
На правах рукописи



ЩЕПКИН Даниил Владимирович

**Исследование вклада сердечного миозин-связывающего
белка С во взаимодействие сократительных белков
миокарда**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург - 2011

Работа выполнена в лаборатории биологической подвижности Учреждения Российской академии наук Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН

Научные руководители:

Доктор биологических наук
Бершицкий Сергей Юрьевич

кандидат биологических наук, в.н.с.
Никитина Лариса Валерьевна

Официальные оппоненты:

Член-корреспондент РАН, ЗДНРФ,
доктор биологических наук, профессор
Мархасин Владимир Семенович

лауреат Государственной премии РФ,
доктор биологических наук
Прошева Валентина Ивановна

Ведущая организация:

ГУНУ Факультет фундаментальной медицины
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (119192, г.
Москва, Ломоносовский пр., д. 31, корп.5).

Защита состоится «20» ИЮНЯ 2011 г. в 13⁰⁰ часов на заседании
совета по защите кандидатских и докторских диссертаций Д 004.027.01 при
учреждении РАН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу:
620049, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО
РАН (620041, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, д. 22/20), с авторефератом —
на сайте учреждения РАН Института иммунологии и физиологии УрО РАН -
<http://www.iip.uran.ru>

Автореферат разослан «18» МАЯ 2011 г.

Ученый секретарь совета по защите кандидатских
и докторских диссертаций Д 004.027.01 при учреждении РАН

Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
доктор медицинских наук, профессор



И. А. Тузанкина

2011А
11554

Общая характеристика работы

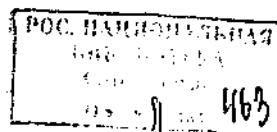
Актуальность

Известно, что сократительный аппарат кардиомиоцита содержит собственно сократительные белки – миозин и актин, а также регуляторные белки тропонин и тропомиозин. Миозин вместе с актином участвует в механизме превращения химической энергии АТФ в механическую работу. Миозин миокарда млекопитающих представлен двумя основными изоформами – V1 и V3. Изоформа V1 является гомодимером α -тяжелых цепей, а изоформа V3 – гомодимером β -тяжелых цепей. Изоформы сердечного миозина различаются по своим функциональным характеристикам. Кроме того, на характеристики миозина оказывают влияние легкие цепи. Различие в соотношениях изоформ V1/V3 в различных слоях миокарда непосредственно влияет на насосную функцию сердца [Krenz et al., 2007].

Толстый филамент саркомера кардиомиоцита содержит кроме миозина другие белки, в частности, сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С). В начале 70-х годов с помощью иммуногистохимии было продемонстрировано, что сМуВР-С располагается в А-диске так называемой С-зоны области перекрытия толстых и тонких нитей саркомера кардиомиоцита [Offer et al., 1973]. С тех пор считалось, что сМуВР-С выполняет структурную роль в организации толстых и тонких филаментов в саркомере.

В исследованиях последних лет установлено, что сердечный миозин-связывающий белок С играет не только структурную роль, но и принимает участие в регуляции сокращений сердечной мышцы. При этом предполагалось, что регуляторная функция сМуВР-С состоит в его влиянии на формирование акто-миозинового комплекса [Saber et al., 2008].

В работе Richard с соавторами [Richard et al., 2003], выполненной в рамках международного исследования EUROGENE Heart Failure Project, было показано, что причиной семейной гипертрофической кардиомиопатии являются мутации в 9 генах, кодирующих белки саркомера миофибрилл кардиомиоцита. В этой работе



было показано, что почти половина (43%) наследственных кардиомиопатий связана с мутацией в гене, кодирующем сердечную изоформу миозин-связывающего белка С. На данный момент известно 165 мутаций этого белка, способных вызвать гипертрофическую кардиомиопатию.

В связи с этими данными были проведены эксперименты по моделированию развития гипертрофической кардиомиопатии на мышах, нокаутных по гену сердечного миозин-связывающего белка С. Отсутствие сМуВР-С в сердце таких мышей приводило к гипертрофической кардиомиопатии [Korte et al., 2003; Witt et al., 2001], которая характеризовалась утолщением стенки левого желудочка, а также её фиброзом. У таких мышей наблюдались также функциональные нарушения сократимости миокарда, выражающиеся в уменьшении фракции выброса и максимальной конечно-систолической жесткости левого желудочка при отсутствии изменений в максимальной скорости развития напряжения [Korte et al., 2003].

В экспериментах на трабекулах, изолированных из миокарда нокаутных по гену сМуВР-С мышей, Stelzer с соавторами в 2006 году было найдено, что его отсутствие приводило к увеличению скорости ненагруженного укорочения. Было также показано, что влияние сМуВР-С на регуляцию сокращений, т.е. на связь «рСа-сила», крайне противоречиво: в разных экспериментальных моделях гипертрофической кардиомиопатии на мышах сМуВР-С либо влиял, либо не влиял на коэффициент кооперативности Хилла и кальциевую чувствительность связи «рСа-сила» [Stelzer et al., 2006; Korte et al., 2003]. Такие противоречия объясняли тем, что при отсутствии сМуВР-С в кардиомиоците могут запускаться различные компенсаторные процессы, которые выражаются в смене изоформ сердечного миозина с быстрой V1 на медленную V3, а также в изменении степени фосфорилирования белков саркоплазматического ретикулула [Pohlmann et al., 2007].

К настоящему времени имеется лишь несколько публикаций по исследованию влияния сМуВР-С на кальциевую регуляцию взаимодействия актина с миозином, выполненных на уровне взаимодействующих молекул сократительных белков, т.е. на искусственной подвижной системе, причём во всех из них в качестве

экспериментальной модели использовалась быстрая изоформа скелетного миозина [Razumova et al., 2006]. В результате открытым оставался вопрос о корректности этой модели для изучения влияния сМуВР-С на сократительную функцию миокарда и ее регуляцию. Опубликована только одна работа, в которой сМуВР-С и сердечный миозин использовались в искусственной подвижной системе одновременно, но в этой работе вопрос регуляторной роли сМуВР-С не затрагивался [Lecarpentier et al., 2008].

