

Н-ТЕРМИНАЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ СЕРДЕЧНОГО МИОЗИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С МОДУЛИРУЕТ КООПЕРАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТОНКОЙ НИТИ ПРЕДСЕРДИЙ И ЖЕЛУДОЧКОВ

© 2024 А.М. Кочурова¹, Е.А. Бельдия^{1,2}, В.В. Нефёдова³, Н.С. Рябкова^{4,5},
Д.С. Ямпольская³, А.М. Матюшенко³, С.Ю. Бершицкий¹,
Г.В. Копылова¹, Д.В. Щепкин^{1*}

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
620049 Екатеринбург, Россия; электронная почта: dvshcherkin@gmail.com

² УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 620002 Екатеринбург, Россия

³ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биохимии, 119234 Москва, Россия

⁵ ООО «Хайтест», 20520 Турку, Финляндия

Поступила в редакцию 16.11.2023

После доработки 09.12.2023

Принята к публикации 11.12.2023

Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) – один из важных элементов контроля цикла миозинового мостика. С-Терминальная часть сМуВР-С располагается на поверхности толстой нити, а N-концевая часть сМуВР-С взаимодействует с актином, миозином и тропомиозином, влияя как на кинетику цикла гидролиза АТФ и время жизни поперечного мостика, так и на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия, модулируя тем самым сократительную функцию миокарда. Роль сМуВР-С в сокращении предсердий практически не изучена. Мы исследовали влияние N-терминального C0-C1-m-C2 (C0-C2) фрагмента сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие, используя предсердный и желудочковый миозин в *in vitro* подвижной системе. Фрагмент C0-C2 сМуВР-С существенно снижал максимальную скорость скольжения тонких нитей по обоим изоформам миозина и увеличивал кальциевую чувствительность актин-миозинового взаимодействия. Фрагмент C0-C2 по-разному влиял на кинетику обмена нуклеотидов, АТФ и АДФ, увеличивая аффинность желудочкового миозина к АДФ и уменьшая аффинность предсердного миозина. Влияние фрагмента C0-C2 на активацию тонкой нити зависело от изоформ миозина. Предсердный миозин слабее активирует тонкую нить, чем желудочковый, а фрагмент C0-C2 делает эти различия изоформ миозина более выраженными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сердечный миозин-связывающий белок С, миокард, предсердный и желудочковый миозин, сердечная мышца, регуляторные белки, актин-миозиновое взаимодействие, кальциевая регуляция, активация тонкой нити, *in vitro* подвижная система.

DOI: 10.31857/S0320972524010076 EDN: YRFXII

ВВЕДЕНИЕ

Сердечный миозин-связывающий белок С (сМуВР-С) – белок саркомера кардиомиоцита, который модулирует актин-миозиновое взаимо-

действие, влияя на характеристики сокращения сердца. сМуВР-С определяет скорости сокращения и расслабления миокарда [1–4]. Молекула сМуВР-С имеет массу ~140 кДа и состоит из восьми иммуноглобулиновых и трех фибронектиновых доменов,

Принятые сокращения: ИПС – *in vitro* подвижная система; ТЦМ – тяжёлые цепи миозина; сМуВР-С – сердечный миозин-связывающий белок С; RLC – регуляторные лёгкие цепи миозина; S1 и S2 – субфрагменты 1 и 2 миозина; Тп – тропониновый комплекс; Трпм – тропомиозин.

* Адресат для корреспонденции.

обозначаемых от C0 до C10, начиная с *N*-конца. Между доменами C1 и C2 находится *m*-мотив, содержащий сайты фосфорилирования [5–7]. *N*-Терминальная часть сМуВР-С взаимодействует как с субфрагментами 1 и 2 (S1 и S2) миозина, так и с актином и тропомиозином, а также с белками, обеспечивающими стабильность и функционирование саркомера [8–16]. Домены C5–C10 сМуВР-С продольно располагаются на стволе толстой нити, взаимодействуя с лёгким меромиозином сердечного миозина [8, 10]. Согласно данным криоэлектронной микроскопии и термофореза, центральные домены сМуВР-С могут взаимодействовать с фрагментами S1 и S2 сердечного миозина [17, 18]. Благодаря линкерному участку между доменами C4 и C5 белок способен изгибаться под прямым углом, и его *N*-терминальная часть направляется к тонкой нити саркомера [8, 19].

Фрагмент C1-*m*-C2 связывает S2 миозина, а фосфорилирование в *m*-мотиве приводит к диссоциации фрагмента C1-*m*-C2, что влияет на количество головок миозина, которые могут взаимодействовать с поверхностью F-актина [6, 20–23]. Связываясь с актином, фрагмент C0-C1-*m*-C2 сМуВР-С способен активировать тонкую нить, смещая тропомиозин из блокирующей, или закрытой, позиции в открытую, способствуя взаимодействию миозина с актином [24–27]. *N*-Терминальная часть сМуВР-С увеличивает скорость циклирования поперечного мостика миозина при субмаксимальных концентрациях кальция и кальциевую чувствительность силы, развиваемой изолированными препаратами миокарда [28–30]. Показано также увеличение кальциевой чувствительности актин-миозинового взаимодействия в присутствии сМуВР-С при использовании изолированных белков в *in vitro* подвижной системе (ИПС) [26, 27, 31–34].

Несмотря на интенсивные исследования, механизм, регулирующий взаимодействие *N*-терминальной части сМуВР-С с миозином и тонкой нитью, до конца не ясен. Показано, что во время диастолы в кардиомиоцитах одна популяция молекул сМуВР-С своей *N*-терминальной частью взаимодействует с тонкой нитью, другая популяция – с толстой нитью, а фосфорилирование *m*-мотива ведёт к диссоциации сМуВР-С от тонкой нити [35]. Кроме того, сМуВР-С влияет на количество поперечных мостиков, а также на кинетику прикрепления/открепления головки миозина от актина [36–39]. На нокаутных по гену *MYBPC3* мышах, а также мышах с экспрессией укороченной формы сМуВР-С показано, что отсутствие сМуВР-С ускоряет высвобождение фосфата и ADP, тем самым ускоряя кинетику открепления поперечного мостика [40–42]. Кинетика открепления поперечных мостиков определяет их количество в прикрепленном состоянии, что влияет на активацию

тонких нитей через механизмы кооперативности кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия [43, 44].

Обнаружено, что эффект сМуВР-С на кинетику поперечного мостика зависит от изоформ миозина. Tanner et al. [41] показали, что сМуВР-С не оказывает влияния на выход ADP из АТРазного кармана миозина и кинетику открепления поперечного мостика у мышей, экспрессирующих α -изоформу тяжёлых цепей миозина (ТЦМ) в миокарде. У мышей с экспрессией β -ТЦМ сМуВР-С замедлял выход ADP, кинетику открепления и время жизни поперечного мостика в миокарде левого желудочка.

