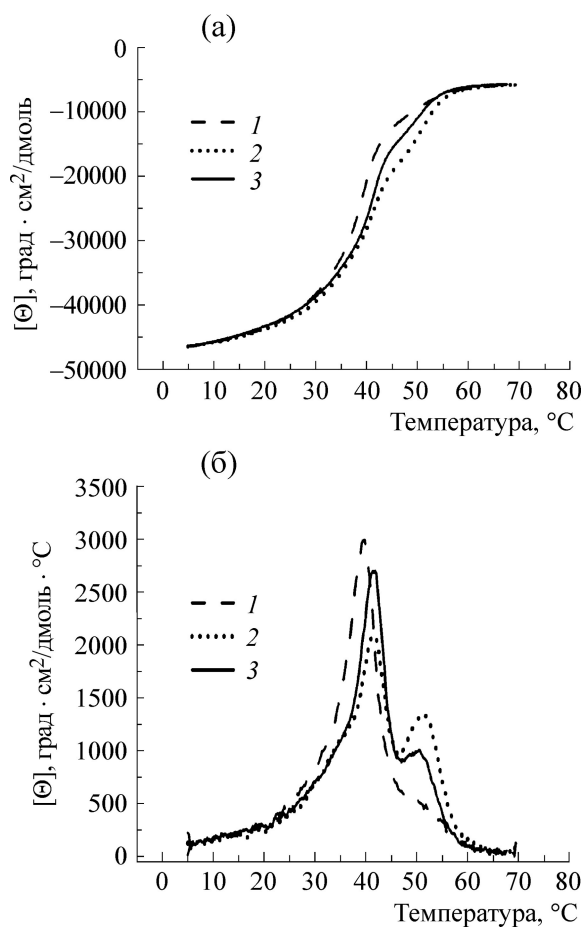
**Определение температурных зависимостей диссоциации комплексов ТМ с F-актином методом светорассеяния.** Исследования стабильности комплексов, образуемых  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ТМ с F-актином, проводили путем измерения температурных зависимостей диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению светорассеяния при 350 нм под углом в 90° [8,11] на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия), оборудованном специальным термоблоком, позволяющим поддерживать постоянную скорость нагрева при постоянной регистрации температуры. Метод основан на том, что комплекс ТМ с F-актином имеет большее светорассеяние, чем свободный F-актин, в то время как свободный ТМ вообще не рассеивает свет в выбранных условиях. Таким образом, по уменьшению светорассеяния можно судить

о диссоциации ТМ с поверхности актина, а температура, при которой происходит этот процесс, может в свою очередь служить относительной мерой стабильности комплексов ТМ с F-актином. Нагрев проводили с постоянной скоростью 1°C/мин в температурном диапазоне 20–70°C. Концентрация F-актина составляла 20 мкМ, ТМ – 5 мкМ. В качестве основного параметра, выявляемого при таких измерениях, использовали так называемую «температуру диссоциации» ( $T_{diss}$ ), т.е. ту температуру, при которой интенсивность светорассеяния снижалась на 50%.

**Эксперименты в искусственной подвижной системе (ИПС).** В основе метода ИПС (*in vitro motility assay*) лежит измерение скорости перемещения (скольжения) актиновых филаментов по поверхности с иммобилизованным миозином. Эксперименты проводили, как описано ранее [8], регистрируя скорость перемещения реконструированных тонких филаментов (т.е. актиновых филаментов, содержащих ТМ и тропонин) при высоких концентрациях кальция (рCa 4) с помощью инверсионного флуоресцентного микроскопа (Axiovert 200 M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