Таким образом, до настоящего времени вопрос о влиянии сМуВР-С на регуляцию взаимодействия тонкого филамента как с сердечным миозином, так и его отдельными изоформами не ставился.

Методически наши исследования регулирующего влияния сМуВР-С на актомиозиновый комплекс основаны на использовании искусственной подвижной системы, а также измерении скорости гидролиза АТФ миозином и его изолированными изоформами.

Цель работы: исследование молекулярных механизмов влияния сердечного миозин-связывающего белка С (сМуВР-С) на характеристики взаимодействия сократительных и регуляторных белков сердечной мышцы.

Задачи:

1. Исследовать влияние сМуВР-С на гидролитические свойства изоформ скелетного и сердечного миозина кролика.
2. С помощью метода искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом исследовать влияние сМуВР-С на зависимость скорости движения тонкого филамента по сердечному миозину кролика от концентрации кальция.
3. С помощью метода искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом исследовать влияние сМуВР-С на зависимость скорости движения тонкого филамента по изоформам сердечного миозина кролика от концентрации кальция.

4. Исследовать влияние сМуВР-С на взаимодействие регулируемого тонкого филамента с изоформами скелетного и сердечного миозина, используя искусственную подвижную систему.
5. Исследовать влияние сМуВР-С на тропомиозиновую регуляцию акто-миозинового взаимодействия методом искусственной подвижной системы.

Научная новизна

Впервые исследовано влияние сМуВР-С на гидролитические характеристики изоформ сердечного миозина VI и V3. Характер влияния сМуВР-С на актин-зависимую Mg^{2+} -АТФ-азную активность изоформ сердечного миозина VI и V3 различен, что может иметь адаптивное значение при патологиях, связанных с изменением состава тяжёлых цепей миозина.

Впервые методом искусственной подвижной системы с регулируемым тонким филаментом исследовано влияние сМуВР-С на зависимость «pCa-скорость» для сердечного миозина кролика и его изоформ. Обнаружено, что сМуВР-С оказывает различное влияние на кальциевую чувствительность и коэффициент Хилла зависимости «pCa-скорость» изоформ сердечного миозина VI и V3.

Впервые выявлено влияние состава лёгких цепей миозина на характер взаимодействия сМуВР-С с акто-миозиновым комплексом.

Впервые исследовано влияние сМуВР-С на тропомиозиновую регуляцию акто-миозинового взаимодействия и показано, что это влияние зависит от типа миозина.

Научная и практическая значимость

Получены доказательства неадекватности использования быстрого скелетного миозина в качестве экспериментальной модели для изучения свойств сердечного миозин-связывающего белка С.

Получены новые данные о роли сердечного миозин-связывающего белка С в регуляции сокращений сердечной мышцы. С помощью искусственной подвижной системы и биохимических методов выявлено, что влияние сМуВР-С на процессы

кальциевой регуляции сократительной функции миокарда определяются составом тяжелых и легких цепей изоформ сердечного миозина, что может иметь значение при патологиях, связанных с изменением состава тяжелых и легких цепей миозина.

Полученные в работе данные позволят понять механизмы нарушения сократительной функции миокарда при мутациях сМуВР-С, которые приводят к тяжелой форме наследственной кардиомиопатии, так называемой «семейной гипертрофической кардиомиопатии» (familial hypertrophic cardiomyopathy).

Внедрение:

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре экспериментальной физики физико-технического факультета Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н.Ельцина; на кафедре нормальной физиологии ГОУ ВПО «Уральской государственной медицинской академии Минздравсоцразвития России».

Положения, выносимые на защиту:

1. Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) по-разному влияет на актин-зависимую Mg^{2+} -АТФ-азную активность быстрой и медленной изоформ сердечного миозина.
2. В искусственной подвижной системе добавление сМуВР-С модулирует кальциевую чувствительность и коэффициент кооперативности Хилла связи «рСа-скорость» сердечного миозина, а также специфически влияет на эти характеристики для быстрой и медленной изоформ сердечного миозина.
3. Состав легких цепей миозина влияет на характер взаимодействия сМуВР-С с акто-миозиновым комплексом.
4. Влияние сМуВР-С на тропомиозиновую регуляцию акто-миозинового взаимодействия зависит от типа миозина.

Апробация работы и публикации.

Результаты работы были представлены на XXXVI «European Muscle Congress» (Стокгольм, Швеция, 2007 г.); на международных конференциях «Biological motility:

Achievements and Perspectives» (г. Пушкино, 2008 г.); «Biological motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies» (г. Пушкино, 2010 г.); на международном форуме по нанотехнологиям (г. Москва, 2008).

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК – 5 публикаций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической и экспериментальной глав, обсуждения, выводов и списка литературы из 145 наименований. Диссертация изложена на 127 страницах, включая 34 рисунка и три таблицы.

Автор приносит благодарности д.ф.-м.н. Кашнельсону Л.Б. за консультации и обсуждение результатов; Копыловой Г.В. за сотрудничество в проведении экспериментов; к.б.н. Машанову Г.И. за предоставленную программу записи и обработки видеоизображения.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ, Программы фундаментальных исследований Президиума РАН, гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущей школы РФ.

Содержание работы

Обзор литературы

В обзоре литературы рассматриваются известные к настоящему моменту сведения о структуре и свойствах изоформ сердечного миозина и белков тонкого регулируемого филамента (актин, тропонин и тропомиозин). Детально рассмотрен механизм кальциевой регуляции сокращения миокарда. Особое внимание уделено работам по исследованию структуры и функциональных свойств сердечного миозин-связывающего белка С.