сМуВР-С экспрессируется не только в желудочках, но и в предсердиях, одной из важных функций которых является наполнение желудочков кровью. Сокращения предсердий обеспечивают в среднем 18–20% ударного объёма крови [45]. В предсердиях и желудочках млекопитающих и человека соотношение α - и β -ТЦМ различно. Предсердный миозин отличается от желудочкового изоформами существенных (ELC) и регуляторных лёгких цепей (RLC) [46]. Из-за различий изоформного состава предсердный миозин отличается от желудочкового функциональными свойствами, в том числе способностью активировать тонкую нить [47–50].

Роль сМуВР-С в сокращении предсердий практически не исследована. На мышах, нокаутных по гену *MYBPC3*, обнаружено, что отсутствие сМуВР-С уменьшает кальциевую чувствительность зависимости *p*Ca-сила предсердных кардиомиоцитов [51]. В ряде работ было показано, что при патологиях миокарда может наблюдаться как снижение, так и увеличение степени фосфорилирования сМуВР-С в предсердиях [52–54].

Целью работы было исследование влияния *N*-терминального фрагмента C0-C1-*m*-C2 (C0-C2) сМуВР-С на актин-миозиновое взаимодействие в *in vitro* подвижной системе. Мы сравнили эффект фрагмента C0-C2 на активацию тонких нитей с предсердным и желудочковым миозином, а также на кинетику обмена нуклеотидов – АТФ и ADP – обеих изоформ миозина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Синтез полной кодирующей последовательности сМуВР-С человека (UniProt Q14896; MYPC3_HUMAN) был выполнен компанией «Евроген» (Россия). На базе этой последовательности был получен молекулярно-генетический конструктор C0-C2 (1–455 а.о.), для получения которого были использованы праймеры, представленные в табл. 1.

Молекулярно-генетический конструктор C0-C2 был получен с помощью метода ПЦР с использо-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для получения молекулярно-генетической конструкции фрагмента C0-C2 сMyBP-C

Название праймера	Последовательность праймера (5'→3')
сMyBPC (C0) fw	GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCT
сMyBPC (C2) rev	TCAGTGATGGTGATGGTGATGCGGGCCCTGAAACAGCACTTCCAGGGGCTCTTTCACAAAGAGCTCCGT

ванием соответствующих пар праймеров (табл. 1) в амплификаторе Mastercycler («Eppendorf», Германия). Полученный ДНК-фрагмент был клонирован в плазмиду pet23a' между сайтами распознавания эндонуклеаз рестрикции NdeI и EcoRI. Кодированная последовательность С-конца сMyBP-C была фланкирована His-tag из шести гистидинов и сайтом распознавания вирусной протеазы 3С. Корректность последовательности молекулярно-генетической конструкции была подтверждена секвенированием в компании «Евроген».

Рекомбинантный C0-C2-фрагмент сMyBP-C был экспрессирован в клетках *Escherichia coli* штамма C41(DE3). Для этого одиночные колонии, полученные после химической трансформации целевого конструкта, инокулировали в 15–20 мл стерильной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и оставляли на ночь на шейкере при 37 °С и 250 об./мин. Затем 15–20 мл ночной культуры добавляли в 1 литр среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и оставляли клетки расти на шейкере до поглощения 0,6–0,7 при 600 нм (~2 ч). Индукцию экспрессии производили добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) до конечной концентрации 1 мМ, и инкубировали клетки в течение ночи при 30 °С. После экспрессии клетки собирали центрифугированием при 4000 g на центрифуге Eppendorf 5810R («Eppendorf», Германия) в течение 40 мин при 4 °С. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для хроматографии (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 15 мМ имидазола, 300 мМ NaCl, 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонил фторид), 5 мМ 2-меркаптоэтанола). Клеточные лизаты замораживали при –80 °С до последующей очистки.

При очистке белков осадки клеток размораживали в буфере для хроматографии, после чего суспензию клеток обрабатывали ультразвуком («Sonics & Materials, Inc.», США) в течение 10 мин. Полученный лизат центрифугировали при 25 000 g в течение 40 мин. Супернатант наносили на колонку HisTrap HP («GE HealthCare», Швеция) объемом 5 мл, предварительно уравновешенную 10 объемами (50 мл) буфера для хроматографии. Колонку подключали к хроматографической системе ProStar 3250 («Varian Inc.», Австралия) и промывали при скорости 3 мл/мин в течение 10–20 мин. Элюцию проводили градиентом имидазола (15–500 мМ)

на базе буфера для хроматографии. Фракции, содержащие наибольшее количества белка, объединяли и диализовали против 2 литров 30 мМ Hepes-Na (pH 7,3), 100 мМ NaCl в течение ночи. Концентрацию полученного белка измеряли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции $Abs_{0,1\%} = 0,867$, добавляли ДТТ до 1 мМ и замораживали при –80 °С. Электрофореграмма препарата C0-C2-фрагмента сMyBP-C приведена на рис. 1, а.

Сердечный миозин получали из левого желудочка и левого предсердия свиньи с помощью стандартного метода [55]. Содержание α- и β-ТЦМ определяли с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза по методу Reiser et al. [56]. Гели сканировали на ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»), и процентное содержание α- и β-изоформ ТЦМ определяли по интенсивности белковых полос программой Image Lab 5.2.1 («Bio-Rad»). Предсердный миозин содержал ~100% α-ТЦМ, а желудочковый – ~100% β-ТЦМ (рис. 1, б).

Сердечный тропомиозин (Trpm, Trpm1.1) человека получен, как описано ранее [50]. Рекомбинантный сердечный тропониновый комплекс (Tn) человека, состоящий из TnI, TnT и TnC, был предоставлен компанией «HyTest» (Финляндия; кат. № 8ITCR). Мономерный актин получали стандартным методом из скелетных мышц кролика [57] и полимеризовали в актиновые филаменты (F-актин) добавлением 4 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl. Для экспериментов в ИПС F-актин окрашивали TRITC-фаллоидином («Sigma Chemical Co.», США).

Эксперименты в *in vitro* подвижной системе. Основным методом, использованным в этой работе, было измерение скорости скольжения F-актина и тонких нитей с помощью ИПС. Скорость движения филаментов по миозину представляет собой интегральную характеристику всех процессов, обеспечивающих актин-миозиновое взаимодействие: механику головки миозина, кооперативные механизмы, в том числе цикл гидролиза АТФ. Поэтому измерение параметров движения филаментов позволяет получать разнообразную информацию об этих процессах, варьируя экспериментальные условия.

