

На правах рукописи

МАТУСОВСКАЯ
Галина Геннадьевна

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТВИТЧИНА ЗАПИРАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ
МОЛЛЮСКОВ С ФИБРИЛЛЯРНЫМ АКТИНОМ

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2008

Работа выполнена в лаборатории биофизики клетки Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской Академии наук

Научный руководитель

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Шелудько Николай Семенович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Жадан Петр Михайлович

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Ламаш Нина Евгеньевна

Ведущая организация

Институт цитологии РАН

Защита состоится 25 сентября 2008 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.005.008.01 при Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Адрес: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (4232) 310-900

E-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

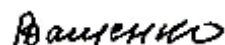
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан 24 августа 2008 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Ващенко М.А.

Актуальность проблемы

Мышцы являются специализированными структурными элементами, способными трансформировать химическую энергию в механическую работу. Несмотря на то, что строение и функция мышц разнообразны, общие принципы их работы одинаковы. Согласно теории скользящих нитей, мышечное сокращение обусловлено активным скольжением тонких актиновых нитей относительно толстых миозиновых нитей без изменения их длины. Работа мышцы заключается в циклической смене двух ее состояний: сокращения в результате повышения концентрации Ca^{2+} в саркоплазме и расслабления при ее понижении. Известно лишь одно исключение из этого правила - гладкие мышцы двустворчатых моллюсков способны поддерживать еще одно состояние – запирающий тонус или catch-состояние, при котором мышца при низкой концентрации Ca^{2+} остается сокращенной в течение длительного времени. При этом высокое значение поддерживаемой силы сочетается с низким расходом энергии. Это явление, описанное более ста лет назад, хотя и свойственно ограниченному кругу мышц, тем не менее, вызывает повышенный интерес исследователей, поскольку его механизм трудно объяснить в рамках современных представлений о механизмах биологической подвижности.

Механические свойства нативных и демембранизированных волокон запирающих мышц моллюсков свидетельствуют о том, что в основе catch лежит образование поперечных сшивок между элементами сократительного аппарата. Выдвинуты две гипотезы, конкретизирующие это положение: «мостиковая», постулирующая в качестве искомого сшивок особое ригороподобное состояние актомиозиновых мостиков (Lowy *et al.*, 1964), и «независимая» или «парамиозиновая» гипотеза, которая постулирует наличие независимой системы поперечных связей. Предполагается, что такими связями являются сшивки между толстыми нитями (Johnson *et al.*, 1959).

Мышцы, способные к запирающему тонусу, обладают необычными толстыми нитями, которые имеют большие размеры (10-20 мкм), и в их основе лежит парамиозиновый стержень, составляющий около 60% от массы толстых нитей. На поверхности парамиозинового стержня располагается миозин (Szent-Gyorgyi *et al.*, 1971), твитчин (Vibert *et al.*, 1993) и миород (Shelud'ko *et al.*, 1999). Выход из состояния запирающего тонуса стимулируется серотонинэргическим нервом, что приводит к фосфорилированию твитчина (Siegmán *et al.*, 1997). В связи с этим открытием «мостиковая» гипотеза была уточнена. Предполагается, что дефосфорилированный твитчин, взаимодействуя с миозином, придает миозиновым мостикам свойства catch-сшивок, в то время как

фосфорилированный твитчин не меняет цикл работы миозиновых мостиков (Butler *et al.*, 2001; Funabara *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001, 2004).

Хотя «мостиковая» гипотеза catch является общепринятой и тестируется длительное время, убедительных доказательств ее правильности не получено. Более того, накапливаются экспериментальные данные, которые не согласуются с этой гипотезой (Siegman *et al.*, 1997; Sugi *et al.*, 1999; Galler *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2003).

В данной работе предложена новая «независимая» гипотеза запирающего сокращения – гипотеза «твитчин-актиновых сшивок» («twitchin-actin linkage hypothesis»). Она основана на обнаруженной нами способности твитчина непосредственно взаимодействовать с фибриллярным актином, причем это взаимодействие регулируется фосфорилированием твитчина таким же образом, как распад и образование catch-сшивок *in vivo*. Согласно этой гипотезе, твитчин является одновременно и регуляторным и исполнительным белком, образуя в дефосфорилированном состоянии catch-сшивки между толстыми и тонкими нитями запирающих мышц моллюсков.

Наши данные о способности твитчина взаимодействовать с фибриллярным актином противоречат ранее опубликованным данным Ямада и сотр. (Yamada *et al.*, 2001), однако подтверждены Фунабарой и сотр. (Funabara *et al.*, 2005).

Цель и задачи исследования

Целью работы было выяснение роли твитчина в механизме запирающего тонуса гладких мышц двустворчатых моллюсков.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать методы препаративного выделения твитчина, миозина и актина из гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus*.
2. Провести поиск условий взаимодействия твитчина с фибриллярным актином.
3. Исследовать физико-химические свойства твитчин-актинового комплекса и влияние твитчина на механохимическую активность актомиозина.

Положения, выносимые на защиту

1. Твитчин из запирающих мышц двустворчатых моллюсков взаимодействует с фибриллярным актином.
2. Взаимодействие твитчина и актина регулируется фосфорилированием твитчина.

3. Твитчин-актиновое взаимодействие может быть основой запирающего сокращения мышц двустворчатых моллюсков, обеспечивая поперечные catch-сшивки между толстыми и тонкими нитями.

Научная новизна полученных результатов

Впервые показано, что гигантский белок твитчин способен взаимодействовать с фибриллярным актином, и это взаимодействие зависит от степени фосфорилирования твитчина. Взамен общепринятой «мостиковой» гипотезы запирающего тонуса (Lowy *et al.*, 1964) предложена гипотеза «твитчин-актиновых сшивок», согласно которой дефосфорилированный твитчин образует catch-сшивки между толстыми и тонкими нитями запирающих мышц моллюсков.

Теоретическое и практическое значение работы

Предложенная гипотеза «твитчин-актиновых сшивок» открывает новые возможности экспериментального исследования механизма запирающего сокращения и стимулирует поиски аналогичных систем в других мышцах, обладающих тоническими свойствами.

В работе детально описаны методы выделения и очистки сократительных белков, а также способы образования синтетических сократительных моделей, которые могут быть использованы в других исследованиях в области биологической подвижности.

Апробация работы и публикации

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных симпозиумах «Биологическая подвижность» (Пушино, 2001, 2004, 2006), VIII Международной школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2005) и ежегодной научной конференции Института биологии моря им. А.В. Жирмунского (Владивосток, 2005). По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе – 5 работ в рецензируемых изданиях из списка ВАК.

Финансовая поддержка работы

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-04-49895) и Конкурса проектов ДВО РАН (грант № 06-III-B-06-206).