Материал и методы исследования

Растворы. Буфер АВ состоял из 25 мМ КСl, 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА и 10 мМ дитиотриэтола, рН 7,5.

Получение белков. Актин выделяли из ацетонового порошка по стандартной методике [Pardee and Spudich, 1982]. Сердечные тропомиозин и тропонин выделяли из миокарда левого желудочка сердца быка методами Smille [Smille et al., 1982] и Potter [Potter et al., 1982] с небольшими модификациями. Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) был получен из куриных сердец по методу Hartzell и Glass [Hartzell and Glass, 1985] с небольшими модификациями. После экстракции сМуВР-С осаждался сульфатом аммония до финального насыщения 55% и растворялся буфером, содержащим 70 мМ КСl, 10 мМ MES, 2 мМ NaN₃, 0,1 мМ ЭДТА, 3 мМ 2-меркаптоэтанола, рН 6,45, и диализовался против этого же буфера. После диализа сМуВР-С был очищен с помощью жидкостной хроматографии (АКТА basic 10 FPLC, Amersham Biosciences) на 5-ml HiTrap Q HP колонке с линейным градиентом от 70 мМ до 300 мМ NaCl в буфере следующего состава 10 мМ MES, 2 мМ NaN₃, 0,1 мМ ЭДТА, 3 мМ 2-меркаптоэтанола, рН 6,45. сМуВР-С который элюировал в области 90-130 мМ по NaCl, концентрировали добавлением сульфата аммония с последующим центрифугированием при 15000 g в течение 15 минут. Осажденный сМуВР-С растворяли буфером АВ, содержащим 80 мМ КСl, и диализовали против этого же буфера. Чистоту полученных белков проверяли с помощью ПААГ-электрофореза.

Изоформа V1 миозина была получена из миокарда левого желудочка гипертиреоидных, изоформа V3 – гипотиреоидных кроликов [Litten et al., 1985; vanVuren et al., 1995]. Миозин выделяли из левого желудочка сердца кролика по стандартной методике [Margossian and Lowey, 1982] с небольшими модификациями. Состав тяжелых цепей сердечного миозина проверялся методом ПААГ-электрофореза [van der Velden et al., 1999]. Миокард левого желудочка гипертиреоидных кроликов содержал преимущественно изоформу миозина V1 (~90%), гипотиреоидных – изоформу миозина V3 (~90%). В день эксперимента неработающие молекулы миозина удаляли ультрацентрифугированием с F-актином и АТФ [Gordon et al., 1997].

Выделение изоформ скелетного миозина производили в соответствии с методом [Margossian and Lowey, 1982] с незначительными модификациями. Быстрый

скелетный миозин выделяли из спинной мышцы кролика, а медленный скелетный миозин выделяли из полумембранной мышцы кролика.

Получение реконструированной тонкой нити. Регулируемую тонкую нить, состоящую из актина, тропонина и тропомиозина реконструировали путем смешивания этих белков в следующих концентрациях: 400 нМ ТМРФ-Ф-актина, 80 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина при 4 °С в буфере АВ. Соотношение белков в тонких нитях проверяли с помощью ПААГ-электрофореза [Laemmli et al., 1970].

Измерение АТФ-азной активности. Актин-активируемая Mg^{2+} -АТФ-азная активность миозина измеряли колориметрическим методом по свободному неорганическому фосфату [Kodama, et al 1986] при 28 °С в буфере АВ, содержащем 0,05 мкМ миозина, от 10 до 30 мкМ F-актина и 1 мМ АТФ. Основные параметры кинетики Михаэлиса-Ментен определялись с помощью графика Лайнуивера-Бэрка.

Ca^{2+} -регулируемая Mg^{2+} -АТФазная активность миозина определялась в присутствии регулируемого филамента, состоящего из актина, тропомиозина и тропонинового комплекса. Реакционная смесь при определении Ca^{2+} -регулируемой Mg^{2+} -АТФ-азной активности миозиновых филаментов содержала белки в следующих концентрациях: 0,05 мкМ миозиновых филаментов (по миозину), от 0,01 мкМ до 0,1 мкМ сМуВР-С; 10 мкМ актина, 2 мкМ тропомиозина и 2 мкМ тропонина. Ca^{2+} -регулируемая Mg^{2+} -АТФазная активность миозина была измерена при двух характерных концентрациях свободного кальция в растворе: ненасыщающей ($pCa7$) и насыщающей ($pCa4$).

Во всех экспериментах по измерению Mg^{2+} -АТФ-азной активности миозина с сМуВР-С миозиновые филаменты предварительно инкубировались в течение 2 мин с сМуВР-С в соотношении молярных концентраций сМуВР-С к миозину: 1:5, 1:2, 1:1 и 2:1.

Необходимая концентрация свободного кальция достигалась добавлением в финальный раствор, содержащий АТФ и ЭГТА, соответствующего количества $CaCl_2$, которое было рассчитано с помощью доступной в интернете программы WEBMAXC STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>).

Эксперименты на искусственной подвижной системе. Для установки был использован инвертированный флуоресцентный микроскоп (Axiovert 200 M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH), укомплектованный ртутной лампой HBO 100, набором фильтров для тетраметилродамина (ТМФ) и масляно-иммерсионным объективом Alpha Plan-Fluar 100×1,45 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Изображение меченого актина регистрировалось с помощью EMCCD видеокамеры (Andor) и записывалось на жесткий диск компьютера с помощью программы GMimPro [Mashanov et al., 2007].