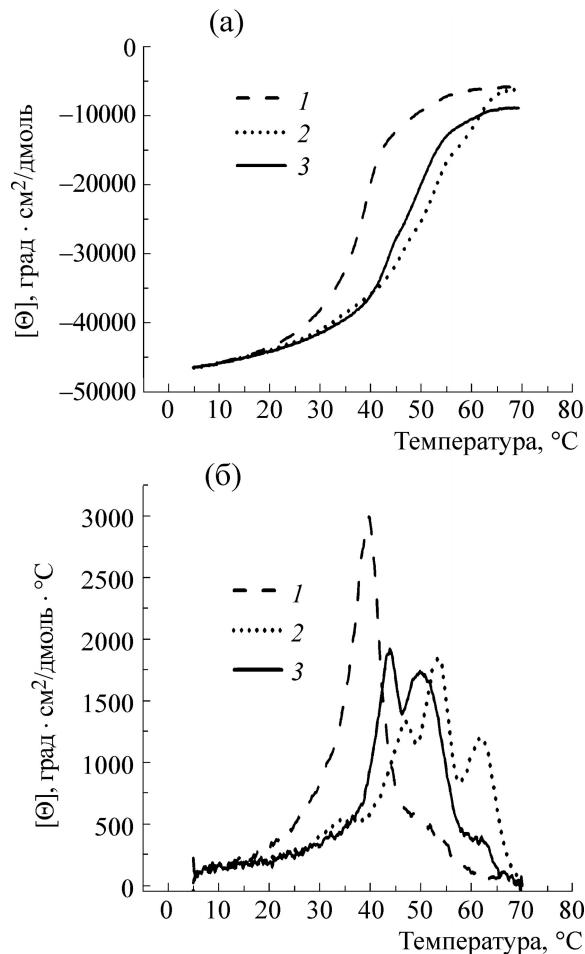
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего мы исследовали тепловую денатурацию  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, регистрируя методом кругового дихроизма температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм для  $\alpha\beta$ -гетеродимеров и сравнивая их с зависимостями, полученными для  $\alpha\alpha$ -гомомеров и  $\beta\beta$ -гомомеров ТМ. (Напомним, что в качестве  $\alpha\alpha$ -ТМ «дикого типа» использовали ТМ С190А, т.е. ТМ, в котором остаток Cys190 в обеих  $\alpha$ -цепях был заменен на остаток аланина мутацией С190А.) Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что термостабильность  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ выше, чем у  $\beta\beta$ -гомомеров, но при этом все-таки несколько ниже (хотя и ненамного), чем у  $\alpha\alpha$ -гомомеров (рис. 1а). Наиболее отчетливо это видно при переводе интегральных кривых, приведенных на рис. 1а, в дифференциальную форму (рис. 1б). В этом случае отчетливо видна разница между  $\alpha\beta$ -гетеродимерами и  $\beta\beta$ -гомомерами ТМ. С другой стороны, следует отметить, что  $\alpha\beta$ -гетеродимеры, полученные из  $\alpha$ -ТМ «псевдодикого типа» (т.е. из ТМ С190А), не слишком сильно отличаются по термостабильности от  $\alpha\alpha$ -гомомеров.



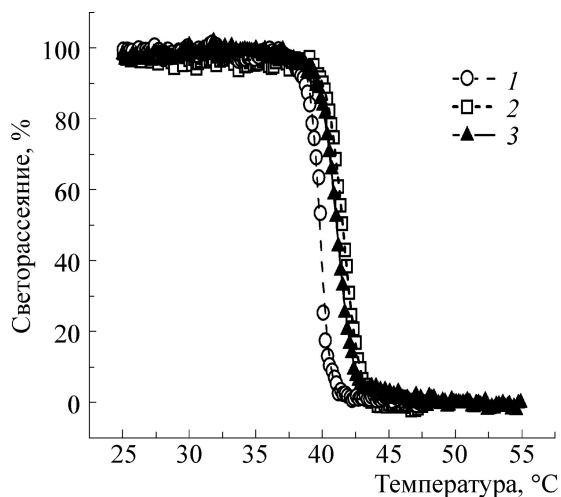
**Рис. 1.** Температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм, полученные методом кругового дихроизма для  $\beta\beta$ -гомо-димеров ТМ (1),  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ С190А (2) и  $\alpha\beta$ -гетеро-димеров ТМ (3). Данные представлены как в интегральном виде (а), так и в дифференциальном виде (б), т.е. в виде первых производных от зависимостей, представленных на (а).

Гораздо ярче отличия  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ как от  $\beta\beta$ -гомо-димеров, так и от  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров проявлялись в случае  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, несущих стабилизирующие замены D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи (рис. 2). В этом случае термостабильность  $\alpha\beta$ -гетеродимеров была намного выше, чем у  $\beta\beta$ -гомо-димеров, но при этом заметно ниже, чем у  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров. Это особенно хорошо видно на рис. 2б, где кривые представлены в дифференциальном виде. В этом случае хорошо видно, что главные пики, наблюдаемые для  $\alpha\beta$ -гетеродимеров, сильно (на 3–4°C) смещены в сторону более низких значений температуры относительно пиков  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ с мутациями D137L/G126R, а самый высокотемпе-



**Рис. 2.** Влияние мутации D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи на термостабильность  $\alpha\beta$ -гетеро-димеров ТМ. Представлены температурные зависимости как в интегральном (а), так и в дифференциальном виде (б), полученные методом кругового дихроизма для  $\beta\beta$ -гомо-димеров ТМ (1),  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ с мутациями С190А/D137L/G126R в обеих  $\alpha$ -цепях (2) и  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ с этими мутациями в  $\alpha$ -цепи (3). Все прочие условия, как на рис. 1.