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 104 страницах, состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов», выводов и списка цитируемой литературы, включающего 170 ссылок. Рукопись содержит 19 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение и очистка белков

Миозин, твитчин и «природный» Ф-актин выделяли из мышц аддуктора мидии *Crenomytilus grayanus* (мидия Грея) (Shelud'ko *et al.*, 2001, 2004, 2007). На рисунке 1 приведен пример электрофореграммы, на которой отражены основные этапы комплексного метода выделения основных сократительных белков из гладких мышц мидии. В данном случае показан ход получения конечного препарата твитчина (дорожка 11) и промежуточных препаратов миозина (дорожка 7) и «природного» Ф-актина (дорожка 5). Комплексный метод позволяет получать препаративные количества необходимых в эксперименте белков в одном выделении.

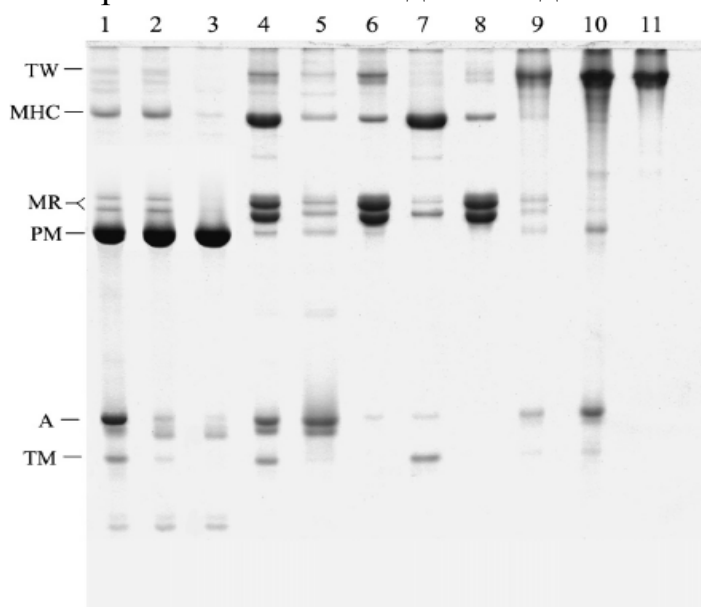


Рис. 1. Основные этапы выделения и очистки твитчина.

1 – мышечный гомогенат, 2 – толстые нити, 3 – остаток после экстракции поверхностных белков толстых нитей (парамиозиновая основа толстых нитей), 4 – поверхностные белки толстых нитей, 5 – 0-33% сульфатно-аммонийная фракция поверхностных белков, 6 – 33-43% сульфатно-аммонийная фракция поверхностных белков, 7 – 43-65% сульфатно-аммонийная фракция поверхностных белков, 8 и 9 – осадок и супернатант фракции 33-43% после ее диализа против раствора с низкой ионной силой, 10 и 11 – твитчин до и после хроматографической очистки, соответственно.

Твитчин фосфорилировали в присутствии каталитической субъединицы протеин киназы А (ПКА, Sigma) согласно Фунабара с сотр. (Funabara *et al.*, 2003).

Скелетный миозин выделяли из спинных мышц и мышц задних конечностей кролика (Margossian and Lowey, 1982). Из мышечного остатка после выделения миозина готовили ацетонизированный порошок и далее получали скелетный Ф-актин (Shelud'ko *et al.*, 2007).

Чистоту и состав препаратов сократительных белков из гладких мышц моллюсков оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (Laemmli, 1970) с некоторыми модификациями (Шелудько, 1975; Shelud'ko *et al.*, 1999).

Концентрацию белков определяли биуретовым методом или методом Бредфорда.

Определение оптических свойств

Оптическую плотность растворов и суспензий белков и белковых комплексов измеряли посредством спектрофлуориметра Спекол-11 (Carl Zeiss, Jena) с использованием приставки ЕК-1. Размер частиц белковых комплексов определяли лазерным дифракционным измерителем размера частиц (Laser Diffraction Particle Sizer 3600Ес, Malvern).

Измерение вязкости

Вязкость измеряли при низких градиентах скорости методом «падающего шарика» (Pollard and Cooper, 1982). Рассчитывали приведенную $\eta_{уд}/C$ и характеристическую вязкость $[\eta] = (\eta_{уд}/C)_{C \rightarrow 0}$.

Низкоскоростное и высокоскоростное центрифугирование

Эти методы использовались для тестирования взаимодействия твитчина с Ф-актином в условиях образования крупных агрегатов (осаждаемых при 15000 g) и для соосаждения твитчина с Ф-актином (100000 g) в условиях, когда взаимодействие этих белков не приводит к агрегации их комплексов. Перед образованием комплексов для низкоскоростного центрифугирования твитчин и Ф-актин осветляли при такой же скорости, как и при последующем осаждении комплексов. Перед высокоскоростным осаждением осветляли только твитчин. Условия центрифугирования были подобраны таким образом, чтобы оба белка не осаждались при низкоскоростном центрифугировании, и только Ф-актин осаждался при высокоскоростном центрифугировании. Осадки на дне и стенках пробирки промывали и солюбилизировали в 8.5 М мочеvine с 5 мМ ЭДТА.

Измерение АТФ-азной активности актомиозина

АТФ-азную активность синтетического актомиозина, включающего Ф-актин кролика или «природный» Ф-актин мидии, миозин кролика или мидии и твитчин определяли методом Херса, который представляет собой модификацию метода Фиске-Суббароу (Fiske and Subbarow, 1925).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Твитчин способен взаимодействовать с Ф-актином

Тестирование взаимодействия твитчина с актином проводили оптическими и гидродинамическими методами. На рисунке 2 показано изменение оптической плотности смеси двух белков – твитчина и Ф-актина в зависимости от времени. Оптическая плотность смеси этих белков в растворах с низкой ионной силой намного превышает сумму оптических плотностей отдельно взятых белков, что указывает на образование комплекса этих белков, т.е. взаимодействие этих белков в данных условиях.

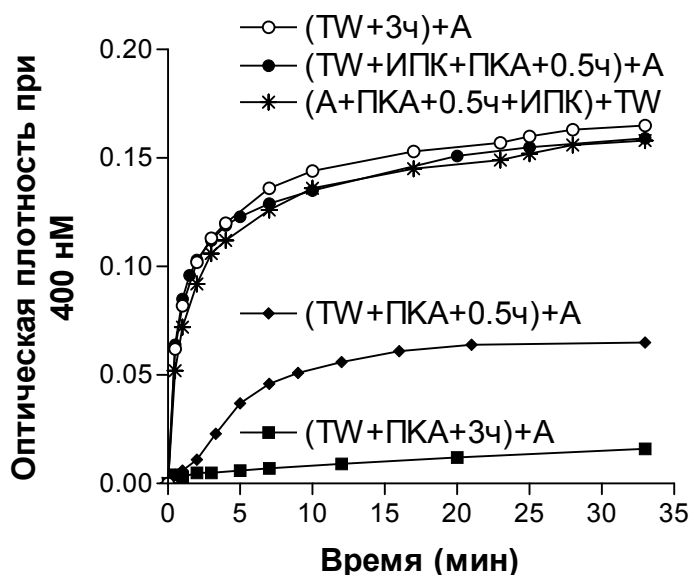


Рис. 2. Изменение оптической плотности после смешивания твитчина и Ф-актина.