Эксперименты проводили при 30 °С, как описано ранее [34, 48–50]. Вкратце, сердечный миозин в концентрации 300 мкг/мл (0,65 мкМ) загружали

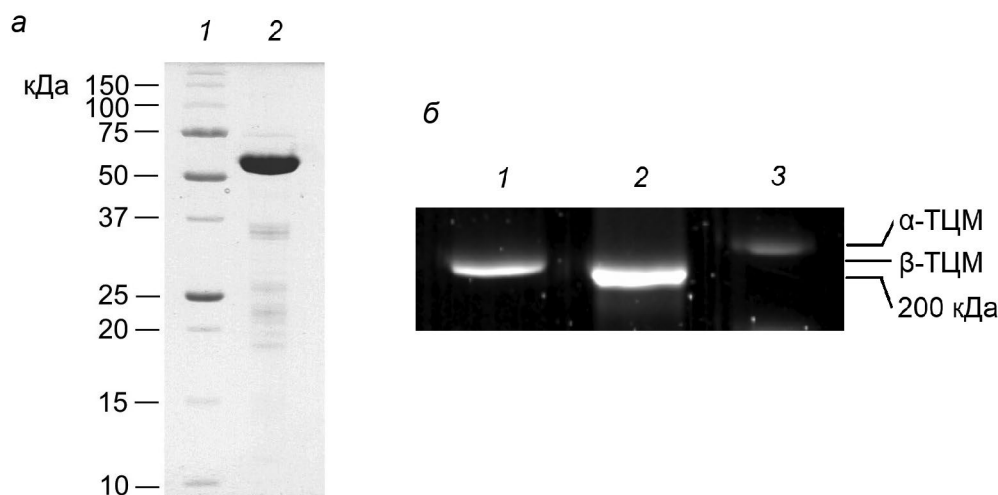


Рис. 1. Электрофореграммы препарата C0-C2-фрагмента сМуВР-С и тяжёлых цепей миозина. *а* – Электрофореграмма препарата C0-C2-фрагмента сМуВР-С: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – препарат фрагмента C0-C2. *б* – Электрофореграмма для определения состава изоформ тяжёлых цепей миозина. ПААГ окрашен SYPRO Ruby («Thermo Fisher Scientific», США). Изображение получено с помощью денситометра GS-800 («Bio-Rad», США). ТЦМ – тяжёлые цепи миозина; 1 – миозин из левого желудочка; 2 – маркер молекулярной массы («Mark12™ Unstained Standard, Invitrogen™», США); 3 – миозин из левого предсердия

в экспериментальную проточную ячейку в АВ-буфере (25 мМ KCl, 25 мМ имидазола, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА и 20 мМ ДТТ; pH 7,5), содержащем 0,5 М KCl. Регулируемые тонкие нити реконструировали в АВ-буфере, добавляя Trm и Tn до конечных концентраций 100 нМ к раствору, содержащему 10 нМ F-актина, меченного TRITC-фаллоидином, и заливали их в проточную ячейку с миозином. Для инициации скольжения тонких нитей в проточную ячейку добавляли финальный АВ-буфер, который содержал 2 мМ АТР, 0,5 мг/мл БСА, 3,5 мг/мл глюкозы, 0,02 мг/мл каталазы, 0,15 мг/мл глюкозо-оксидазы, 0,5% метилцеллюлозы, 100 нМ Trm/Tn и необходимую концентрацию кальция.

Для исследования влияния фрагментов сМуВР-С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия измеряли скорость скольжения тонких филаментов по миозину в ИПС в присутствии 2 мМ АТР при различных концентрациях ионов Ca²⁺ с помощью программы GMimPro [58]. В данном виде эксперимента использовали 500 нМ C0-C2-фрагмента сМуВР-С, который загружали в проточную ячейку в финальном растворе, содержащем АТР и ионы Ca²⁺. Кальциевую зависимость скорости тонких филаментов аппроксимировали уравнением Хилла:

$$V = V_{max} \times (1 + 10^{h(pCa - pCa_{50})})^{-1}, \quad (1)$$

где V и V_{max} – скорость и максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция соответственно; pCa_{50} (кальциевая чувствительность) – концентрация кальция, при которой достигается полумаксимальная

скорость скольжения тонких нитей; h – коэффициент кооперативности Хилла. Скорость скольжения F-актина измеряли в тех же условиях, но при отсутствии Trm, Tn и ионов Ca²⁺.

Влияние фрагмента C0-C2 на мостик-мостиковую кооперативность исследовали по зависимости скорости скольжения тонких нитей от концентрации миозина, загружаемого в проточную ячейку. Эксперименты проводились при насыщающей (pCa 4) и ненасыщающей концентрациях кальция. Так как предсердный миозин имеет более низкую кальциевую чувствительность, чем желудочковый, то значения ненасыщающей концентрации кальция составили pCa 5,5 для предсердного миозина и pCa 6 – для желудочкового. Фрагмент C0-C2 добавлялся в концентрации 500 нМ в буфер, содержащий АТР и соответствующую концентрацию кальция. Определяли концентрация миозина, при которой скорость скольжения тонких нитей достигала половины от своего максимального значения ($S_{миозин}$).

Влияние фрагмента C0-C2 на скорость скольжения F-актина и тонких нитей при насыщающей концентрации кальция (pCa 4) исследовали, добавляя в финальный буфер, содержащий АТР, C0-C2-фрагмент в концентрации 100–2000 нМ. Для каждой концентрации фрагмента загружали отдельную ячейку.

Зависимость скорости скольжения F-актина и тонких нитей при насыщающей концентрации кальция (pCa 4) от концентрации АТР исследовали, измеряя их скорость скольжения при концентрациях АТР в финальном буфере – 0–2 мМ. Эксперименты выполняли без добавления фрагмента C0-C2 и при добавлении 500 нМ

фрагмента C0-C2 в финальный буфер, содержащий АТР. Для каждой концентрации АТР загружали отдельную ячейку.

Влияние ADP на скорость скольжения F-актина и тонких нитей при насыщающей концентрации кальция (pCa 4) исследовали, добавляя в финальный буфер, содержащий 2 мМ АТР, ADP в концентрации 0,05–6 мМ. Для каждой концентрации ADP загружали отдельную ячейку.

Зависимость скорости скольжения F-актина и тонких нитей от концентрации C0-C2-фрагмента сМуВР-С и ADP аппроксимировали логистической функцией:

$$V = (V_1 - V_2) \times (1 + (x/x_0)^3)^{-1} + V_2, \quad (2)$$

где V_1 – минимальное значение скорости, V_2 – максимальное значение скорости, x_0 – значение концентрации фрагмента или ADP, при котором скорость полумаксимальная.

