

УДК 577.353

ОСОБЕННОСТИ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ ГЛАДКОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА И СКЕЛЕТНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С

© 2023 г. Л.Г. Бобылёва*, М.А. Тимченко*, Э.И. Якупова**,
И.М. Вихлянец*, ***, А.Г. Бобылёв*

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

**Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119234, Россия

***Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета,
ул. Карла Маркса, 76, Казань, 420015, Россия

E-mail: bobylev1982@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 07.04.2023 г.

Принята к публикации 19.04.2023 г.

Белковые олигомеры являются важными промежуточными звеньями на пути образования амилоидных фибрилл. При амилоидозах, например, болезни Альцгеймера, олигомеры способны оказывать токсическое действие на клетки. В данной работе описаны отличительные особенности олигомеризации мультидоменных мышечных белков – гладкомышечного титина и миозин-связывающего белка С (С-белка) скелетных мышц, состоящих из FnIII-подобных и IgC2-подобных доменов и способных формировать амилоидные аморфные агрегаты *in vitro*. С-белок в условиях низкой ионной силы (ниже физиологических значений) формировал стабильные олигомеры, не участвующие в дальнейшей агрегации. Титин гладких мышц формировал олигомеры в условиях высокой ионной силы ($\mu \sim 0.6$), которые являлись предшественниками амилоидных аморфных агрегатов этого белка. Полученные результаты расширяют представления о процессе белковой агрегации.

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

DOI: 10.31857/S0006302923030055, EDN: FQJHUE

Процесс агрегации белка – это сложный и малоизученный процесс, который происходит в клетках живых организмов вследствие множества причин и связан либо с развитием патологических изменений, либо с выполнением определенных функций [1]. На одной из стадий амилоидной агрегации происходит образование олигомеров – надмолекулярных структур, состоящих из нескольких нековалентно-связанных молекул белка. Олигомеры представлены широким спектром морфологического разнообразия [2–4] и являются важными промежуточными продуктами процесса формирования фибриллярных агрегатов, как показано для различных амилоидогенных белков [5–8]. Известно, что олигомеры амилоидных белков обладают более выраженными цитотоксическими свойствами, чем их фибриллы, образующиеся, в частности, при таких заболеваниях как болезнь Альцгеймера и Паркинсона

[9–14]. Вследствие этого олигомеры являются перспективным объектом исследования с целью разработки лекарственных препаратов для лечения амилоидозов.

Известно, что помимо амилоидных фибрилл белки могут образовывать другие типы агрегатов, например, растворимые олигомеры и аморфные агрегаты. Имеется мнение, что амилоидными могут быть только фибриллы, в то время как аморфные агрегаты имеют неамилоидную природу, однако это спорная точка зрения. Аморфные агрегаты обычно образуются за более короткие промежутки времени, чем фибриллы. Для их образования не требуется какой-то особой укладки (конформации) белковой молекулы. Многие белки с неупорядоченной структурой, а также частично развернутые белки формируют аморфные агрегаты. Для образования упорядоченных фибрилл, как известно, необходимы особые условия,