Концентрация Ф-актина – 0.2 мг/мл, твитчина – 0.4 мг/мл. Состав среды (в mM): 75 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 ЭГТА, 0.5 ДТТ, 2 NaN₃, 0.5 ФМСФ, 0.5 леупептин, 25 имидазол-HCl (pH 7.0).

(TW+3ч)+A – твитчин (0.32 мг) инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов и смешивали с Ф-актином; (TW+ИПК+ПКА+0.5 ч) + A – твитчин (0.32 мг) инкубировали в присутствии ингибитора протеин киназы (ИПК) (20 мкг) и ПКА (30 U) в течение 0.5 ч и смешивали с Ф-актином; (A+ПКА+0.5ч+ИПК)+TW – Ф-актин (0.16 мг) инкубировали в присутствии ПКА (30U) в течение 0.5 ч, затем добавляли ИПК (20 мг) и твитчин; (TW+ПКА+0.5 ч) + A – твитчин (0.32 мг) инкубировали в присутствии ПКА (30 U) в течение 0.5 ч и смешивали с Ф-актином; (TW + ПКА + 3 ч) + A – то же, что и в последнем случае, за исключением 3-х часовой инкубации.

При формировании комплекса с использованием *in vitro* фосфорилированного твитчина посредством каталитической субъединицы ПКА наблюдается существенное уменьшение значений оптической плотности твитчин-актиновой смеси (рис. 2). Увеличение времени инкубации до 3-х часов (нижняя кривая) практически ингибирует взаимодействие между актином и твитчином.

Таким образом, по данным оптической плотности твитчин и актин взаимодействуют в среде с низкой ионной силой, но это взаимодействие ослабляется и исчезает по мере фосфорилирования твитчина.

Аналогичный вывод был сделан на основании данных вискозиметрии. На рисунке 3 показана зависимость приведенной вязкости Ф-актина от его концентрации и влияние на нее твитчина.

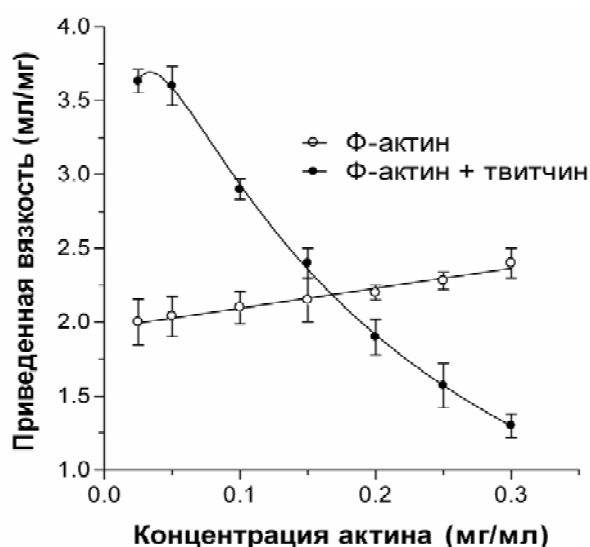


Рис. 3. Влияние твитчина на приведенную вязкость Ф-актина.

Твитчин и актин смешивали в растворе, содержащем (в мМ): 75 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 ЭГТА, 0.5 ДТТ и 10 имидазол-HCl (pH 7.0). Отношение актина к твитчину – 1:1 по весу.

Видно, что присутствие в смеси твитчина резко меняет зависимость вязкости от концентрации: при концентрациях Ф-актина 0.15 мг/мл и ниже твитчин увеличивает, в то время как при более высоких концентрациях - уменьшает вязкость Ф-актина. Вероятно, твитчин-актиновый комплекс, сформированный при низких концентрациях, обладает большей асимметрией, чем Ф-актин. С другой стороны, с увеличением концентрации смеси асимметрия образующихся частиц, по-видимому, уменьшается. Отсутствие обычной линейной зависимости вязкости Ф-актина от концентрации указывает на то, что в растворах с низкой ионной силой Ф-актин взаимодействует с твитчином.

Таким образом, вискозиметрические данные однозначно подтверждают способность твитчина взаимодействовать с актином. Однако это происходит только в том случае, когда твитчин дефосфорилирован.

На рисунке 4 показано влияние дефосфорилированного и фосфорилированного твитчина на вязкость Ф-актина в растворах с низкой (50 мМ КСl), физиологической (175 мМ КСl) и высокой (300 мМ КСl) ионной силой. Дефосфорилированный твитчин увеличивает вязкость Ф-актина при 50 мМ КСl и 175 мМ КСl до уровней, которые намного выше суммы вязкостей Ф-актина и твитчина. Как и ожидалось, твитчин не изменяет вязкость Ф-актина в растворах с высокой ионной силой. В растворах с физиологической и низкой ионной силой фосфорилированный твитчин, в отличие от дефосфорилированного, не увеличивает вязкость Ф-актина (рис. 4).

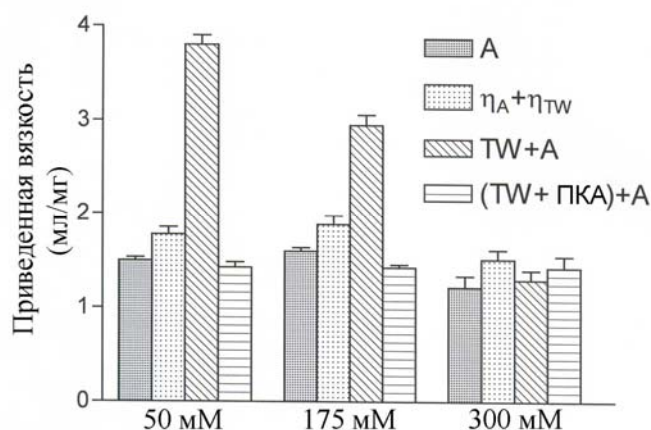


Рис. 4. Вязкость твитчин-актиновых смесей в растворах с различной ионной силой и ее зависимость от фосфорилирования твитчина.

Концентрация Ф-актина – 0.05 мг/мл, твитчина – 0.2 мг/мл. Состав среды (в мМ): 50, 175 или 300 КСl, 2 MgCl₂, 0.5 ЭГТА, 0.5 ДТТ и 25 имидазол-НСl (рН 7.0).