Каждый эксперимент повторяли трижды (каждый раз – с заново приготовленным миозином), и полученные значения скоростей скольжения тонких нитей и F-актина выражали как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Анализ данных и статистический анализ проводили с использованием Excel 16 («Microsoft Corp.», США) и Origin 8.0 («Origin Lab», США). Статистический анализ проводили с использованием t -критерия Стьюдента или Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние C0-C2 N-терминального фрагмента сМуВР-С на скорость скольжения F-актина

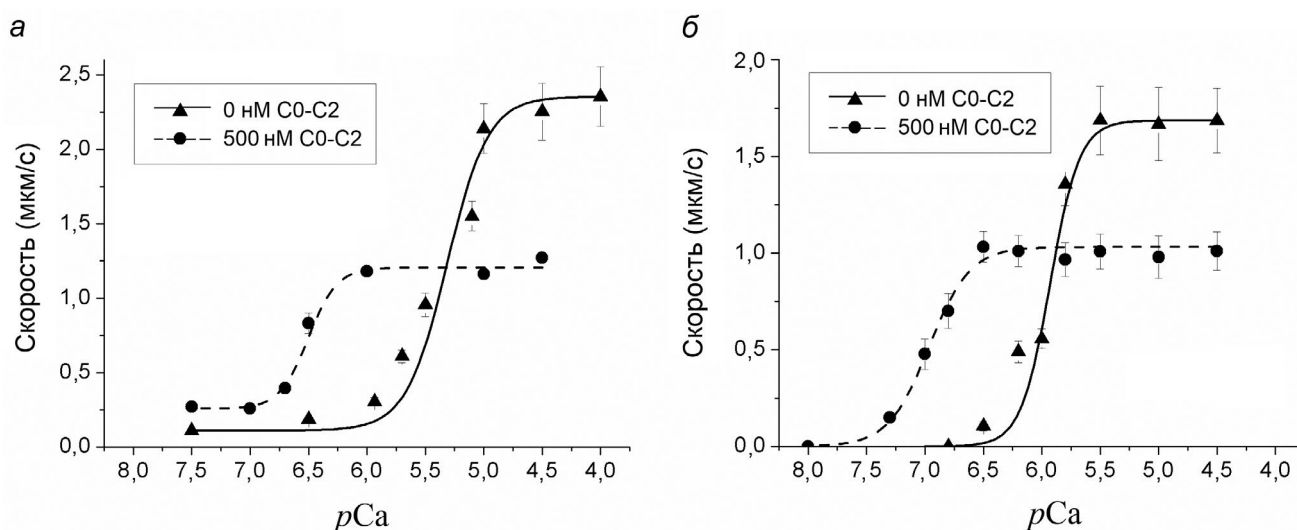


Рис. 2. Влияние 500 нМ C0-C2-фрагмента сМуВР-С на Ca^{2+} -зависимость скорости скольжения тонких нитей по предсердному (а) и желудочковому (б) миозину в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1), параметры уравнения приведены в табл. 2

и тонких нитей по миозину в ИПС. Фрагмент C0-C2 дозозависимым образом снижал скорость скольжения F-актина и регулируемых тонких нитей по обоим изоформам миозина. Двукратное снижение скорости (полученное как среднее значение между максимальным и минимальным) как F-актина, так и тонких нитей достигалось при фактически одинаковых концентрациях фрагмента C0-C2. Концентрации фрагмента, в 2 раза снижающие скорость F-актина, были 358 ± 7 нМ и 354 ± 9 нМ с предсердным и желудочковым миозином соответственно; эти значения для тонких нитей составили 328 ± 31 нМ и 430 ± 73 нМ.

Влияние N-терминального C0-C2-фрагмента сМуВР-С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия. Мы сравнили кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей – pCa -скорость – по предсердному и желудочковому миозину в ИПС. С желудочковым миозином фрагмент C0-C2 на 30% снижал максимальную скорость тонких нитей, увеличивал её Ca^{2+} -чувствительность и уменьшал коэффициент Хилла зависимости pCa -скорость, что согласуется с ранее полученными данными [26, 33, 34] (рис. 2; табл. 2). С предсердным миозином фрагмент C0-C2 уменьшал максимальную скорость скольжения нитей на 50%, существенно увеличивал её Ca^{2+} -чувствительность и не влиял на коэффициент Хилла (рис. 2; табл. 2).

В кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия участвуют механизмы кооперативности, одним из которых является мостик-мостиковая кооперативность. Суть её заключается в том, что присоединение поперечного мостика в одной регуляторной группе, состоящей из семи мономеров актина, Тpm и Тn-комплекса, делает

Таблица 2. Параметры Ca^{2+} -зависимости скорости скольжения тонких нитей по предсердному и желудочковому миозину в *in vitro* подвижной системе

Миозин	Концентрация фрагмента C0-C2, нМ	$V_{\max}$, мкм/с	h	$p\text{Ca}_{50}$
Предсердный миозин	0	$2,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$5,31 \pm 0,01$
	500	$1,2 \pm 0,1^*$	$1,7 \pm 0,2$	$6,50 \pm 0,02^*$
Желудочковый миозин	0	$1,7 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$	$5,93 \pm 0,01$
	500	$1,0 \pm 0,1^*$	$1,4 \pm 0,2^*$	$6,96 \pm 0,01^*$

Примечание. $V_{\max}$ – максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция; h – коэффициент кооперативности Хилла; $p\text{Ca}_{50}$ (кальциевая чувствительность) – значение концентрации кальция, при которой скорость нитей достигает полумаксимального значения. Символ * указывает на значимое отличие параметров уравнения Хилла (1) в присутствии фрагмента C0-C2 от таковых без его добавления ($p < 0,05$).