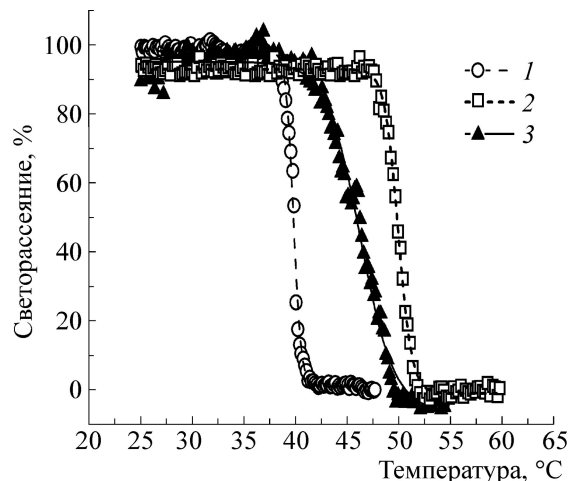
ратурный пик при 64°C, наблюдающийся у  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ с такими мутациями, вообще почти полностью исчезает у  $\alpha\beta$ -гетеродимеров (рис. 2б). При этом важно отметить, что эти пики, наблюдаемые методом кругового дихроизма для  $\alpha\alpha$ -гомо-димеров ТМ с мутациями D137L/G126R, хорошо соответствуют тепловым переходам, которые наблюдались для этого препарата ТМ методом дифференциальной сканирующей калориметрии, причем самый высокотемпературный тепловой переход при 64°C на термограмме соответствовал, как было установлено, плавлению N-концевой части молекулы ТМ [7].



**Рис. 3.** Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов ТМ с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Приведены данные для  $\beta\beta$ -гомомеров ТМ (1),  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ С190А (2) и  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ (3). Концентрация F-актина составляла 20 мкМ, ТМ – 5 мкМ. Скорость прогрева – 1°C/мин.

Сравнивая данные, представленные на рис. 1 и 2, можно заключить, что двойная замена D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи ТМ стабилизирует не только  $\alpha\alpha$ -гомомеры ТМ, но и  $\alpha\beta$ -гетеродимеры (хотя и в несколько меньшей степени, чем  $\alpha\alpha$ -гомомеры, несущие эти мутации в обеих цепях молекулы ТМ).

Ранее нами было показано, что двойная замена D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи ТМ не оказывает особого влияния на сродство ТМ к F-актину, измеряемое методом соосаждения, но резко повышает стабильность комплексов, образуемых  $\alpha\alpha$ -гомомерами ТМ С190А с F-актином, увеличивая температуру их диссоциации ( $T_{\text{diss}}$ ) более чем на 8°C [8]. В настоящей работе мы провели подобные эксперименты с  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ТМ, исследуя стабильность их комплексов с F-актином путем измерения температурных зависимостей диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению светорассеяния. На рис. 3 представлены такие зависимости для  $\alpha\beta$ -гетеродимеров, полученных из  $\alpha$ -ТМ С190А и  $\beta$ -ТМ, в сравнении с аналогичными зависимостями для  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ С190А и  $\beta\beta$ -гомомеров ТМ. Как видно,  $\beta\beta$ -гомомеры ТМ диссоциируют с поверхности актиновых филаментов при более низкой температуре ( $T_{\text{diss}} = 40^\circ\text{C}$ ), чем  $\alpha\alpha$ -гомомеры ( $T_{\text{diss}} = 41,5^\circ\text{C}$ ) и  $\alpha\beta$ -гетеродимеры



**Рис. 4.** Влияние мутации D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи на стабильность комплексов, образуемых  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ТМ с F-актином. Представлены нормализованные температурные зависимости диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния, для  $\beta\beta$ -гомомеров ТМ (1),  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ с мутациями С190А/D137L/G126R в обеих  $\alpha$ -цепях (2) и  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ с этими мутациями в  $\alpha$ -цепи (3). Все прочие условия, как на рис. 3.