A – Ф-актин; $\eta_A + \eta_{TW}$ – сумма отдельно измеренных вязкостей твитчина и актина; TW + A – смесь твитчина и Ф-актина; (TW + ПКА) + A – смесь фосфорилированного твитчина и Ф-актина. Твитчин фосфорилировали посредством ПКА (70 U) при комнатной температуре в течение 60 мин.

Состав твитчин-актиновых комплексов

Итак, нами показано, что в растворах с низкой ионной силой дефосфорилированный твитчин взаимодействует с актином. Образующиеся комплексы и агрегаты комплексов могут быть осаждены центрифугированием при высокой или низкой скорости, соответственно. Состав осадков, полученных низкоскоростным центрифугированием твитчин-актиновой смеси в условиях, когда Ф-актин не осаждается (15 000g) показан на рисунке 5.

Видно, что количество осаждаемого Ф-актина возрастает с увеличением концентрации твитчина (рис. 5, дорожки 1-6), а в случае смеси, в которой концентрация Ф-актина составляет 0.1 мг/мл, а твитчина – 0.4 мг/мл (дорожка 6), осадок содержит приблизительно весь актин смеси.

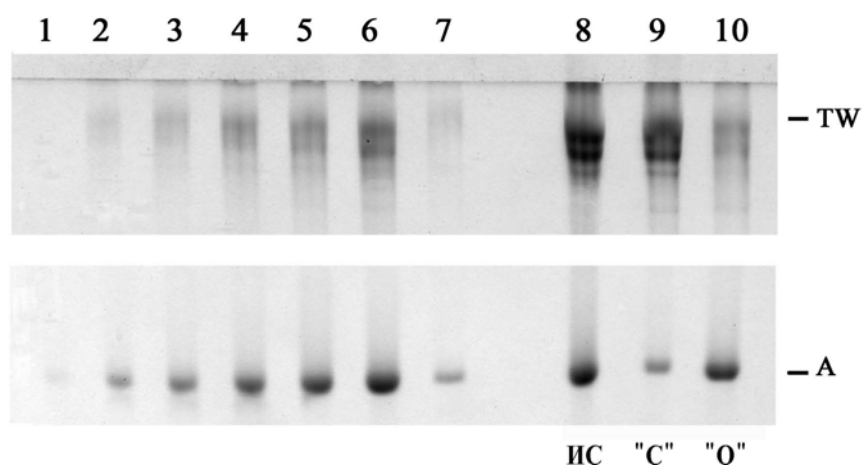


Рис. 5. Низкоскоростное осаждение смесей твитчина с Ф-актином.

Дорожки 1-6 – осадки смеси Ф-актина (0.1 мг/мл) с разными концентрациями твитчина: (мг/мл) 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 и 0.4, соответственно; дорожка 7 – то же, что на дорожке 6, но был использован фосфорилированный твитчин, дорожка 8 – смесь 0.1 мг/мл Ф-актина и 0.4 мг/мл твитчина. Дорожки 8-10 – результаты эксперимента по механическому извлечению твитчин-актинового комплекса. ИС – исходная смесь, “С” – “супернатант”, “О” – “осадок”. Белки смешивали в стандартном растворе и центрифугировали при 15000g в течение 30 мин.

Таким образом, полное осаждение Ф-актина в присутствии твитчина происходит при отношении актина к твитчину как 1:4. Это указывает на то, что в разбавленных растворах полное связывание актиновых нитей твитчином требует молярного избытка последнего.

Осаждение смеси двух белков в тех же концентрациях и условиях (отношение Ф-актина к твитчину = 1:4 по весу), но с использованием фосфорилированной формы твитчина, приводит лишь к незначительному осаждению Ф-актина (рис. 5, дорожка 7).

Следует отметить, что при низкоскоростном осаждении осадок твитчин-актинового комплекса наблюдался только при использовании растворов с низкой ионной силой (75 мМ КСl). Увеличение ионной силы раствора до 150 мМ КСl (с использованием тех же молярных соотношений и концентраций белков) приводило к тому, что при центрифугировании твитчин-актинового комплекса при 15000g осадок не образовывался, хотя при центрифугировании этих же препаратов при 100000 g осадок появлялся (см. рис. 6).

Интересно, что твитчин-актиновый комплекс, сформированный в присутствии 75 мМ КСl без перемешивания, образует трехмерную структуру, которая может быть полностью удалена из раствора тонкой стеклянной палочкой. На рисунке 5 показан белковый состав такой структуры (дорожка 10), состав «супернатанта» после удаления структуры (дорожка 9) и состав исходной смеси белков (дорожка 8). Видно, что

удаленная фракция содержит практически весь Ф-актин начальной смеси и минорную часть твитчина (отношение актина к твитчину – 1:0.2 по весу).

Высокоскоростное соосаждение двух белков в условиях, когда один из них не осаждается, широко используется для обнаружения белок-белкового взаимодействия. В случае взаимодействия белков, в осадке находится не только белок, обычно осаждающийся в этих условиях, но и белок, с ним взаимодействующий.

Использование высокоскоростного соосаждения в нашем случае выявило более сложную картину твитчин-актинового взаимодействия. Оказалось, что результаты соосаждения сильно зависят от выбранных экспериментальных условий. При условиях, представленных на рисунке 6 (дорожки 1-4) осадки формировались как на дне, так и на стенке пробирки и содержали небольшое, приблизительно одинаковое количество твитчина (дорожки 3 и 4). Однако при низком отношении твитчина к актину осадок на стенке содержал намного больше твитчина, чем осадок на дне пробирки (не показано). Мы предполагаем, что появление двух осадков связано с гетерогенностью твитчин-актинового комплекса. Комплексы могут включать как большие частицы, обогащенные твитчином, так и маленькие частицы, обогащенные актином.

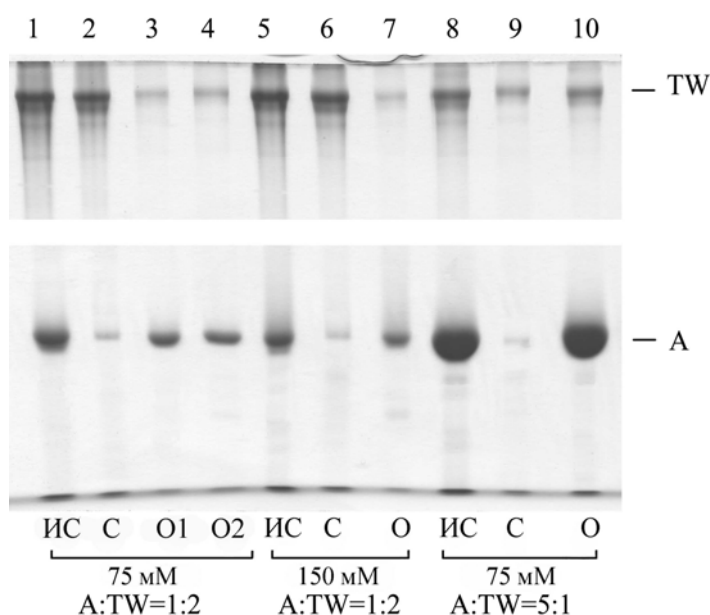


Рис. 6. Высокоскоростное соосаждение твитчина с Ф-актином.