Проточная камера состояла из предметного стекла с приклеенным к нему покровным стеклом, внутренняя поверхность которого была покрыта нитроцеллюлозой. 50 мкл миозина в высокоионном буфере АВ, содержащем 500 мМ КСl, загружали в проточную камеру и инкубировали в течение 3 мин. Для каждого типа миозина мы использовали свою концентрацию миозина. Изоформы сердечного миозина и скелетный медленный миозин загружали в проточную камеру в концентрации 300 мкг/мл, а скелетный быстрый миозин загружали в камеру в концентрации 100 мкг/мл. Затем камеру промывали последовательно высоко- и низкоионным буфером АВ и добавляли 50 мкл БСА в концентрации 0,5 мг/мл на 1 мин. Далее загружали 500 мкг/мл F-актина в буфере АВ с 2 мМ АТФ на 5 мин для блокировки неработающих миозиновых головок; после чего камеру трижды промывали буфером АВ. Далее добавляли 50 мкл раствора флуоресцентно меченых F-актина или тонких регулируемых филаментов в концентрации 10 нМ в буфере АВ, содержащем 100 нМ тропонин и 100 нМ тропомиозин, и инкубировали 10 мин. Затем промывали камеру буфером АВ с 0,5 мг/мл БСА, 3,5 мг/мл глюкозы, 0,02 мг/мл каталазы, 0,15 мг/мл глюкозо-оксидазы, 20 мМ ДТТ, 2 мМ АТФ и 0,5 % метилцеллюлозы. В случае экспериментов с регулируемым тонким филаментом раствор с АТФ содержал дополнительно 100 нМ тропонина и 100 нМ тропомиозина для предотвращения диссоциации регуляторных белков от актина. Необходимая концентрация свободного кальция в растворе достигалась добавлением Ca^{2+} -ЭГТА. Все эксперименты были выполнены при температуре 28 °С. В случае экспериментов с

cMyBP-C миозин предварительно инкубировали в течение 2 мин с cMyBP-C в соотношении молярных концентраций cMyBP-C к миозину: 1:5 и 1:2.

Построение зависимости «pCa-скорость». Для построения зависимости «pCa-скорость» были определены скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по различным типам миозина при концентрациях кальция в растворе проточной камеры от pCa=4 до pCa=8. Скорость скольжения филаментов определяли с помощью компьютерной программы GMimPro. Кривая зависимости «pCa-скорость» была построена согласно уравнению Хилла методом наименьших квадратов:

$$V = V_{max} (1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})})^{-1}$$
, где V и V_{max} – скорость при данном значении pCa и максимальная скорость при насыщающей концентрации кальция, соответственно; pCa_{50} – величина, при которой достигается половина максимальной скорости скольжения филаментов (кальциевая чувствительность), h – коэффициент кооперативности Хилла.

Статистическая обработка.

Эксперименты по определению АТФ-азной активности миозина проводились от трёх до шести раз. Значения K_m и V_{max} представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Для построения зависимости «pCa-скорость» была усреднена скорость не менее 100-150 филаментов для каждого значения pCa в растворе.

Значения скоростей представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Эксперименты по определению зависимости «pCa-скорость» были проведены трижды. Значения коэффициента Хилла и pCa50 для этих зависимостей получены для каждого эксперимента и усреднены. Значения скоростей, коэффициентов Хилла и pCa50 представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Microsoft Excel» и «Статистика 6.0», для оценки значимости различий использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Для исследования влияния сердечного миозин-связывающего белка С на взаимодействие скелетных и сердечных изоформ миозина с филаментарным актином и регулируемым тонким филаментом мы провели эксперименты на искусственной подвижной системе, а также изучили влияние сМуВР-С на скорость гидролиза АТФ изоформами скелетного и сердечного миозина.

Для получения изоформ сердечного миозина двухмесячные кролики были подвергнуты обработке пропилтиоурацилом или трийодтиронином (тироксин или ТЗ-гормон). В результате под действием трийодтиронина доля изоформы V1 миозина в миокарде увеличилась до 90%, а при ингибировании синтеза трийодтиронина пропилтиоурацилом увеличивалась доля изоформы V3 миозина.

Для оценки чистоты полученных изоформ сердечного миозина V1 и V3 был проведён гель-электрофорез тяжёлых цепей изоформ миозина из левых желудочков кроликов, обработанных пропилтиоурацилом и L-тироксинном (рисунок 1).



Рисунок 1 - Денатурирующий полиакриламидный гель-электрофорез изоформ тяжёлых цепей миозина из левых желудочков кроликов, обработанных пропилтиоурацилом (линия 1) и L-тироксинном (линия 2).

Примечание: α и β – изоформы тяжёлых цепей сердечного миозина.

С целью изучения влияния лёгких цепей миозина на взаимодействие сМуВР-С с миозином и актином проводились эксперименты с медленным скелетным миозином. Медленный скелетный миозин содержит в своём составе ту же β-цепь миозина, что и V3 изоформа сердечного миозина, так как эта цепь кодируется одним геном. У кролика в состав медленного скелетного миозина входят лёгкие цепи: LC1sa, LC1sb и sLC2. Для сравнения состава лёгких цепей сердечного миозина и медленного скелетного миозина был проведён гель-электрофорез в 10% ДСН-ПААГ (рисунок 2).

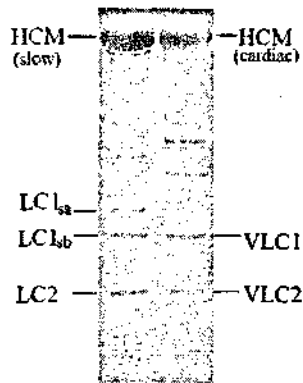


Рисунок 2 - Гель-электрофорез медленного скелетного (левая колонка) и сердечного (правая колонка) миозинов в 10% ДСН-ПААГ.

Примечание: медленный скелетный миозин: LC1sa, LC1sb – существенные лёгкие цепи, LC2 – регуляторная лёгкая цепь и HCM (slow)-тяжёлая цепь.

Сердечный миозин: VLC1 – существенная лёгкая цепь, VLC2-регуляторная лёгкая цепь и HCM (cardiac)-тяжёлая цепь.

Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на актин-активируемую Mg^{2+} -АТФ-азную активность изоформ скелетного и сердечного миозинов.

Результаты наших экспериментов продемонстрировали, что сМуВР-С не влияет на базовую АТФ-азную активность изоформ скелетного и сердечного миозинов. Наши результаты согласуются с литературными данными [Moos et al., 1983; Hartzell, 1984]. По данным этих авторов сердечная изоформа белка С не влияла на базовую активность миозинов, как скелетного, так и сердечного. Мы также проверили это в отношении изоформ сердечного миозина V1 и V3, что было сделано впервые.

Результаты экспериментов показали также, что сМуВР-С влияет на актин-активируемую АТФ-азную активность как сердечного миозина, так и его изоформ. Так, добавление сМуВР-С к сердечному миозину и к изомиозину V3 приводит к увеличению актин-активируемой АТФ-азной активности на 50%. При добавлении сМуВР-С до молярного отношения сМуВР-С к миозину 1:2 Mg^{2+} -АТФ-азная активность к изомиозину V1 увеличивается на 20%. В дальнейшем с ростом концентрации сМуВР-С АТФ-азная активность V1 падает до первоначального уровня. В то время как на АТФ-азная активность изоформ скелетного миозина сМуВР-С влияния не оказывает.

Чтобы оценить влияние сМуВР-С на кинетические характеристики актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазной активности филаментов сердечного миозина, мы измерили Mg^{2+} -АТФ-азную активность как функцию от концентрации актина в присутствии и отсутствии сМуВР-С. Результаты наших экспериментов показали, что сМуВР-С в физиологической концентрации (молярное отношение сМуВР-С к миозину 1:5) статистически достоверно не влияет на максимальную скорость гидролиза АТФ, V_{max} , и константу Михаэлиса, K_m . В следующей серии экспериментов оценивалось влияние сМуВР-С на кинетические характеристики актин-активируемой Mg^{2+} -АТФ-азной активности филаментов изомиозинов VI и V3, что было сделано впервые. Как оказалось, сМуВР-С в физиологической концентрации (молярное отношение сМуВР-С к миозину 1:5) не влияет статистически достоверно на максимальную скорость гидролиза АТФ, V_{max} , и константу Михаэлиса, K_m .

Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на регулируемую Mg^{2+} -АТФ-азную активность филаментов изоформ скелетного и сердечного миозинов.

Определение регулируемой Mg^{2+} -АТФазной активности миозина проводилось в присутствии тонкого филамента, т.е. актиновый филамент содержал тропомиозин и тропониновый комплекс. Поэтому, когда в растворе не было свободного кальция, Mg^{2+} -АТФ-азная активность филаментов сердечного миозина отсутствовала. С увеличением концентрации свободного кальция Mg^{2+} -АТФ-азная активность филаментов сердечного миозина увеличивалась. Для наших экспериментов мы взяли две характерные концентрации свободного кальция в растворе: ненасыщающую (pCa7) и насыщающую (pCa4).

Результаты наших экспериментов показали, что на насыщающей (pCa4) и ненасыщающей (pCa7) концентрациях кальция присутствие сМуВР-С не оказывает влияния на регулируемую АТФ-азную активность изоформ сердечного миозина VI и V3. На насыщающей концентрации кальция сМуВР-С не оказывает влияния на АТФ-азную активность филаментов сердечного и медленного скелетного миозина.

Добавление сМуВР-С к миозиновым филаментам сердечного и медленного скелетного миозина на ненасыщающей концентрации кальция ($pCa7$) приводит к увеличению АТФ-азной активности. Так, для сердечного миозина АТФ-азная активность увеличилась в два раза, а для медленного скелетного миозина увеличилась в полтора раза по сравнению с контролем.

Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на скорость движения филаментарного актина по изоформам скелетного и сердечного миозинов.

Для сравнения влияния сМуВР-С на скорость движения актинового филамента для изоформ скелетного и сердечного миозинов в серии экспериментов на искусственной подвижной системе оценивалась зависимость скорости движения филаментарного актина от концентрации сМуВР-С в проточной камере.

В результате наших экспериментов было выявлено, что сМуВР-С не оказывал влияние на движение актина по скелетному быстрому миозину. В экспериментах с медленным скелетным миозином сМуВР-С не изменяло скорость движения F-актина.

Также было обнаружено, что при соотношении сМуВР-С/миозин 1:5, сМуВР-С не влиял на скорость F-актина, тогда как при отношении 1:2 сМуВР-С замедлял скорость движения филаментов (падение скорости составило ~20%) по сердечному миозину.

На рисунке 3 показано влияние сМуВР-С на скорость скольжения филаментарного актина по изоформам сердечного миозина V1 и V3. Из рисунка видно, что скорость скольжения филаментарного актина различается для изоформ сердечного миозина V1 и V3. Скорость скольжения филаментарного актина по изоформе V1 значительно выше ($1,1 \pm 0,09$ мкм/с), чем по изоформе V3 ($0,63 \pm 0,06$ мкм/с). Добавление сМуВР-С тормозит движение филаментарного актина (панель А) по изоформам сердечного миозина V1 и V3 ($1,1 \pm 0,09$ мкм/с против $0,58 \pm 0,05$ мкм/с для V1 и $0,63 \pm 0,06$ мкм/с против $0,48 \pm 0,03$ мкм/с для V3).

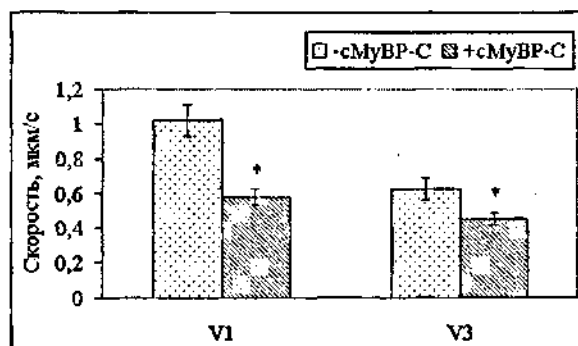


Рисунок 3 - Скорость скольжения филаментарного актина по изоформам сердечного миозина VI и V3 в присутствии и отсутствии сМуВР-С.