( $T_{\text{diss}} = 41,0^\circ\text{C}$ ), которые почти не различаются между собой по температуре диссоциации. Таким образом,  $\alpha\beta$ -гетеродимеры, полученные из  $\alpha$ -ТМ «псевдодикого типа» (т.е. из ТМ с мутацией С190А), мало отличаются от  $\alpha\alpha$ -гомомеров ТМ С190А по характеру их температурной диссоциации с поверхности актиновых филаментов.

Совершенно иная картина наблюдалась для  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, несущих стабилизирующие замены D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи. В этом случае, как и в случае экспериментов, проведенных методом кругового дихроизма (рис. 2), гораздо ярче проявлялись отличия  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ как от  $\beta\beta$ -гомомеров, так и от  $\alpha\alpha$ -гомомеров, несущих стабилизирующие замены D137L/G126R в обеих  $\alpha$ -цепях (рис. 4).  $\alpha\beta$ -Гетеродимеры ТМ с заменами D137L/G126R в  $\alpha$ -цепи диссоциировали с поверхности актиновых филаментов при значительно более высокой температуре ( $T_{\text{diss}} = 46^\circ\text{C}$ ), чем  $\beta\beta$ -гомомеры ( $T_{\text{diss}} = 40^\circ\text{C}$ ), но все-таки при более низкой температуре, чем  $\alpha\alpha$ -гомомеры ТМ, несущие такие замены в обеих  $\alpha$ -цепях ( $T_{\text{diss}} = 50^\circ\text{C}$ ).

Сопоставляя между собой данные, представленные на рис. 3 и 4, легко заметить, что

Значения максимальной скорости скольжения в ИПС при высоких концентрациях кальция ( $pCa$  4), полученные для реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и различные препараты ТМ ( $\beta\beta$ -гомодинмеры,  $\alpha\alpha$ -гомодинмеры и  $\alpha\beta$ -гетеродинмеры с мутациями С190А, G126R, D137L и D137L/G126R в  $\alpha$ -цепи). Для каждого из исследуемых препаратов ТМ представлены средние значения максимальной скорости скольжения ( $V_{max}$ ), полученные из двух-трех экспериментов, и стандартные отклонения от этих значений

Препараты ТМ	$V_{max}$ , мкм/с
$\beta\beta$ -ТМ	$3,8 \pm 0,13$
$\alpha\alpha$ -ТМ ( $\alpha$ -ТМ С190А – $\alpha$ -ТМ С190А)	$4,5 \pm 0,18$
$\alpha\beta$ -ТМ ( $\beta$ -ТМ – $\alpha$ -ТМ С190А)	$4,4 \pm 0,3$
$\alpha\beta$ -ТМ ( $\beta$ -ТМ – $\alpha$ -ТМ С190А/G126R)	$3,8 \pm 0,1$
$\alpha\beta$ -ТМ ( $\beta$ -ТМ – $\alpha$ -ТМ С190А/D137L)	$3,0 \pm 0,36$
$\alpha\beta$ -ТМ ( $\beta$ -ТМ – $\alpha$ -ТМ С190А/G126R/D137L)	$3,3 \pm 0,5$

введение замены D137L/G126R в центральную часть  $\alpha$ -цепи значительно повышает стабильность комплексов, образуемых  $\alpha\beta$ -гетеродимерами с F-актином, увеличивая температуру их диссоциации ( $T_{diss}$ ) на  $5^\circ C$ , с  $41$  до  $46^\circ C$ . Следует отметить, однако, что стабилизирующий эффект замены D137L/G126R был в случае  $\alpha\beta$ -гетеродимеров все-таки несколько ниже, чем в случае  $\alpha\alpha$ -гомодинмеров ТМ с такими заменами в обеих цепях, для которых температура диссоциации их комплексов с F-актином увеличивалась более чем на  $8^\circ C$ , с  $41,5$  до  $50^\circ C$  (рис. 3 и 4).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нам удалось показать, что мутации D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи ТМ повышают термостабильность ТМ и стабилизируют его комплексы с F-актином не только в случае  $\alpha\alpha$ -гомодинмеров ТМ (что было показано ранее), но и в случае  $\alpha\beta$ -гетеродимеров (хотя и в несколько меньшей степени, чем для  $\alpha\alpha$ -гомодинмеров, несущих эти мутации в обеих цепях молекулы ТМ).