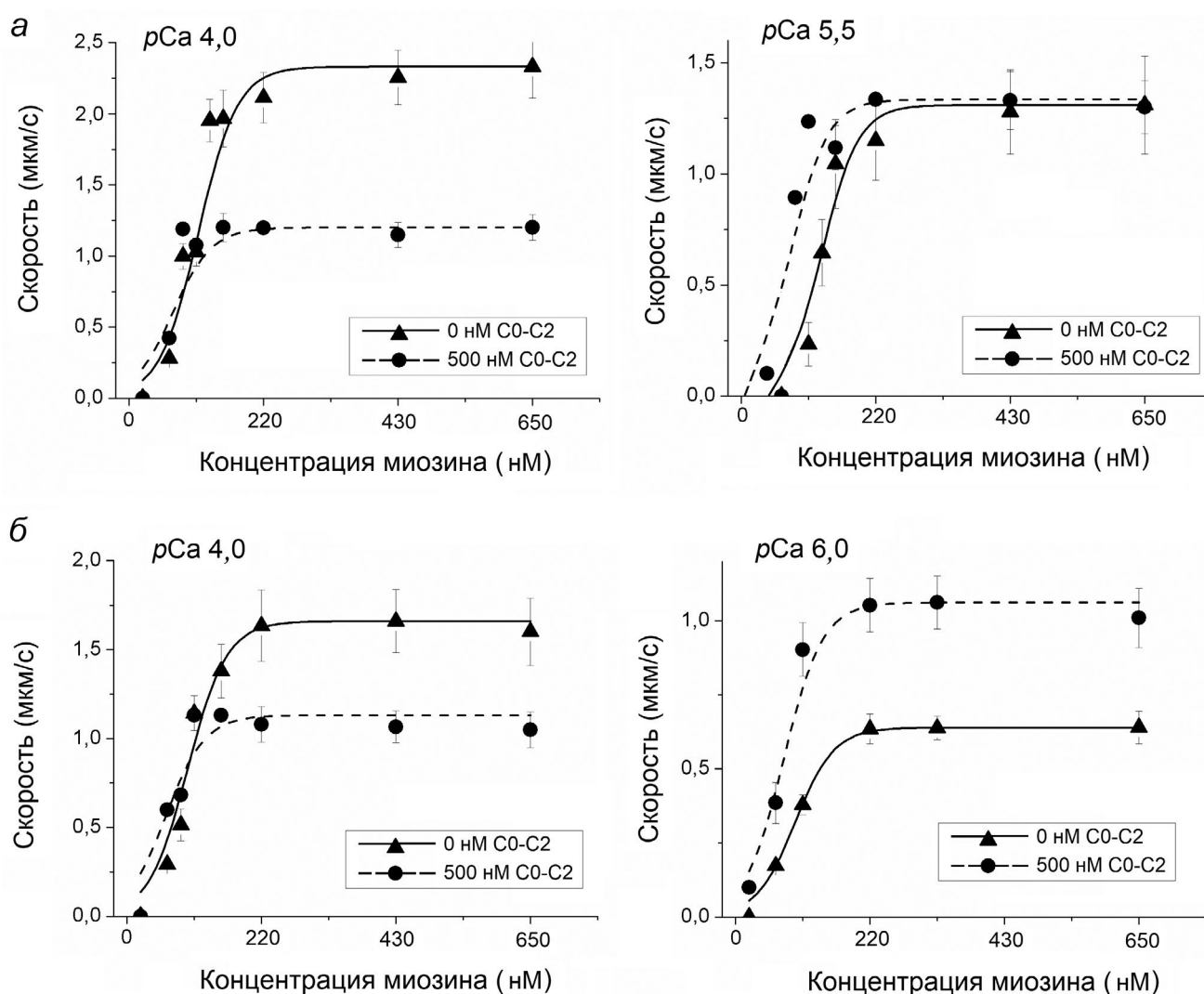


Рис. 3. Влияние C0-C2-фрагмента сМуВР-С на зависимость скорости скольжения тонких нитей от концентрации предсердного (а) и желудочкового (б) миозина в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные значения скоростей (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1). Концентрации миозина, при которых скорость нитей уменьшалась вдвое ($S_{\text{миозин}}$), для желудочкового миозина при $p\text{Ca} 4$ были равны $97,0 \pm 1,5$ нМ и $62,4 \pm 1,2^*$ нМ без фрагмента C0-C2 и при его добавлении соответственно; при $p\text{Ca} 6$ эти значения были $95,4 \pm 0,6$ нМ и $76,7 \pm 1,4^*$ нМ. Для предсердного миозина значения $S_{\text{миозин}}$ при $p\text{Ca} 4$ были равны $111,2 \pm 1,2$ нМ и $67,6 \pm 1,3^*$ нМ; при $p\text{Ca} 5,5$ – $121,6 \pm 1,3$ нМ и $37,5 \pm 0,5^*$ нМ. Символом * обозначено значимое отличие величины $S_{\text{миозин}}$ в присутствии фрагмента C0-C2 от такового при его отсутствии ($p < 0,05$)