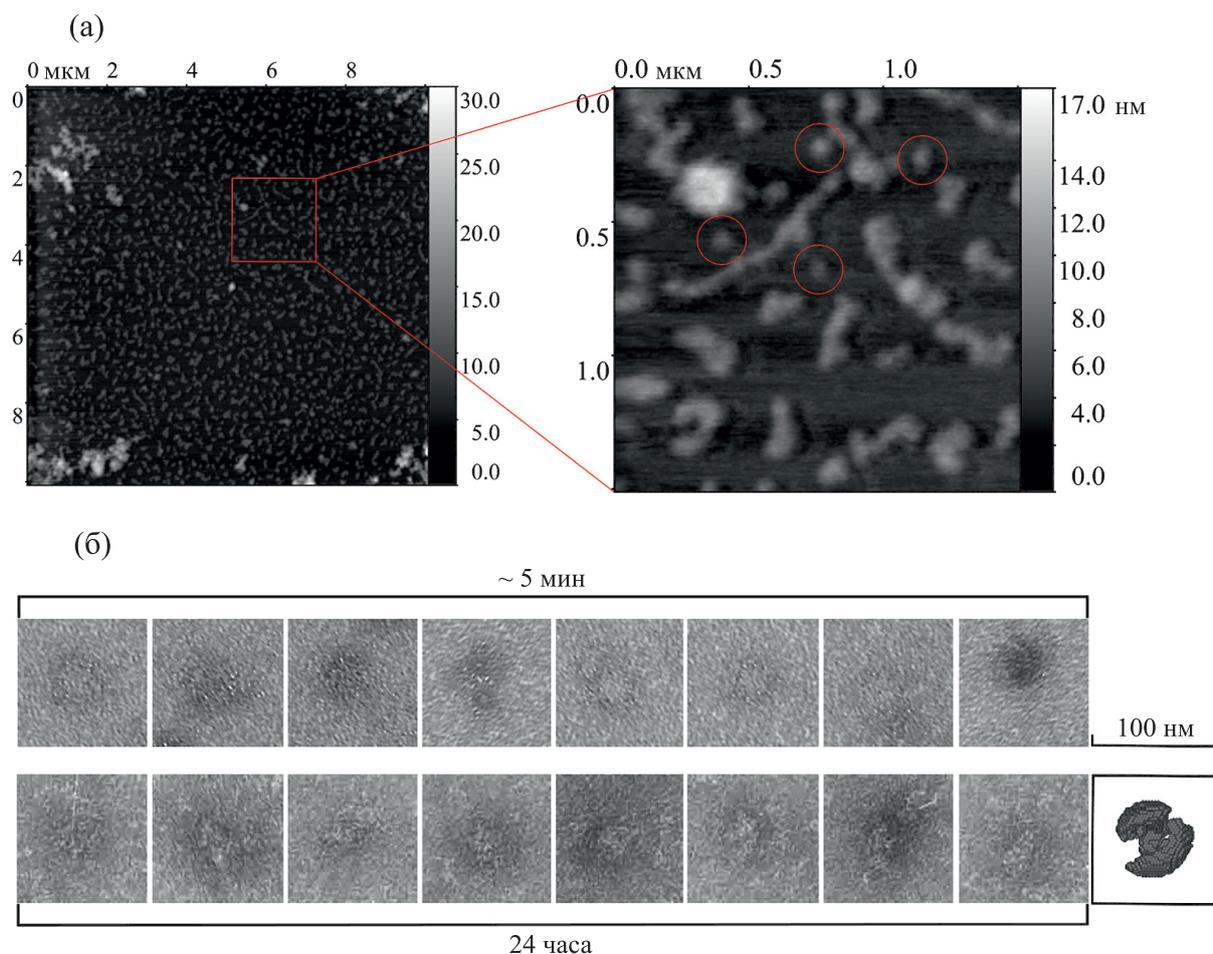


Рис. 1. Атомно-силовая микроскопия и электронная микроскопия олигомеров С-белка. (а) – Атомно-силовая микроскопия аморфных агрегатов и олигомеров С-белка, сформированных в течение 24 ч. Отдельно лежащие олигомеры показаны в светлых кругах. (б) – Электронная микроскопия олигомеров С-белка, сформированных в течение ~5 мин и 24 ч. Справа внизу приведена для сравнения смоделированная структура олигомера С-белка, полученная с помощью программы DAMMIF на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния [19]. Размер одного квадрата 100×100 нм. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–КОН, рН 7.0, 4°C.

способствующие формированию специфической укладки в амилоидную структуру. Данная специфическая укладка может появляться уже на стадии формирования растворимых олигомеров [15].