Твитчин (0.4 мг/мл), Ф-актин (0.2 мг/мл или 2 мг/мл) смешивали в растворе, содержащем 75 или 150 мМ КСI.

ИС – исходная смесь до центрифугирования, С – супернатант, О – осадок, О1 – осадок на стенке пробирки, О2 – осадок на дне пробирки. Ультрацентрифугирование при 100000g в течение 2 часов.

В тоже время, твитчин-актиновый комплекс, сформированный в присутствии 150 мМ КСl, осаждается одним осадком на дне пробирки и содержит такое же незначительное количество твитчина (рис. 6, дорожка 7), как в случае 75 мМ КСl (рис. 6, дорожки 3 и 4). Следует отметить, что значительная часть твитчина после высокоскоростного центрифугирования остается в супернатанте (рис. 6, дорожки 2 и 6). Однако использование более концентрированных растворов Ф-актина заметно увеличивает количество связанного твитчина (рис. 6, дорожки 8-10).

Таким образом, взаимодействие твитчина и Ф-актина может быть обнаружено как низкоскоростным, так и высокоскоростным центрифугированием в растворах с низкой и физиологической ионной силой. *In vitro* фосфорилированный посредством ПКА твитчин не образует с Ф-актином осаждаемый комплекс (рис. 5, дорожка 7).

Влияние твитчина на механохимическую активность актомиозина

Как показано выше, твитчин способен взаимодействовать с Ф-актином, который является основой тонкой нити, и это взаимодействие зависит от фосфорилирования твитчина. С другой стороны, твитчин способен взаимодействовать с миозином (Yamada *et al.*, 2001) и другими белками толстой нити – параамиозином и миородом, причем все эти взаимодействия не зависят от степени фосфорилирования твитчина (Shelud'ko *et al.*, 2007). Эти данные позволяют предположить образование твитчином регулируемых сшивок между толстыми и тонкими нитями. Такие сшивки должны модифицировать механо-химические свойства актомиозиновых моделей.

На рисунке 7А показано влияние твитчина на «спонтанную» суперпреципитацию (СПП) синтетического актомиозина, т.е. на его механические свойства, а на рисунке 7В показано влияние твитчина на АТФазную активность этого актомиозина. В этих экспериментах механические и химические свойства комплексов измерялись параллельно, с использованием одних и тех же препаратов.

«Спонтанная» СПП нерегулируемого актомиозина наблюдается в условиях пониженного сродства миозина к актину, когда после добавления Mg^{2+} -АТФ к актомиозину следует сначала фаза просветления суспензии, а затем спонтанный рост ее оптической плотности (рис. 7А, кривая АМ). В фазе просветления миозиновые мостики находятся, в основном, в диссоциированном состоянии, что напоминает состояние «расслабления» регулируемого актомиозина. Со временем фаза просветления переходит в СПП, поскольку уменьшается концентрация Mg^{2+} -АТФ за счет гидролиза АТФ в фазе просветления (Spicer, 1952). Переход к спонтанной СПП сопровождается сильным увеличением АТФазной активности (рис. 7В, кривая АМ). Механизм «спонтанной» СПП хорошо изучен, включая связь

между механо-химическими и оптическими явлениями (Shelud'ko and Kropacheva, 1996), и поэтому эта модель удобна для тестирования влияния твитчина на свойства актомиозина.

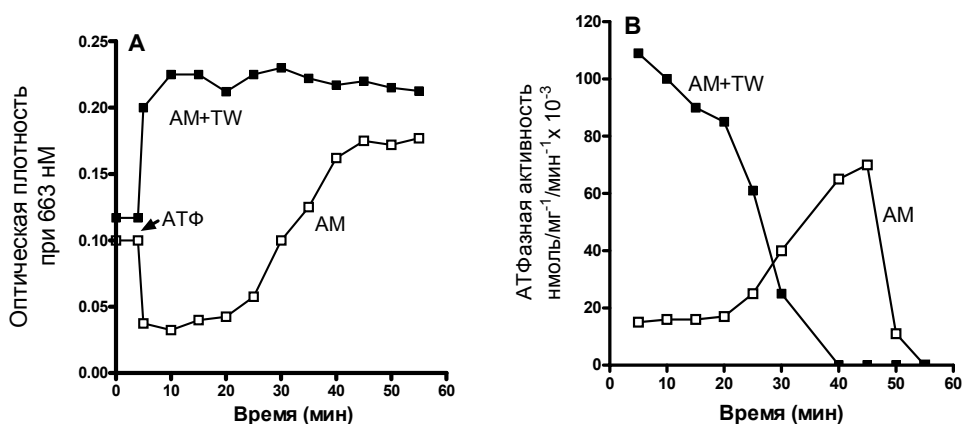


Рис. 7. Влияние твитчина на «спонтанную» суперпреципитацию (А) и Mg^{2+} -АТФазную активность синтетического актомиозина (В), реконструированного из «природного» Ф-актина мидии и миозина кролика.

Концентрация миозина – 0.15 мг/мл, Ф-актина – 0.1 мг/мл, твитчина – 0.05 мг/мл. Состав среды (в мМ): 75 KCl, 2 NaN₃, 0.1 CaCl₂, 0.25 АТФ, 2 MgCl₂, 20 имидазол-НСI (рН 7.2).

Твитчин, добавленный к актомиозину при его реконструкции, принципиальным образом меняет его механо-химические свойства. Такой актомиозин в условиях «спонтанной» СПП отвечает на добавление Mg^{2+} -АТФ «немедленной» СПП (рис. 7А, кривая АМ+ТW) которая, как и положено «немедленной» СПП, сопровождается высокой АТФазной активностью (рис. 7В, кривая АМ+ТW) (уменьшение АТФазной активности со временем в этих экспериментах связано, в основном, с уменьшением концентрации АТФ, поскольку АТФ-регенерирующая система не использовалась). Как уже говорилось, фаза просветления наблюдается в условиях пониженного сродства миозина к актину, поэтому очевидно, что эффект твитчина связан с усилением сродства миозина к актину. Мы полагаем, что твитчин образует сшивки между актиновыми и миозиновыми нитями, создавая благоприятные условия для их взаимодействия.

На рисунке 8 показано влияние твитчина на «расслабление» регулируемого синтетического актомиозина, реконструированного из тонких нитей мидии и миозина кролика. Интересно, что при относительно невысокой Ca^{2+} -чувствительности тонких нитей (50-70%), их комплекс с миозином кролика полностью суперпреципитирует («сокращается») в присутствии кальция и полностью «расслабляется» в его отсутствии (рис. 8).