Интересные и весьма неожиданные результаты были получены в экспериментах, проведенных в искусственной подвижной системе. Ранее в подобных экспериментах было показано, что мутации G126R, D137L и D137L/G126R в центральной части обеих  $\alpha$ -цепей  $\alpha\alpha$ -гомодинмеров ТМ значительно увеличивают максимальную скорость скольжения регулируемых актиновых филаментов, содержащих ТМ и тропонин, при высоких концентрациях  $Ca^{2+}$  [8,12]. В настоящей работе мы провели такие эксперименты с  $\alpha\beta$ -гетеродимерами ТМ, при этом

исследовали не только эффекты двойной мутации D137L/G126R, но и эффекты одиночных мутаций G126R и D137L, а также впервые исследовали в этой системе  $\beta\beta$ -гомодинмеры ТМ. Полученные данные представлены в таблице.

Оказалось, что тонкие филаменты, содержащие  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ, полученные из контрольного  $\alpha$ -ТМ С190А, почти не отличались по скорости скольжения в ИПС от филаментов с  $\alpha\alpha$ -гомодинмерами ТМ С190А – в обоих случаях максимальная скорость скольжения, измеренная при высокой концентрации кальция ( $pCa$  4), составляла  $4,4$ – $4,5$  мкм/с, заметно превышая скорость скольжения филаментов, содержащих  $\beta\beta$ -гомодинмеры ТМ ( $3,8$  мкм/с). Это можно объяснить, хотя бы отчасти, различиями этих препаратов ТМ по стабильности (как по термостабильности, так и по стабильности их комплексов с актином): во всех случаях стабильность  $\alpha\beta$ -гетеродимеров или их комплексов заметно превышала стабильность  $\beta\beta$ -гомодинмеров, но мало отличалась по этим параметрам от  $\alpha\alpha$ -гомодинмеров ТМ С190А (рис. 1 и 3). По-видимому, в отсутствие мутаций в центральной части  $\alpha$ -цепи ТМ функциональные свойства его  $\alpha\beta$ -гетеродимеров в значительной степени определяются именно этой цепью, а не менее стабильной  $\beta$ -цепью.

Удивительные результаты были получены при исследованиях в ИПС  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, несущих стабилизирующие мутации в центральной части  $\alpha$ -цепи. В этих экспериментах было показано, что мутации D137L и D137L/G126R в  $\alpha$ -цепи  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ

не повышают, а, напротив, сильно снижают скорость скольжения реконструированных тонких филаментов, которая составляла в этом случае 3,0–3,3 мкм/с, т.е. была на 25–30% ниже, чем у  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ, полученных из контрольного  $\alpha$ -ТМ С190А. Более того, скорость скольжения филаментов, содержащих  $\alpha\beta$ -гетеродимеры ТМ с этими мутациями, была даже ниже (на 13–20%), чем у филаментов, содержащих  $\beta\beta$ -гомодимеры ТМ (см. таблицу). Этот эффект был выражен в несколько меньшей степени в случае одиночной замены G126R: скорость скольжения составляла в этом случае 3,8 мкм/с, т.е. не отличалась от скорости скольжения филаментов, содержащих  $\beta\beta$ -гомодимеры ТМ. В целом эти полученные на  $\alpha\beta$ -гетеродимерах ТМ функциональные эффекты стабилизирующих мутаций D137L и D137L/G126R в центральной части  $\alpha$ -цепи ТМ резко отличались от эффектов данных мутаций, наблюдавшихся ранее на  $\alpha\alpha$ -гомодимерах ТМ, несущих эти мутации в обеих цепях молекулы, когда они не снижали, а, напротив, заметно повышали скорость скольжения тонких филаментов в ИПС [8,12].

Мы пока затрудняемся объяснить необычные функциональные эффекты этих мутаций, обнаруженные при исследованиях  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ. Не исключено, например, что они обусловлены сочетанием в димерной молекуле ТМ двух цепей с совершенно разной стабильностью –  $\alpha$ -цепи, стабилизированной мутациями в ее центральной части, и значительно менее стабильной  $\beta$ -цепи. Выяснение природы этого феномена требует дополнительных экспериментов, которые и ведутся в настоящее время в нашей лаборатории.