Исследуемые нами титин и С-белок формируют амилоидные аморфные агрегаты [16–20]. Этот результат расходится с общепринятой научной точкой зрения, заключающейся в том, что амилоидными могут быть только высокоупорядоченные фибриллы. Таким образом, амилоидные свойства аморфных агрегатов титина и С-белка являются особенностью этих мышечных белков. Поэтому процесс олигомеризации у исследуемых белков представляет фундаментальный интерес.

Анализ проведенных нами исследований показал, что С-белок после образования крупных

аморфных агрегатов в течение первых пяти минут агрегации формирует ряд стабильных олигомеров, претерпевающих незначительный рост в течение последующих 16–24 часов агрегации [19]. На рис. 1 представлены данные атомно-силовой и электронной микроскопии, на которых показаны преимущественно олигомеры С-белка, имеющие сферическую форму с диаметром 30–50 нм и высотой 10 нм, сформированные в течение 5 мин и 24 ч агрегации. Примечательно, что смоделированная трехмерная структура олигомеров С-белка, полученная на основе данных малоуглового рентгеновского рассеяния, также близка к сферической (рис. 1б) [19]. Таким образом, данные визуальных методов анализа, а также данные, полученные с помощью динамического светорассея-

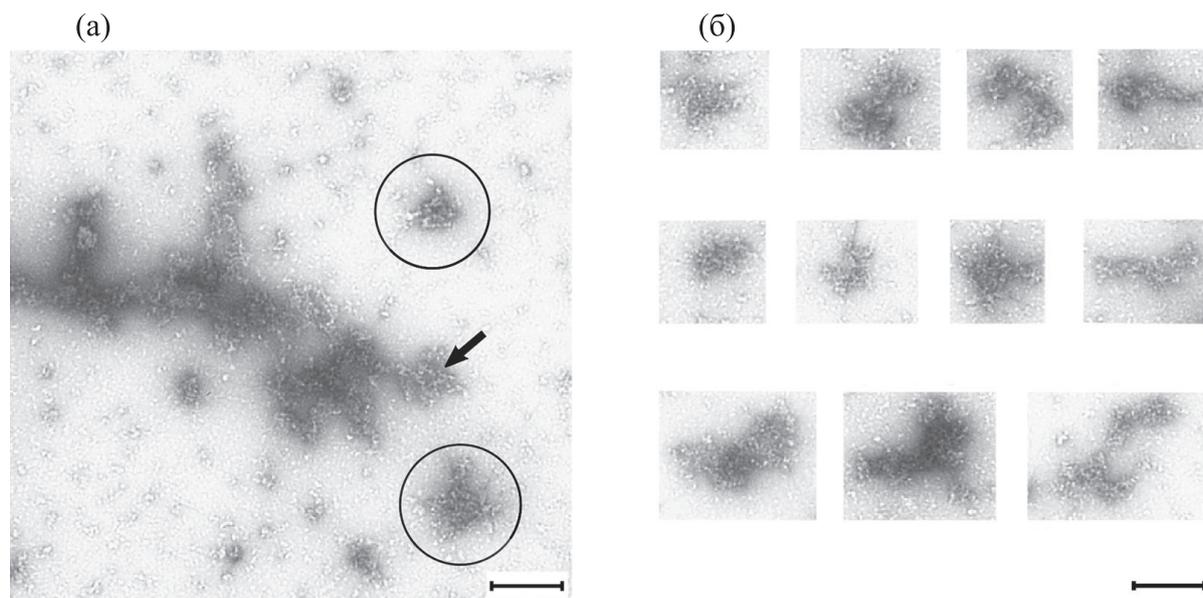


Рис. 2. (а) – Электронная микроскопия аморфных агрегатов и олигомеров гладкомышечного титина, сформированных в течение трех часов. Отдельно лежащие олигомеры показаны в черных кругах. (б) – Электронная микроскопия олигомеров гладкомышечного титина. Условия формирования агрегатов: 0.15 М глицин–KOH, pH 7.0, 4°C. Шкала 500 нм.

ния и показывающие появление олигомеров С-белка через 5 мин агрегации и незначительный их рост впоследствии [19], могут указывать на то, что олигомеры С-белка являются стабильными и не участвуют в образовании крупных агрегатов или фибрилл.

Согласно известной модели [15], на начальных этапах фибриллообразования мономерный амилоидогенный белок может образовывать одновременно несколько типов олигомерных форм с различной внутренней конформацией. Разные типы олигомеров могут давать начало более крупным агрегатам различной структуры, как фибриллярным, так и аморфным, либо представлять собой относительно стабильные структуры, не запускающие дальнейшую агрегацию [15]. К таким относятся олигомеры С-белка. По результатам динамического светорассеяния количество мономеров С-белка в олигомере составляет 10–12; по данным малоуглового рентгеновского рассеяния молекулярная масса олигомера составляет 900 ± 60 кДа, а радиус гирации – 86 ± 4 Å [19].

Примечательно, что характеристики, полученные для олигомеров С-белка, близки к таковым для олигомеров белка γ В-1 [21–23]. Учитывая большую разницу в структуре между γ В-1 и С-белком, можно предположить, что способность формировать олигомеры со схожими характери-

ками (формой, размером) является признаком того, что существует общий механизм, по которому образуются олигомеры независимо от белка-предшественника.

Отдельного внимания заслуживает анализ структуры олигомеров титина. Способность этого белка формировать олигомеры была впервые показана в 2003 г. [24]. С помощью атомно-силовой микроскопии было обнаружено, что молекулы титина, выделенные из скелетных мышц кролика, при снижении ионной силы раствора (с 0.6 М до 0.2 М KCl) в течение 10 мин формировали олигомеры [24]. При этом авторы наблюдали присутствие как отдельно лежащих молекул титина, так и его олигомеров разного порядка – димеров, тримеров, тетрамеров и структур более высокого порядка. Мономеры в олигомерах титина взаимодействовали друг с другом глобулярными образованиями – головками, формируя уплотнение в центре олигомера [24]. Подобные олигомеры, по нашим данным, формирует и гладкомышечный титин [20]. Однако, в отличие от титина поперечно-полосатых мышц, гладкомышечный титин формировал олигомеры в условиях более высокой ионной силы (~ 0.6). т.е. для олигомеризации гладкомышечного титина не требовалось снижать ионную силу раствора, как это было необходимо в случае с титином поперечно-полоса-

тых мышц [24]. При снижении ионной силы олигомеры гладкомышечного титина, имеющие диаметр ~500 нм, формировали более крупные аморфные агрегаты (рис. 2).

На рис. 2а можно наблюдать крупный агрегат, отдельно лежащие олигомеры (черные круги) и множество более мелких частиц, предположительно мономеров белка. При этом видно, что крупный аморфный агрегат состоит из отдельных олигомеров (рис 2а, стрелка). Полученные данные указывают на то, что укрупнение и рост агрегатов гладкомышечного титина происходит за счет олигомеров этого белка.

Итак, оба исследованных нами белка формируют олигомеры. Однако С-белок при снижении ионной силы формирует группу стабильных олигомеров, которые не участвуют в дальнейшей его агрегации. Нельзя исключить, что формирование подобных стабильных олигомеров свидетельствует о некоем адаптивном механизме, созданном природой, предотвращающим дальнейшую агрегацию С-белка в клетках, которая могла бы приводить к негативным последствиям. Гладкомышечный титин, в отличие от С-белка, формирует олигомеры в условиях высокой ионной силы, демонстрируя этим высокую склонность к ассоциации. При понижении ионной силы олигомеры гладкомышечного титина формируют крупные аморфные агрегаты, которые способны дезагрегировать при повышении ионной силы [17, 20]. Подобные свойства титина, возможно, являются отражением какой-либо функциональной роли его олигомеров или агрегатов, образующихся в гладкомышечных клетках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-24-00805 (задача, касающаяся выделения и подбора условий для агрегации С-белка).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, S. A. Shumeyko, et al., *Biology (Basel)*, **10** (5), 394 (2021)
2. M. Ahmed, J. Davis, D. Aucoin, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 561 (2010).
3. H. A. Lashuel, D. Hartley, B. M. Petre, et al., *Nature*, **418**, 291 (2002).
4. H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, and E. Masliah, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 38 (2013).
5. P. Narayan, A. Orte, R. W. Clarke, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 79 (2011).
6. N. Cremades, S. I. Cohen, E. Deas, et al., *Cell*, **149**, 1048 (2012).
7. S. L. Shammass, G. A. Garcia, S. Kumar, et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7025 (2015).
8. J. Yang, A. J. Dear, T. C. T. Michaels, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 2493 (2018).
9. B. Winner, R. Jappelli, S. K. Maji, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4194 (2011).
10. M. J. Guerrero-Muñoz, D. L. Castillo-Carranza, S. Krishnamurthy, et al., *Neurobiol. Dis.*, **71**, 14 (2014).
11. K. A. Conway, S. J. Lee, J. C. Rochet, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 571 (2000).
12. J. P. Cleary, D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, et al., *Nat. Neurosci.*, **8**, 79 (2005).
13. F. Chiti and C. M. Dobson, *Biochemistry*, **86**, 27 (2017).
14. M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti, et al., *Nature*, **416**, 507 (2002).
15. V. N. Uversky *FEBS J.*, **277**, 2940 (2010).
16. A. G. Bobylev, O. V. Galzitskaya, R. S. Fadeev, et al., *Biosci. Rep.*, **36** (3), e00334 (2016).
17. E. I. Yakupova, I. M. Vikhlyantsev, L. G. Bobyleva, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36** (9), 2237 (2018).
18. A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, L. G. Bobyleva, et al., *Mol Biol. (Moscow)*, **54** (4), 643 (2020).
19. L. G. Bobyleva, S. A. Shumeyko, E. I. Yakupova, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 731 (2021).
20. A. G. Bobylev, E. I. Yakupova, and L. G. Bobyleva, *Int J Mol Sci.*, **24** (2), 1056. (2023).
21. V. M. Evdokimova, C. L. Wei, A. S. Sitikov, et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 3186 (1995).
22. S. R. Tafuri and A. P. Wolffe, *New Biol.*, **4**, 349 (1992).
23. M. A. Skabkin, O. I. Kiselyova, K. G. Chernov, et al., *Nucl. Acids Res.*, **32**, 5621 (2004).
24. M. S. Kellermayer, C. Bustamante, and H. L. Granzier, *Biochim. Biophys. Acta*, **1604** (2), 105 (2003).
25. S. Kumar and J. Walter, *Aging (Albany NY)*, **3** (8), 803 (2011).

Peculiarities of Oligomerization of Smooth Muscle Titin and Skeletal Myosin-Binding Protein C

L.G. Bobyleva*, M.A. Timchenko*, E.I. Yakupova**, I.M. Vikhlyantsev*, ***, and A.G. Bobylev*

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

***Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, Moscow, 119234 Russia*

****Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420015 Russia*

Protein oligomers are important intermediates in the formation of amyloid fibrils. In amyloidoses, for instance, in Alzheimer's disease, oligomers are able to exert toxic effects on cells. This paper describes the distinctive features of oligomerization of multidomain muscle proteins such as smooth muscle titin and myosin-binding protein C (MyBP-C) of skeletal muscles, which consist of FnIII-like and IgC2-like domains and form amorphous amyloid aggregates *in vitro*. MyBP-C at low ionic strength (below physiological values) formed stable oligomers that did not participate in further aggregation. In high ionic strength conditions ($\mu \sim 0.6$), smooth muscle titin formed oligomers, which were precursors of amyloid amorphous aggregates of this protein. The results obtained help expand existing knowledge about the process of protein aggregation.

Keywords: multidomain muscle proteins, myosin-binding protein C, titin, aggregation, amyloids, oligomerization, oligomers