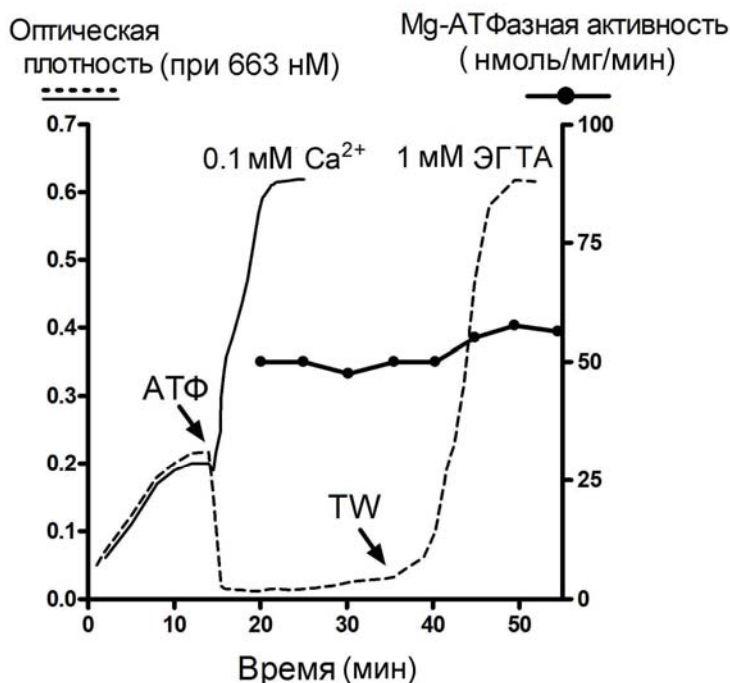


Рис. 8. Образование Ca^{2+} -чувствительного комплекса тонких нитей мидии и миозина кролика в присутствии Ca^{2+} (сплошная линия) и в отсутствие Ca^{2+} (прерывистая линия) и влияние на этот комплекс Mg^{2+} -АТФ и твитчина. Жирной линией показана АТФазная активность комплекса в условиях расслабления до и после добавления твитчина.

Концентрация миозина – 0.05 мг/мл, тонких нитей мидии – 0.05 мг/мл, твитчина – 0.005 мг/мл. Состав среды (в мМ): 30 КСl, 0.5 MgCl_2 , 1 ЭГТА или 0.1 CaCl_2 , 0.3 Mg^{2+} -АТФ, 20 имидазол-НСl (рН 7.2).

Добавление твитчина к такому актомиозину в условиях расслабления приводит к сильному увеличению оптической плотности при неизменно низком уровне АТФазной активности. Таким образом, как в случае нерегулируемого актомиозина, «расслаблению» которого соответствует фаза просветления (рис. 7), так и в случае регулируемого «расслабленного» актомиозина (рис. 8), добавление твитчина приводит к агрегации толстых и тонких нитей. Эта агрегация не связана с усилением актин-миозинового взаимодействия, поскольку добавление твитчина в условиях расслабления не приводит к увеличению АТФазной активности, а ее увеличение в фазе просветления нерегулируемого актомиозина определяется подавлением этой фазы.

Гипотеза «твитчин-актиновых сшивок»

Экспериментальные результаты, представленные в настоящей работе, позволили нам сделать предположение о том, что дефосфорилированный твитчин может самостоятельно образовывать *in vivo* механические сшивки между толстыми и тонкими нитями, которые поддерживают catch-состояние

независимо от миозиновых поперечных мостиков, т.е. предложить новый вариант «независимой» гипотезы механизма запирающего сокращения. Гипотеза «твитчин-актиновых сшивок» предполагает существование параллельной системы мостиков между толстыми и тонкими нитями с независимой регуляцией.

Обнаруженное нами взаимодействие твитчина с фибриллярным актином, зависимое от фосфорилирования твитчина, подтверждено Фунабарой с сотр. (Funabara *et al.*, 2005), и гипотеза «твитчин-актиновых сшивок» уже используется нашими коллегами при интерпретации экспериментальных данных (Hopflinger *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2006; Franke *et al.*, 2007; Funabara *et al.*, 2007).

Теоретически этой гипотезе может соответствовать три механизма запирающего сокращения:

1. Твитчин-актиновые связи выполняют регуляторную роль

Этот вариант, в конечном счете, сводится к «мостиковой» гипотезе с той лишь разницей, что влияние твитчина на актин-миозиновое взаимодействие реализуется через актин, а не через миозин. Похоже, что такой точки зрения придерживаются Фунабара и сотр. (Funabara *et al.*, 2005), которые считают, что связывание дефосфорилированного твитчина с актином усиливает взаимодействие миозиновых мостиков с актином, что и приводит к развитию catch.

2. Твитчин-актиновые связи являются catch-сшивками

Поскольку catch-сшивки присутствуют не только в catch-состоянии, но также во время активного сокращения (Ruegg, 1971; Butler *et al.*, 1998; Andruchov *et al.*, 2006), эти сшивки должны препятствовать работе миозиновых мостиков, генерирующих силу. Так как этот эффект не наблюдается (Butler *et al.*, 1998), то должен быть специальный механизм, предотвращающий торможение активных мостиков пассивными. Например, есть предположение о том, что catch-сшивки ведут себя подобно «трещетке» (Andruchov *et al.*, 2006). Это означает, что catch-сшивки обладают высоким сопротивлением силе, когда мышечное волокно удлиняется, и низким сопротивлением при его укорочении. В работах Фунабары с сотр. (Funabara *et al.*, 2007) и Франка с сотр. (Franke *et al.*, 2007) предлагается иное решение данной проблемы – миозин и твитчин конкурируют за места связывания на тонких нитях, в результате чего в каждый момент времени с тонкими нитями взаимодействует только один белок.

3. Твитчин-актиновые связи выполняют как силовую, так и регуляторную роль

В этом случае твитчин-актиновые связи могут быть слабыми или сильными. Слабые связи не мешают мышце сокращаться, но по мере их накопления меняют структурное состояние тонких нитей и, соответственно,

их взаимодействие с миозином, координируя, таким образом, поведение твитчиновых и миозиновых мостиков. При накоплении достаточного количества слабых связей они могут кооперативным образом переходить в сильные связи. Мы полагаем, что основой координационных и кооперативных процессов являются регулируемые тонкие нити, состояние которых может зависеть как от концентрации Ca^{2+} , так и от взаимодействия тонких нитей с твитчином и миозином.