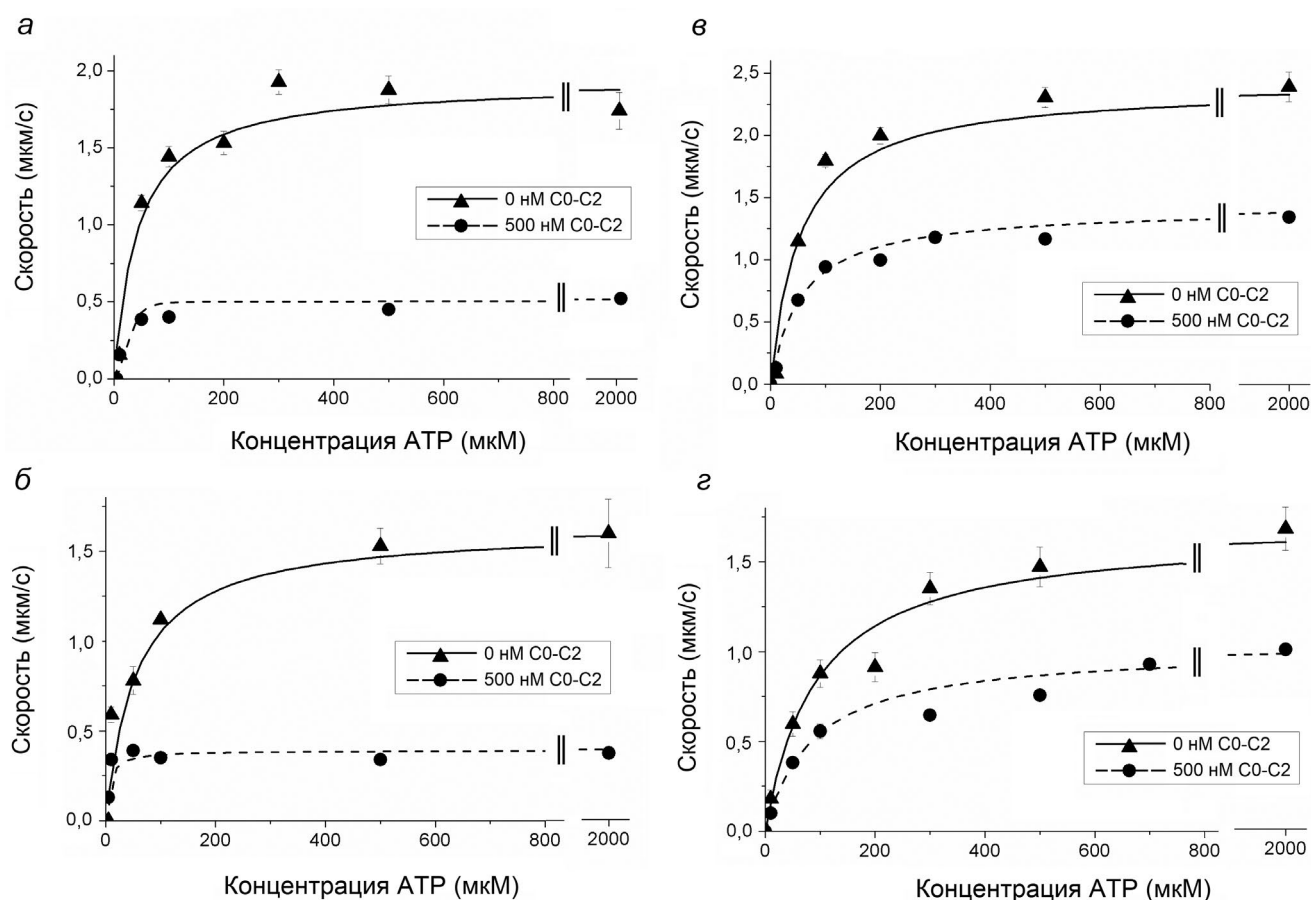


Рис. 4. Влияние C0-C2-фрагмента сМуВР-С на зависимость скорости скольжения F-актина (а и б) и регулируемых тонких нитей при pCa 4 (в и г) по предсердному (а, в) и желудочковому (б, г) миозину от концентрации АТР в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1). Значения S_{ATP} для зависимости скорости скольжения F-актина от концентрации АТР в ИПС по желудочковому миозину были равны $55,2 \pm 0,1$ мкМ и $6,5 \pm 0,1^*$ мкМ, а по предсердному – $42,8 \pm 0,1$ мкМ и $26,6 \pm 0,1^*$ мкМ без фрагмента C0-C2 и в его присутствии соответственно. Значения S_{ATP} для зависимости скорости скольжения тонких нитей от концентрации АТР по желудочковому миозину были равны $92,5 \pm 2,5$ мкМ и $86,4 \pm 4,5$ мкМ, а по предсердному миозину – $53,9 \pm 0,5$ мкМ и $56,2 \pm 2,5$ мкМ. Символом * обозначено отличие значения S_{ATP} в присутствии фрагмента C0-C2 от такового при его отсутствии ($p < 0,05$)

сайты связывания на актине в соседних регуляторных группах доступными для миозина. Мы исследовали эффект C0-C2-фрагмента сМуВР-С на мостик-мостиковую кооперативность кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия, определяя концентрацию миозина, при которой скорость тонких нитей достигает полумаксимального значения ($S_{миозин}$). Эксперименты были выполнены при насыщающей (pCa 4) и ненасыщающей (pCa 5,5 – для предсердного миозина и pCa 6 – для желудочкового миозина) концентрациях кальция. Обнаружено, что фрагмент C0-C2 существенно усиливал мостик-мостиковую кооперативность, уменьшая $S_{миозин}$ для обеих изоформ миозина (рис. 3).

Влияние АТР и АДФ на актин-миозиновое взаимодействие. Ранее было показано, что сМуВР-С влияет на кинетику прикрепления/открепления поперечного мостика [37]. Для исследова-

ния влияния C0-C2-фрагмента сМуВР-С на кинетику прикрепления/открепления поперечного мостика мы проанализировали зависимость скорости скольжения тонких нитей при pCa 4 и F-актина по миозину от концентрации АТР и АДФ в ИПС, так как эти нуклеотиды определяют время жизни головки миозина на актине [59, 60].

Мы определили концентрацию АТР, при которой скорости тонких нитей и F-актина достигали полумаксимальных значений (S_{ATP}). При отсутствии фрагмента C0-C2 значение S_{ATP} для предсердного миозина при взаимодействии с F-актином было меньше, чем для желудочкового. Добавление фрагмента C0-C2 в 8,5 раза уменьшало S_{ATP} для желудочкового миозина и в 1,6 раза – для предсердного миозина (рис. 4, а и б).

Фрагмент C0-C2 не влиял на S_{ATP} обеих изоформ миозина при взаимодействии с тонкими нитями (рис. 4, в и г). При этом предсердному миозину