Примечание: сМуВР-С- сердечный миозин-связывающий белок С. Концентрация миозина и сМуВР-С, загружаемых в проточную камеру, составляла 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, что выражается в молярном отношении сМуВР-С/миозин как 1:5. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия значения скоростей от контроля (без сМуВР-С), $p < 0,05$.

Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на скорость движения реконструированного актин-тропомиозинового филамента по изоформам скелетного и сердечного миозинов.

В искусственной подвижной системе исследовали влияние тропомиозина на движение F-актина по миозиновой поверхности, а также влияние сМуВР-С на движение актин-тропомиозинового филамента по миозину. Результаты наших экспериментов показали, что сердечный тропомиозин, выделенный из миокарда быка, тормозит движение F-актина по сердечному миозину. Сердечный тропомиозин не влияет на скорость движения F-актина по скелетному быстрому и медленному миозинам.

Добавление сМуВР-С в проточную камеру не влияет на скорость движения актин-тропомиозинового филамента по изоформам скелетного миозина. В свою очередь добавление сМуВР-С в проточную камеру приводит к увеличению скорости движения актин-тропомиозинового филамента по поверхности, покрытой сердечным миозином.

Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на связь «pCa-скорость» для изоформ скелетного и сердечного миозинов.

Для сравнения влияния сМуВР-С на связь «pCa-скорость» для изоформ скелетного и сердечного миозинов в серии экспериментов на искусственной подвижной системе оценивалась зависимость скорости движения реконструированного тонкого филамента от концентрации кальция в проточной камере (концентрацию кальция меняли в диапазоне от pCa5 до pCa8). Для кривой «pCa-скорость» оценивались как коэффициент Хилла, так и кальциевая чувствительность, определяемая величиной pCa50. В качестве моторного белка использовались быстрый скелетный миозин, медленный скелетный миозин, сердечный миозин, а также изоформы сердечного миозина.

Результаты наших экспериментов показали, что сМуВР-С не влияет на скорость движения регулируемого тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция, кальциевую чувствительность (pCa50) и коэффициент Хилла кривой «pCa-скорость», полученной для скелетного быстрого миозина.

Добавление сМуВР-С повышает скорость движения тонкого филамента по медленному скелетному миозину при насыщающей концентрации кальция: скорость увеличивается с $3,20 \pm 0,2$ мкм/с до $4,24 \pm 0,2$ мкм/с. На ненасыщающей концентрации кальция (pCa7.5) добавление сМуВР-С увеличивает скорость движения регулируемого филамента: $1,24 \pm 0,19$ мкм/с с С-белком против $0,48 \pm 0,08$ мкм/с без сМуВР-С (рисунок 4). Добавление сМуВР-С также изменяет кальциевую чувствительность pCa50 ($6,8 \pm 0,01$ без сМуВР-С против $7,13 \pm 0,08$ с сМуВР-С). Присутствие сМуВР-С в проточной камере влияет на коэффициент Хилла соотношения «pCa-скорость» ($1,49 \pm 0,08$ без сМуВР-С против $1,39 \pm 0,07$ с сМуВР-С).

Добавление сМуВР-С в физиологической концентрации (отношение сМуВР-С/миозин 1:5) к сердечному миозину снижает скорость движения регулируемого филамента по миозину при насыщающей концентрации кальция. Так, скорость регулируемого филамента при pCa 4 падает с $2,10 \pm 0,2$ мкм/с до $1,70 \pm 0,09$ мкм/с. Наоборот, добавление сМуВР-С на ненасыщающей концентрации кальция приводит

к увеличению скорости движения регулируемого филамента: $0,67 \pm 0,1$ мкм/с с сМуВР-С против нулевой скорости без сМуВР-С. Добавление сМуВР-С также

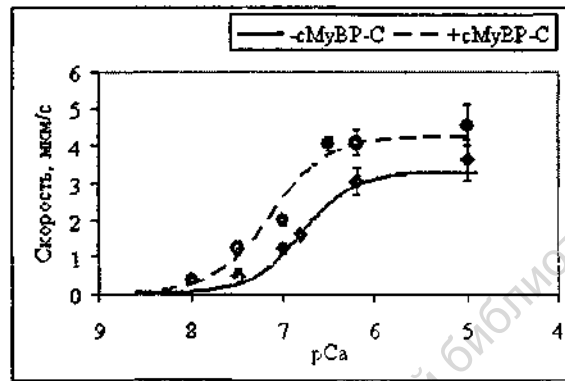


Рисунок 4 - Кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по медленному скелетному миозину от концентрации свободного кальция.

Примечание: сМуВР-С - сердечный миозин-связывающий белок С. pCa - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция. Сплошной линией обозначены значения скоростей, полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе без сМуВР-С (-сМуВР-С), пунктирной - в присутствии сМуВР-С (+сМуВР-С). Концентрации миозина и сМуВР-С, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, что выражается в молярном отношении сМуВР-С/миозин как 1:5. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла (см. методику).

изменяет кальциевую чувствительность (pCa_{50}) с $6,3 \pm 0,01$ без сМуВР-С до $6,7 \pm 0,2$ с сМуВР-С. Наиболее чувствительным к наличию сМуВР-С оказался коэффициент Хилла: $3,7 \pm 0,5$ без сМуВР-С против $0,7 \pm 0,08$ с сМуВР-С (рисунок 5).