Предполагаемый молекулярный механизм запирающего сокращения

Мы считаем, что твитчин-актиновые связи выполняют как силовую, так и регуляторную роль. Основанием для этого служит обнаруженное нами ингибирование твитчином Mg^{2+} -АТФазной активности комплекса тонких нитей моллюсков с нитями миозина кролика в присутствии кальция (Shelud'ko *et al.*, 2007). Это позволяет предложить молекулярный механизм запирающего сокращения, в котором ключевую роль играют регулируемые тонкие нити, координирующие поведение твитчиновых сшивок и миозиновых мостиков (рис. 9).

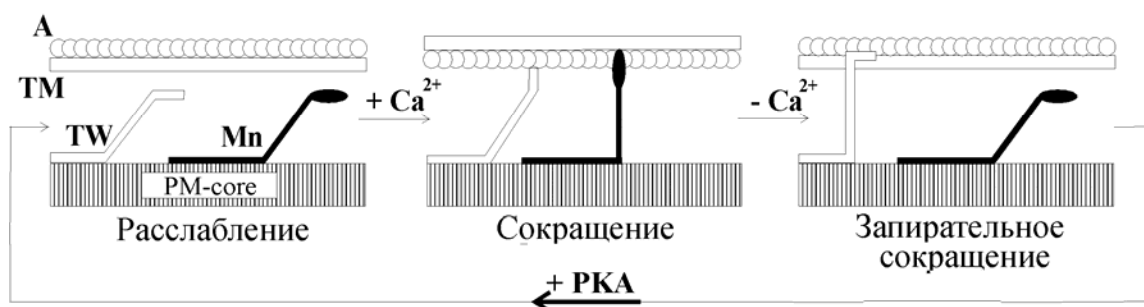


Рис. 9. Схема возможного механизма запирающего тонуса.

Для построения этой схемы были использованы следующие экспериментальные наблюдения:

- способность твитчина *in vitro* взаимодействовать с Ф-актином;
- зависимость этого взаимодействия от фосфорилирования твитчина;
- способность твитчина *in vitro* взаимодействовать со всеми белками толстой нити (Shelud'ko *et al.*, 2007);
- способность твитчина *in vitro* ингибировать активирование тонкими нитями Mg^{2+} -АТФазы миозина (Shelud'ko *et al.*, 2007).

Согласно схеме (рис. 9), в расслабленном состоянии как тонкая, так и толстая нити не активны и не взаимодействуют. Твитчин в этом состоянии фосфорилирован и не взаимодействует с тонкими нитями. Холинергическое

возбуждение вызывает кратковременное увеличение концентрации кальция, что активирует тонкие и толстые нити, а также твитчиновую фосфатазу (Yamada *et al.*, 2004). В результате одновременно начинаются два процесса: активное мышечное сокращение и формирование твитчиновых сшивок между толстыми и тонкими нитями. На начальной стадии активного сокращения твитчин-актиновые связи слабые и не препятствуют скольжению нитей. Накопление твитчиновых сшивок приводит к кооперативному переключению тонких нитей в состояние, вызывающее образование «сильных» (load-bearing) сшивок. Это переключение одновременно ингибирует акто-миозиновое взаимодействие, по-видимому, посредством ингибирования перехода миозина из слабосвязанного состояния в сильносвязанное. Последующее снижение концентрации Ca^{2+} инактивирует толстые нити, и мышца переходит в catch-состояние, поддерживаемое твитчиновыми сшивками. Выход из catch-состояния происходит вследствие ПКА-опосредованного фосфорилирования твитчина, которое инициируется серотониновой стимуляцией с последующим увеличением концентрации цАМФ (рис. 9).

ВЫВОДЫ

1. Показано, что гигантский белок твитчин из запирающих мышц двустворчатых моллюсков способен взаимодействовать с фибриллярным актином.
2. Обнаружено, что твитчин-актиновое взаимодействие *in vitro* регулируется фосфорилированием твитчина таким же образом, как фосфорилирование твитчина *in vivo* регулирует запирающий тонус мышц.
3. Предложена гипотеза «твитчин-актиновых сшивок», согласно которой в основе запирающего тонуса мышц двустворчатых моллюсков лежит образование твитчиновых сшивок между толстыми и тонкими нитями.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Shelud'ko N., Permyakova T., Tuturova K., Tyurina O., Matusovskaya G., Matusovsky O. Properties of myorod, a thick filament protein in molluscan smooth muscles // Biological Motility: New Trends in Research, Pushchino, Russia, August 20 – 26, 2001: Abstracts International Symposium. Пущино: Пущинский издательский центр РАН, 2001. P. 135-136.

Shelud'ko N.S., Permyakova T.V., Tuturova K.F., Tyurina O.V., Matusovskaya G.G., Matusovsky O.S. Proteolytic substructure of myorod, a thick filament protein of molluscan smooth muscles // Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2002. Vol. 133. P. 69-75.

Shelud'ko N.S., Matusovskaya G.G., Permyakova T.V., Matusovsky O.S. Twitchin from molluscan catch muscle can interact with actin and thick filament paramyosin core. "Twitchin hypothesis" for the mechanism of catch // Biological Motility: New Trends in Research, Pushchino, Russia, May 25-30, 2004: Abstracts International Symposium. Пушино: Пушинский издательский центр РАН, 2004. P. 101-102.

Shelud'ko N.S., Matusovskaya G.G., Permyakova T.V., Matusovsky O.S. Twitchin, a thick filament protein from molluscan catch muscle, interacts with F-actin in a phosphorylation-dependent way // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 432, № 2. P. 269-277.

Матусовская Г.Г., Пермякова Т.В., Матусовский О.С., Шелудько Н.С. NEM-модификация миорода ингибирует полимеризацию миорода // Биофизика. 2004. Т. 49, № 6. С. 1003-1007.

Матусовский О.С., Пермякова Т.В., Матусовская Г.Г., Дроздов А.Л., Шелудько Н.С. Полимеризация миорода – поверхностного белка толстых нитей гладких мышц моллюсков // Биофизика. 2005. Т. 50, № 1. С. 69-74.

Матусовский О.С., Матусовская Г.Г. Твитчин, регуляторный белок запираемых мышц моллюсков, взаимодействует с парамиозиновой основой толстых нитей // IX Международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 18–22 апреля 2005 г. Пушино: Пушинский издательский центр РАН, 2005. С. 120-121.

Dobrzanskaya A.V., Permyakova T.V., Matusovskaya G.G., Revakovskaya A.G., Shelud'ko N.S. Thin filaments from molluscan smooth muscle of the mussel *Crenomytilus grayanus* are Ca^{2+} -sensitive // Biological Motility: Basic Research and Practice, Pushchino, Russia, May 11-15, 2006: Abstracts International Symposium. Пушино: Пушинский издательский центр РАН, 2006. P. 20-22.