В заключение следует отметить, что полученные нами данные впервые наводят на мысль о том, что функциональные свойства  $\alpha\beta$ -гетеродимеров ТМ с заменами остатков в  $\alpha$ -цепи

могут очень сильно отличаться от свойств  $\alpha\alpha$ -гомодимеров ТМ с такими заменами – вплоть до того, что функциональные эффекты подобных замен даже могут быть прямо противоположными. Это в дальнейшем необходимо учитывать при исследованиях влияния различных мутаций в ТМ на его свойства, которые до настоящего времени проводились почти исключительно с использованием  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -гетеродимеров ТМ с мутациями в обеих цепях молекулы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10199). Эксперименты в искусственной подвижной системе, проведенные Д.В. Щепкиным и Г.В. Копыловой, выполнялись при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00688).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. A. Geeves, S. E. Hitchcock-DeGregori, and P. W. Gunning, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **36**, 147 (2015).
2. S. V. Perry, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**, 5 (2001).
3. И. А. Невзоров и Д.И. Левицкий, *Успехи биол. химии* **51**, 283 (2011).
4. A. Kalyva, A. Schmidtman, and M. A. Geeves, *Biochemistry* **51**, 6388 (2012).
5. J. P. Sumida, E. Wu, and S. S. Lehrer, *J. Biol. Chem.* **283**, 6728 (2008).
6. I. A. Nevzorov, O. P. Nikolaeva, Y. A. Kainov, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 15766 (2011).
7. A. M. Matyushenko, N. V. Artemova, N. N. Sluchanko, and D. I. Levitsky, *Biophys. Chem.* **196**, 77 (2015).
8. A. M. Matyushenko, N. V. Artemova, D. V. Shchepkin, et al., *FEBS J.* **281**, 2004 (2014).
9. S. R. Nabiev, D. A. Ovsyannikov, G. V. Kopylova, et al., *Biophys. J.* **109**, 373 (2015).
10. J. A. Spudich and S. Watt, *J. Biol. Chem.* **246**, 4866 (1971).
11. E. Kremneva, S. Boussouf, O. Nikolaeva, et al., *Biophys. J.* **87**, 3922 (2004).
12. Д. В. Щепкин, А. М. Матюшенко, Г. В. Копылова и др., *Acta Naturae* **5**, 130 (2013).

## Effects of Stabilizing Mutations in the Central Part of $\alpha$ -Chain of Tropomyosin on Structural and Functional Properties of $\alpha\beta$ -Tropomyosin Heterodimers

A.M. Matyushenko\* \*\*, N.V. Artemova\*, D.V. Shchepkin\*\*\*,  
G.V. Kopylova\*\*\*, and D.I. Levitsky\* \*\*\*\*

\*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,  
Leninsky prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

\*\*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

\*\*\*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
ul. Pervomaiskaya 106, Yekaterinburg, 620049 Russia

\*\*\*\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119992 Russia

We studied the effects of the double mutation D137L/G126R in the central part of the  $\alpha$ -chain of tropomyosin, i.e. simultaneous replacement of two highly conserved non-canonical residues – Asp137 and Gly126 by canonical residues Leu and Arg, respectively, on the properties of  $\alpha\beta$ -tropomyosin heterodimers. It has been shown using circular dichroism that this mutation substantially increases the thermal stability of  $\alpha\beta$ -tropomyosin heterodimers, which, nevertheless, remains lower than that of  $\alpha\alpha$ -tropomyosin homodimers with these mutations in both  $\alpha$ -chains. We also studied the stability of tropomyosin complexes with F-actin by measuring the temperature dependences of their dissociation, which was detected by a decrease in light scattering. It was shown that  $\alpha\beta$ -tropomyosin heterodimers carrying D137L/G126R mutation in the  $\alpha$ -chain dissociate from the surface of actin filaments at higher temperature than  $\beta\beta$ -homodimers, but at lower temperature than  $\alpha\alpha$ -homodimers with these mutations in both  $\alpha$ -chains. It has also been shown using *in vitro* motility assay that D137L/G126R substitution in the  $\alpha$ -chain increases a sliding velocity of regulated actin filaments in the case of  $\alpha\alpha$ -homodimers, but it noticeably decreases the velocity in the case of  $\alpha\beta$ -tropomyosin heterodimers. Thus, we can conclude that mutations in one of the chains of tropomyosin dimeric molecule may have different effects on the properties of tropomyosin homodimers and heterodimers.

*Key words:* tropomyosin,  $\alpha\beta$ -heterodimers, circular dichroism, *in vitro* motility assay