В экспериментах с VI изоформой сердечного миозина было показано, что сМуВР-С уменьшает скорость скольжения тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция ($1,73 \pm 0,08$ мкм/с против $3,2 \pm 0,08$ мкм/с без сМуВР-С). сМуВР-С не оказывал влияния на коэффициент Хилла и кальциевую чувствительность кривой «pCa-скорость», полученной в искусственной подвижной системе для VI миозина (рисунок 6А). Так коэффициент Хилла для кривой «pCa-скорость» без сМуВР-С составил $2,28 \pm 0,78$, а с сМуВР-С $1,56 \pm 1,1$. Кальциевая чувствительность (pCa_{50}) кривой «pCa-скорость» без сМуВР-С составила $6,97 \pm 0,28$, а с сМуВР-С $7,06 \pm 0,12$.

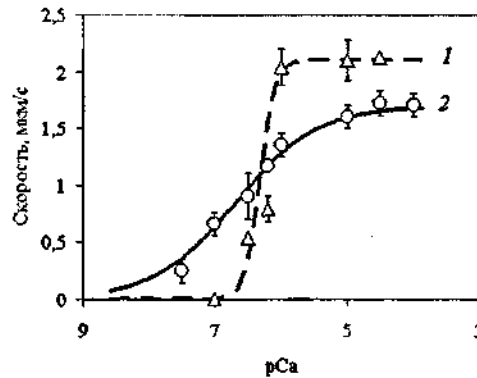


Рисунок 5 - Кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по сердечному миозину от концентрации свободного кальция без сМуВР-С (1) и в присутствии сМуВР-С (2).

Примечание: pCa - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция. сМуВР-С - сердечный миозин-связывающий белок С. Концентрации миозина и сМуВР-С, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, что выражается в молярном отношении сМуВР-С/миозин как 1:5. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла (см. методику).

В то же время добавление сМуВР-С к изомиозину V3 в искусственной подвижной системе приводило к уменьшению скорости скольжения тонкого филамента на насыщающей концентрации кальция ($1,66 \pm 0,1$ мкм/с против $2,1 \pm 0,02$ мкм/с без сМуВР-С). сМуВР-С приводит к уменьшению коэффициента Хилла « pCa -скорость», а кальциевая чувствительность (pCa_{50}) кривой не изменялась (рисунок 6Б). Так коэффициент Хилла для кривой « pCa -скорость» без сМуВР-С составил $1,4 \pm 0,18$, а с сМуВР-С $0,7 \pm 0,14$. Кальциевая чувствительность (pCa_{50}) кривой « pCa -скорость» без сМуВР-С составила $7,2 \pm 0,2$, а с сМуВР-С $7,06 \pm 0,1$.

Возможные механизмы влияния сМуВР-С на кальциевую чувствительность и коэффициент Хилла могут быть связаны с опосредованным действием сМуВР-С через миозин. Результаты, полученные в эксперименте на искусственных подвижных системах, можно объяснить, предполагая, что сМуВР-С влияет на время, которое поперечные мостики находятся в присоединенном к актину состоянии, благодаря чему они способны увеличивать кооперативное присоединение мостиков вдоль тонкой нити.

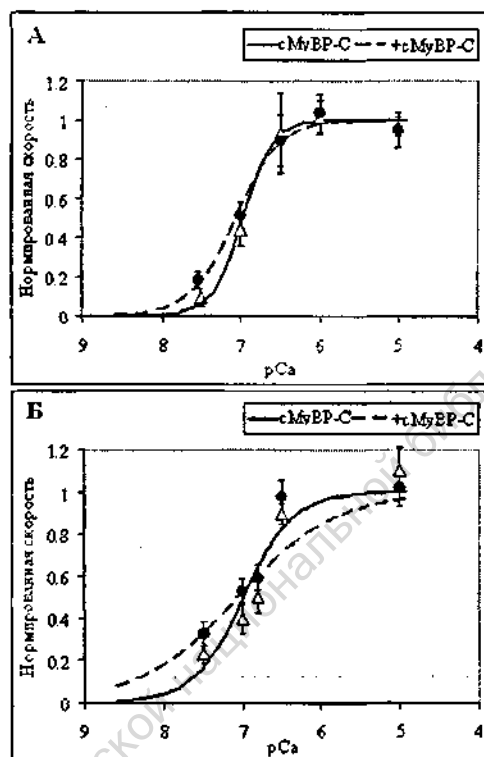


Рисунок 6 - Нормированные кривые зависимости скорости скольжения регулируемого тонкого филамента по изоформам V1 (панель А) и V3 (панель Б) сердечного миозина от концентрации свободного кальция.

Примечание: pCa - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция. сМуВР-С - сердечный миозин-связывающий белок С. Треугольниками обозначены значения скоростей без сМуВР-С (сплошная линия), полученные в экспериментах на искусственной подвижной системе, кружками - в присутствии сМуВР-С (пунктирная линия). Концентрации миозина и сМуВР-С, загружаемых в проточную камеру, составляли 300 мкг/мл (0,65 мкМ) и 20 мкг/мл (0,13 мкМ), соответственно, что выражается в молярном отношении сМуВР-С/миозин как 1:5. Скорость представлена как среднее значение \pm стандартное отклонение по трем экспериментам. Линия регрессии соответствует уравнению Хилла (см. методику).

Известны следующие кооперативные механизмы взаимодействия сократительных и регуляторных белков в миокарде. Первый - присоединение головки миозина в одной регуляторной группе (семь мономеров актина,

тропомиозин и тропониновый комплекс) способно вызвать смещение молекулы тропомиозина в этой и близлежащей регуляторной группе, что облегчает присоединение головки миозина в этой и близлежащих регуляторных группах. Второй - сильное связывание поперечных мостиков в одной регуляторной группе увеличивает сродство тропонина С к кальцию в этой и близлежащих регуляторных группах [Gordon et al., 2000]. Последний механизм является ключевым для объяснения целого ряда важнейших феноменов механозависимой активации сердечной мышцы [Izakov et al., 1991]. И в данном случае, с нашей точки зрения, он хорошо объясняет активирующий эффект сМуВР-С на ненасыщающем кальции, обнаруженный нами в экспериментах на искусственной подвижной системе. Действительно, увеличение времени присоединения миозина к актину увеличивает концентрацию поперечных мостиков в единицу времени и, согласно механизму кооперативности, увеличивает сродство тропонина С к кальцию. Иными словами, при той же ненасыщающей концентрации кальция в присутствии сМуВР-С тонкая нить оказывается более активированной. Таким образом, сМуВР-С влияет на кинетику взаимодействия миозина с актином.