Shelud'ko N.S., Matusovsky O.S., Permyakova T.V., Matusovskaya G.G. "Twitchin-actin linkage hypothesis" for the catch mechanism in molluscan muscles: Evidence that twitchin interacts with myosin, myorod, and paramyosin core and affects properties of actomyosin // Arch. Biochem. Biophys. 2007. Vol. 466. P. 125-135.

Цитированная литература

Шелудько Н.С. Белковый состав миофибрилл кролика, определенный методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия // Цитология. 1975. Т. 17. С. 1148-1152.

Andruchov O., Andruchova O., Galler S. The catch state of mollusc catch muscle is established during activation: experiments on skinned fibre preparations of the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* using the myosin inhibitors orthovanadate and blebbistatin // J. Exp. Biol. 2006. Vol. 209, № 21. P. 4319-4328.

Butler T.M., Mooers S.U., Li C.Q., Narayan S., Siegman M.J. Regulation of catch muscle by twitchin phosphorylation: Effects on force, ATPase, and shortening // Biophys J. 1998. Vol. 75, № 4. P. 1904-1914.

Butler T.M., Narayan S.R., Mooers S.U., Hartshorne D.J., Siegman M.J. The myosin cross-bridge cycle and its control by twitchin phosphorylation in catch muscle // *Biophys J.* 2001. Vol. 80, № 1. P. 415-426.

Butler T.M., Mooers S.U., Siegman M.J. Catch force links and the low to high force transition of myosin // *Biophys. J.* 2006. Vol. 90, № 9. P. 3193-3202.

Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.* 1925. Vol. 66. P. 375-400.

Franke A.S., Moers S.U., Narayan S.R., Siegman M.J., Butler T.M. Myosin cross-bridge kinetics and the mechanism of catch // *Biophys J.* 2007. Vol. 93, №2. P. 554-565.

Funabara D., Kinoshita S., Watabe S., Siegman M.J., Butler T.M., Hartshorne D.J. Phosphorylation of molluscan twitchin by the cAMP-dependent protein kinase // *Biochemistry USA.* 2001. Vol. 40, №7. P. 2087-2095.

Funabara D., Watabe S., Mooers S.U., Narayan S., Dudas C., Hartshorne D.J., Siegman M.J., Butler, T.M. Twitchin from molluscan catch muscle. Primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 31. P. 29308-29316.

Funabara D., Kanoh S., Siegman M. J., Butler T. M., Hartshorne D. J., Watabe S. Twitchin as a regulator of catch contraction in molluscan smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2005. Vol. 26, № 6-8. P. 455-460.

Funabara D., Hamamoto C., Yamamoto K., Inoue A., Ueda M., Osawa R., Kanoh S., Hartshorne D.J., Suzuki S., Watabe S. Unphosphorylated twitchin forms a complex with actin and myosin that may contribute to tension maintenance in catch // *J. Exp. Biol.* 2007. V. 210. P. 4399-410.

Galler S., Kogler H., Ivemeyer M., Ruegg J.C. Force responses of skinned molluscan catch muscle following photoliberation of ATP // *Pflugers Arch.* 1999. Vol. 438, № 4. P. 525-530.

Hopflinger M.C., Andruchova O., Andruchov O., Grassberger H., Galler S. Effect of pH on the rate of myosin head detachment in molluscan catch muscle: are myosin heads involved in the catch state? // *J. Exp. Biol.* 2006. Vol. 209, № 4. P. 668-676.

Johnson W.H., Kahn J., Szent-Gyorgyi A.G. Paramyosin and contraction of "catch muscles" // *Science.* 1959. Vol. 130. P. 160-161.

Laemmli V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680-685.

Lowy J., Millman B.M., Hanson J. Structure and function in smooth tonic muscles of lamellibranch muscle mollusks // *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 1964. Vol. 160. P. 525-536.

Pollard T.D. Cooper J.A. Methods to characterize actin filament networks // *Methods Enzymol.* 1982. Vol. 85. P. 211-233.

Ruegg J.C. Tropomyosin-paramyosin system and "prolonged contraction" in a molluscan smooth muscle // *Proc. Roy. Soc.* 1964. Vol. 160. P. 536-542.

Ruegg J.C. Smooth muscle tone // *Physiol. Rev.* 1971. Vol. 51, № 1. P. 201-248.

Shelud'ko N.S., Tuturova K.F., Permyakova T.V., Plotnikov S.V., Orlova A.A. A novel thick filament protein in smooth muscles of bivalve molluscs // *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 1999. Vol. 122. P. 277-285.

Shelud'ko N.S., Permyakova T.V., Tuturova K.F., Neverkina O.V., Drozdov A.L. Myorod, a thick filament protein in molluscan smooth muscles: isolation, polymerization and interaction with myosin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2001. Vol. 22. P. 91-100.

Shelud'ko N.S., Kropacheva I.V. Turbidity of myofibril and actomyosin suspensions and its change by ATP // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 179. P. 194-200.

Siegman M.J., Mooers S.U., Li C.Q., Narayan S., Trinklemulcahy L., Watabe S., Hartshorne D. J., Butler T.M. Phosphorylation of a high molecular weight (similar to 600 kDa) protein regulates catch in invertebrate smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1997. Vol. 18, №6. P. 655-670.

Spicer S.S. The clearing response of actomyosin to adenosinetriphosphate // *J. Biol. Chem.* 1952. Vol. 199. P. 289-300.

Sugi H., Iwamoto H., Shimo, M., Shirakawa I. Evidence for load-bearing structures specialized for the catch state in *Mytilus* smooth muscle // *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 1999. Vol. 122, № 3. P. 347-353.

Szent-Gyorgyi A.G., Cohen C., Kendrick-Jones J. Paramyosin and the filaments of molluscan 'catch' muscles; 2. Native filaments: Isolation and characterization // *J. Mol. Biol.* 1971. Vol. 56. P. 239-258.

Takahashi I., Shimada M., Akimoto T., Kishi T., Sugi H. Electron microscopic evidence for the thick filament interconnections associated with the catch state in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis* // *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 2003. Vol. 134, № 1. P. 117-122.

Vibert P., Edelstein S.M., Castellani L., Elliott B.W. Mini-titins in striated and smooth molluscan muscles – structure, location and immunological cross-reactivity // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 1993. Vol. 14, № 6. P. 598-607.

Yamada A., Yoshio M., Kojima H., Oiwa K. An in vitro assay reveals essential protein components for the "catch" state of invertebrate smooth muscle // *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 2001. Vol. 98, № 12. P. 6635-6640.

Yamada A., Yoshio M., Nakamura A., Kohama K., Oiwa K. Protein phosphatase 2B dephosphorylates twitchin, initiating the catch state of invertebrate smooth muscle // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 39. P. 40762-40768.

Галина Геннадьевна МАТУСОВСКАЯ

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТВИТЧИНА ЗАПИРАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ
МОЛЛЮСКОВ С ФИБРИЛЛЯРНЫМ АКТИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук