

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-146

ВЛИЯНИЕ ИЗОФОРМ ТРМ1.8 И ТРМ1.9 АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ТРОПОМИОЗИНА НА СВОЙСТВА АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА***EFFECT OF THE ACTIN-BINDING PROTEIN TROPOMYOSIN ISOFORMS TPM1.8 AND TPM1.9 ON THE PROPERTIES OF THE ACTIN CYTOSKELETON**К. К. Лапшина^{1,2}, В. В. Нефёдова², С. Г. Роман², С. Р. Набиев³, А. М. Матюшенко²¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва³Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, ЕкатеринбургK. K. Lapshina^{1,2}, V. V. Nefedova², S. G. Roman², S. R. Nabiev³, A. M. Matyushenko²¹Department of Biophysics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University²Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow³Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg

✉ lapshina.2003@gmail.com

Аннотация

Перестройка актинового цитоскелета является отличительной чертой раковой трансформации клеток. Мы обратили внимание на актин-связывающие белки Трм1.8 и Трм1.9, чья экспрессия снижается при онкотрансформации. Изучено влияние этих изоформ на свойства актинового филамента. Присутствие Трм1.8 / Трм1.9 приводит к образованию очень жестких и стабильных структур актина, что может предотвращать их разборку и препятствовать онкотрансформации.

Abstract

The reorganization of the actin cytoskeleton is a distinctive feature of cancer cell transformation. We paid attention to the actin-binding proteins Трм1.8 and Трм1.9, which expression decreases during malignant transformation. The effect of these isoforms on the properties of the actin filament has been studied. The presence of Трм1.8 / Трм1.9 leads to the formation of very rigid and stable actin structures, which can prevent their disassembly and transformation.

Тропомиозин (Трм) — это α -спиральный белок, имеющий структуру coiled-coil, который армирует актиновые нити, тем самым влияя на функционирование цитоскелета. Число изоформ Трм в клетках млекопитающих достигает 40 [1]. В рамках проведенного исследования получены цитоплазматические изоформы Трм1.8 и Трм1.9. Их собственные физико-химические свойства, а также свойства актиновых филаментов, декорированных данными изоформами, изучены методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), спектроскопии кругового дихроизма (КД), вискозиметрии, светорассеяния, соосаждения и оптической ловушки.

Для исследования структуры и доменной организации Трм использованы методы ДСК и КД. Подвергая образцы нагреву и наблюдая за содержанием α -спиралей по поглощению при длине волны 222 нм, удалось зафиксировать резкое изменение молярной эллиптичности, что свидетельствует о понижении спиральности и, как следствие, разрушении регулярной структуры белка. На кривых денатурации после взятия первой производной наблюдался ряд переходов на 40 и 60 °С для Трм1.8; 45 и 60 °С для Трм1.9. Для более детального исследования доменной структуры Трм использован метод ДСК. Пик на графике зависимости избыточного теплопоглощения от температуры соответствовал плавлению калориметрического домена — участка в молекуле Трм, который денатурирует независимо от других. Деконволюционный анализ выделил по три домена у каждой из изоформ. Температуры плавления доменов 1 и 2 отличаются между изоформами на 3–5 °С, а калориметрическая энтальпия — в 4,4 и 1,9 раз, соответственно. Такие различия могут быть связаны с вариабельностью в 6-м экзоне, представленным формой 6a в Трм1.9 и 6b — в Трм1.8.

Способность Трм образовывать непрерывный тяж вследствие концевых взаимодействий между соседними молекулами оценена с помощью метода вискозиметрии. При равной концентрации и ионной силе показатель вязкости выше у изоформы Трм1.9. Поскольку изоформы имеют отличия лишь в центральном 6-м экзоне, то можно предположить, что для структуры Трм характерны дальнедействующие эффекты, при которых централь-

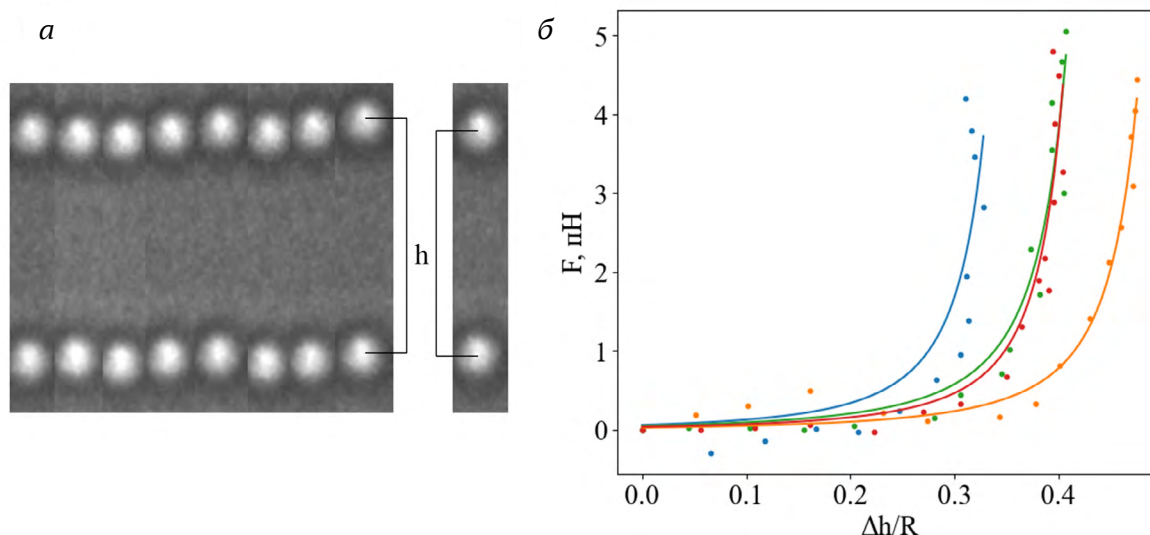
* Работа выполнена при поддержке РФ (проект № 22-74-10106).

© К. К. Лапшина, В. В. Нефёдова, С. Г. Роман, С. Р. Набиев, А. М. Матюшенко, 2024

ная часть молекулы влияет на ее концевые участки. Стоит отметить, что вязкость Трм1.8 / Трм 1.9 оказалось аномально высокой по сравнению с большинством изоформ Трм.

Главным партнером Трм в клетке является F-актин. Для определения сродства данных изоформ Трм к F-актину применен анализ соосаждения этих белков. Значения $K_{50\%}$, соответствующие концентрации Трм, при которой актин наполовину им насыщен, варьировались от $0,3 \pm 0,12$ мкМ для Трм1.8 до $0,79 \pm 0,18$ мкМ для Трм1.9. Стабильность белковых комплексов Трм с F-актином измеряли посредством регистрации светорассеяния при длине волны 350 нм при нагревании с постоянной скоростью. Изоформа Трм1.9 имеет более высокую температуру диссоциации комплекса с F-актином, чем изоформа Трм1.8.

Для того чтобы исследовать свойства комплексов полимерного F-актина, декорированного Трм1.8 и Трм1.9, мы измерили изгибную жесткость таких комплексов с помощью двухлучевой оптической ловушки (см. рисунок, а). Фибриллярный актин и актиновые филаменты, декорированные Трм, растягивали с шагом 5 нм, при этом регистрировали силу и расстояние между шариками (см. рисунок, б). Жесткость тонких нитей, декорированных Трм1.8 и Трм1.9, статистически значимо отличалась от жесткости F-актина. Его изгибная жесткость в комплексе с Трм1.8 и Трм1.9 составила $3,75 \cdot 10^{26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$ (IQR 2,7–5,55; $n = 22$) и $4,8 \cdot 10^{26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$ (IQR 3,87–6,95; $n = 23$) соответственно, в то время как F-актин имеет изгибную жесткость $2,35 \cdot 10^{26} \text{ Н} \cdot \text{м}^2$ (IQR 1,6–5,3; $n = 18$).



Исследование свойств комплексов полимерного F-актина, декорированного Трм1.8 и Трм1.9:
 а — микрофотографии последовательного растяжения «гантели», образованной удерживаемыми в ловушке полистироловыми шариками и тонкой нитью (на фото не изображена), и возвращения ее в исходное состояние;
 б — диаграмма зависимости силы, приложенной к концу «гантели», от безразмерного растяжения, где Δh — изменение расстояния между шариками, а $R = 450$ нм — радиус шарика. Разными цветами обозначены четыре растяжения из серии экспериментов для F-актина, декорированного Трм1.9. Для расчетов использовали ранее предложенную математическую модель [2]

По-видимому, высокое сродство изоформ Трм1.8 и 1.9 к F-актину и образование жестких нитей актина, декорированного этими изоформами, коррелирует с присутствием Трм1.8 и Трм1.9 в стабильных клеточных структурах.

Литература

1. Geeves M.A., Hitchcock-DeGregori S.E., Gunning P.W. A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms // Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2015. Vol. 36. P. 147–155.
2. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V. et al. Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament // Biophysical Journal. 2015. Vol. 109. P. 373–379.