Выводы:

1. Сердечный миозин-связывающий белок С не влияет на гидролитические свойства медленного скелетного миозина, но увеличивает скорость гидролиза АТФ изоформами сердечного миозина кролика.
2. Сердечный миозин-связывающий белок С оказывает модулирующее влияние на регуляцию взаимодействия сердечного миозина кролика с тонким филаментом, предполагаемый механизм такого влияния заключается в изменении кинетики поперечных мостиков миозина при одновременном связывании сМуВР-С с актином и миозином.
3. Сердечный миозин-связывающий белок С специфически действует на кальциевую регуляцию сократительной активности миокарда в зависимости от изоформ сердечного миозина; это может влиять на адаптационную пластичность сердечной мышцы в норме и при патологии.

4. Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на акто-миозиновое взаимодействие зависит от состава легких цепей миозина.
5. Влияние сердечного миозин-связывающего белка С на тропомиозиновую регуляцию акто-миозинового взаимодействия зависит от типа миозина.

Практические рекомендации:

Полученные данные по действию сердечного миозин-связывающего белка С (сМуВР-С) на кальциевую регуляцию сократительной активности миокарда в зависимости от изоформ сердечного миозина следует учитывать при разработке программ исследования адаптационной пластичности сердечной мышцы в норме и при патологии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Shchepkin D.V. Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina, L.B. Katsnelson, B.Y. Bershitsky // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – V. 401. – P. 159-163.
2. Shchepkin D.V. Assessment of the effect of cardiac myosin binding protein-C on 'pCa-velocity' relationship obtained in an *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, B.Y. Bershitsky, L.V. Nikitina // *J. General Physiology*. – 2009. – 134 – 1a-2a.
3. Никитина Л.В. Исследование взаимодействия сократительных и регуляторных белков миокарда кролика методом искусственных подвижных систем / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Качельсон // *Биохимия*. – 2008. – Т. 73, № 2. – С. 219-227.
4. Никитина Л.В. Оценка механической активности сердечных изомиозинов VI и V3 методом искусственных подвижных систем с регулируемой тонкой нитью / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Качельсон // *Биофизика*. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 956-962.
5. Kopylova G.V. Mechanical characteristics of different rabbit cardiac isomyosins obtained in an *in vitro* motility assay with regulated thin filaments / G.V. Kopylova, L.V. Nikitina, D.V. Shchepkin, L.B. Katsnelson // *J. Muscle Research and Cell Motility*. – 2007. – Vol. 28. – P. 447.

Публикации в сборниках статей, материалах конференций:

6. Shchepkin D.V. Effects of cardiac myosin binding protein-C on myocardium contractile activity assessed in an *in vitro* motility assay / D.V. Shchepkin, G.V. Kopylova, L.V. Nikitina. // *Biological Motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies: international symposium (Pushchino, May 11-15, 2010)*. – Pushchino, 2010. – P. 237-239.

7. Nikitina L.V. pCa-Force relationship assessed in an in vitro motility assay for rabbit cardiac muscle / L.V. Nikitina, G.V. Kopylova, D.V. Shchepkin, L.B. Katsnelson // *Biological Motility: Achievements and Perspectives: international symposium (Pushchino, May 11-15, 2008)*. – Pushchino, 2008. – P. 44-48.
8. Никитина Л.В. Связь «pCa-сила» миокарда кролика, полученная техникой in vitro подвижной системы / Л.В. Никитина, Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.Б. Кацнельсон // *Сборник тезисов докладов участников Международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий*. – М., 2008. – С. 512-513.
9. Копылова Г.В. Определение соотношения α - и β - тяжелых цепей сердечного миозина в миокарде различных животных методом одномерного SDS гелелектрофореза / Г.В. Копылова, Д.В. Щепкин, Л.В. Никитина // *Тезисы докладов XX съезда физиологического общества им. Павлова*. - М., 2007. – С. 277.

Список сокращений

- АТФ – аденозинтрифосфат
 БСА – бычий сывороточный альбумин
 ДСН – додецил сульфат натрия
 ПААГ – полиакриламидный гель
 ТМРФ – тетраметилпродамин-фаллоидин
 ТЦМ – тяжелые цепи миозина
 ЭГТА – этиленгликоль тетрауксусная кислота
 ЭДТА – этилдиметил тетрауксусная кислота
 сМуВР-С – сердечный миозин-связывающий белок С
 сТп – сердечный тропомиозин
 F-актин – филаментарный актин
 h – коэффициент Хилла
 K_m - константа Михаэлиса
 LC – легкие цепи миозина
 MES – 2-(N-морфолино) этансульфоная кислота
 pCa - отрицательный десятичный логарифм концентрации кальция
 ТпС – тропонин С
 V_{max} - максимальная скорость гидролиза АТФ

Щепкин Даниил Владимирович

**Исследование вклада сердечного множитель-связывающего
белка С во взаимодействие сократительных белков
миокарда**

Специальность 03.03.01 - Физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

2014
11554

11 - 11554

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано в печать 14.05.2011
Тираж 120 экз. Заказ № 515

Отпечатано с готовых файлов заказчика в ИП Звоников А.Н.
Салон оперативной печати «Копирус». 620072, г. Екатеринбург, ул. Сыромолова, 18/1