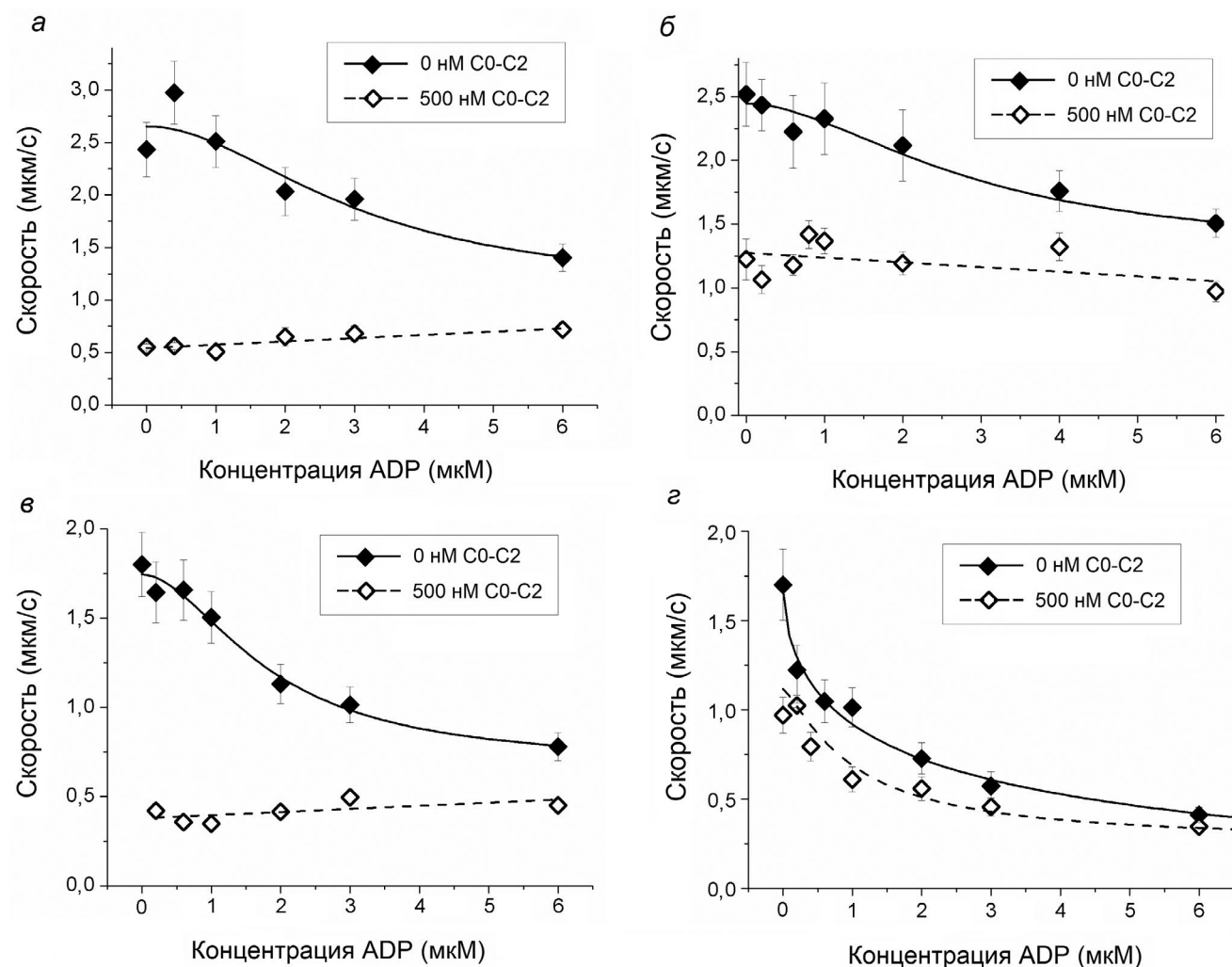


Рис. 5. Влияние C0-C2-фрагмента сMyBP-C на зависимость скорости скольжения F-актина (а и в) и регулируемых тонких нитей при pCa 4 (б и г) по предсердному (а, б) и желудочковому (в, г) миозину от концентрации ADP в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) для F-актина (а, б) и тонких нитей (г) с фрагментом C0-C2 аппроксимированы линейной функцией; экспериментальные данные для F-актина и тонких нитей без фрагмента C0-C2 с обеими изоформами миозина (а, в) и для тонких нитей с желудочковым миозином аппроксимированы логистической функцией (2). Значения C_{ADP} без фрагмента C0-C2 для зависимости скорости скольжения F-актина по предсердному миозину от концентрации ADP были равны $3,03 \pm 0,35$ мМ, для зависимости скорости скольжения тонких нитей – $3,46 \pm 0,23$ мМ. Значения C_{ADP} без фрагмента C0-C2 для зависимости скорости скольжения F-актина по желудочковому миозину от концентрации ADP были равны $1,84 \pm 0,2$ мМ; для тонких нитей значение C_{ADP} без фрагмента C0-C2 было равно $2,12 \pm 0,15$ мМ, а при его присутствии – $1,00 \pm 0,25$ мМ

требовалось меньше АТР, чтобы достичь полумаксимального значения скорости, чем желудочковому миозину, как с фрагментом C0-C2, так и без него.

ADP ингибирует АТРАЗную активность миозина и увеличивает время жизни актомиозинового комплекса, снижая скорость скольжения F-актина и тонких нитей в ИПС [61]. Мы определили концентрацию ADP, при которой скорость уменьшается в 2 раза (C_{ADP}). При отсутствии фрагмента C0-C2 добавление ADP дозозависимым образом снижало скорость скольжения F-актина и тонких нитей по предсердному и желудочковому миозину (рис. 5). В присутствии фрагмента C0-C2 добавление ADP снижало скорость скольжения тонких

нитей по желудочковому миозину (рис. 5, г), но не влияло на скорость скольжения F-актина по обеим изоформам миозина (рис. 5, а и в) и на скорость скольжения тонких нитей по предсердному миозину (рис. 5, б).

Известно, что увеличение концентрации ADP в миокарде ведёт к диастолической дисфункции желудочков [62, 63]. Мы исследовали влияние ADP на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия при отсутствии и в присутствии фрагмента C0-C2. Добавление 0,5 мМ ADP увеличивало кальциевую чувствительность зависимости pCa -скорость обеих изоформ миозина и вело к неполному ингибированию скольжения

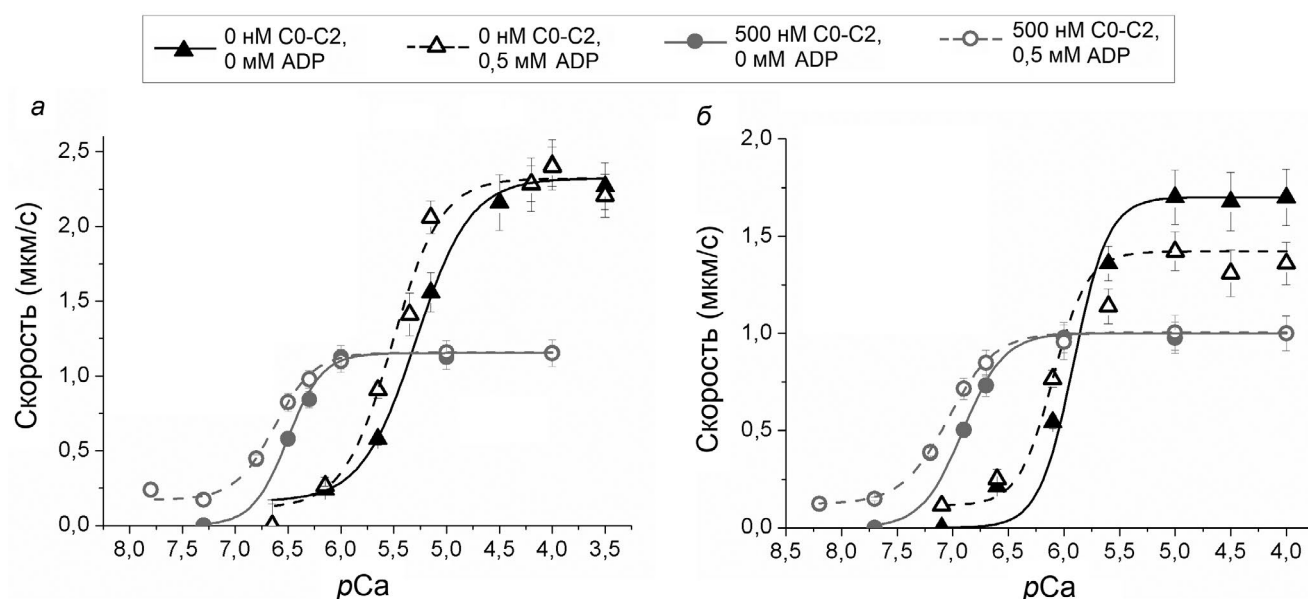


Рис. 6. Влияние ADP на кальциевую зависимость скорости скольжения тонких нитей по желудочковому (а) и предсердному (б) миозину в *in vitro* подвижной системе. Экспериментальные значения скоростей (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) аппроксимированы уравнением Хилла (1). Параметры уравнения Хилла представлены в табл. 3

Таблица 3. Параметры кальциевой зависимости скорости скольжения тонких нитей по миозину в *in vitro* подвижной системе в присутствии ADP

Миозин	Концентрация фрагмента C0-C2, нМ	Концентрация ADP, мМ	$V_{\max}$, мкм/с	V_0 , мкм/с	h	pCa_{50}
Желудочковый миозин	0	0	$1,7 \pm 0,1$	0	$1,7 \pm 0,2$	$5,91 \pm 0,01$
	0	0,5	$1,4 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01^*$	$1,5 \pm 0,2$	$6,10 \pm 0,01^*$
	500	0	$1,0 \pm 0,1$	0	$1,4 \pm 0,2$	$6,91 \pm 0,01$
	500	0,5	$1,0 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01^*$	$1,1 \pm 0,2$	$7,04 \pm 0,01$
Предсердный миозин	0	0	$2,3 \pm 0,04$	0	$1,2 \pm 0,2$	$5,29 \pm 0,02$
	0	0,5	$2,3 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,3$	$5,51 \pm 0,03^*$
	500	0	$1,2 \pm 0,1^*$	0	$1,5 \pm 0,2$	$6,51 \pm 0,01$
	500	0,5	$1,2 \pm 0,1^*$	$0,17 \pm 0,01^*$	$1,1 \pm 0,2$	$6,63 \pm 0,01$

Примечание. $V_{\max}$ – максимальная скорость скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция; V_0 – скорость скольжения филаментов при ненасыщающих концентрациях кальция; h – коэффициент кооперативности Хилла; pCa_{50} – концентрация кальция, при которой скорость полумаксимальная (кальциевая чувствительность). Символ * указывает на значимое отличие параметров уравнения Хилла (1) в присутствии фрагмента C0-C2 от таковых в его отсутствии ($p < 0,05$).

тонких нитей при низких концентрациях кальция (рис. 6; табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты многочисленных исследований указывают на важную роль сМуВР-С в контроле

сократительной функции сердца. Его N-терминальные домены принимают участие в активации тонкого филамента и регулируют количество головок миозина, взаимодействующих с тонкой нитью при сокращении миокарда, а также кинетику поперечного мостика [24–27], оказывая влияние на связывание АТФ и выход ADP из АТРазного кармана миозина [40, 42]. При этом большинство

исследований направлены на изучение роли сМуВР-С в сокращении левого желудочка сердца, тогда как работ, посвящённых его влиянию на сократительную функцию предсердий, практически нет. Мы сравнили влияние *N*-терминального C0-C2-фрагмента сМуВР-С на характеристики взаимодействия предсердного и желудочкового миозина с актином. Используя изолированные мышечные белки и *in vitro* подвижную систему, мы напрямую оценили эффекты сМуВР-С на взаимодействие сократительных и регуляторных белков миокарда, активацию тонкого филамента и аффинность миозина к АТР и АДФ.

Влияние C0-C2-фрагмента сМуВР-С на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия. Ранее на изолированных препаратах миокарда, а также в ИПС было показано, что как полноразмерный сМуВР-С, так и его *N*-терминальные домены, определяют кальциевую чувствительность актин-миозинового взаимодействия [26, 27, 31–33]. Так, *N*-терминальные домены сМуВР-С увеличивали кальциевую чувствительность зависимости *pCa*-скорость и снижали максимальную скорость скольжения тонких нитей по желудочковому миозину в ИПС [26, 27, 30, 34]. В нашей работе максимальная скорость скольжения тонких нитей по предсердному миозину снизилась в большей степени (~ на 50%), чем по желудочковому миозину (~ на 30%).

В кальциевой регуляции участвуют механизмы кооперативности, в связи с тем, что сМуВР-С замедляет цикл поперечного мостика, он должен оказывать эффект на мостик-мостиковую кооперативность. Мы проверили это предположение и обнаружили, что фрагмент C0-C2 усиливает мостик-мостиковую кооперативность обеих изоформ миозина в одинаковой степени даже при насыщающей концентрации кальция (рис. 3). Фрагмент C0-C2 может активировать тонкую нить либо непосредственно, либо через кинетику образования поперечных мостиков. Механизм прямой активации состоит в смещении тропомиозинового тяжа из заблокированного или закрытого состояния тонкой нити в открытое состояние, что делает сайты на поверхности актина доступными для взаимодействия с головками миозина [24, 25].

Влияние фрагмента C0-C2 на кинетику поперечного мостика. Кинетика присоединения АТР, гидролиза и выхода продуктов гидролиза (АДФ и Р_i) определяет время жизни миозина на поверхности актина и силогенерацию головки миозина. Миозины, содержащие α - и β -ТЦМ, различаются кинетическими характеристиками и временем жизни актомиозинового комплекса [47–49, 64, 65]. Согласно работе Homsher et al. [61], зависимость скорости движения F-актина и тонких нитей от концентрации АТР и АДФ позволяет косвенно охарактери-

зовать аффинность изоформ миозина к этим нуклеотидам.

Мы обнаружили, что фрагмент C0-C2 уменьшает $S_{\text{АТР}}$, т.е. увеличивает аффинность предсердного и желудочкового миозина к АТР при взаимодействии с F-актином, но не влияет на неё в случае с тонкими нитями (рис. 4). Присутствие фрагмента сМуВР-С увеличивало разницу в аффинности обеих изоформ миозина к АТР с F-актином и тонкой нитью.

При увеличении концентрации АДФ скорость скольжения F-актина по обеим изоформам миозина снижалась дозозависимым образом. Предсердный миозин при взаимодействии как с F-актином, так и с тонкой нитью показал меньшую аффинность к АДФ, чем желудочковый. Этот результат согласуется с данными, полученными методом быстрой кинетики (stopped flow) для S1 человека с α - и β -ТЦМ [59, 60]. Авторы обнаружили, что S1 с β -ТЦМ обладает большей аффинностью к АДФ и меньшей скоростью высвобождения АДФ из АТР-разного кармана, а с α -ТЦМ – меньшей аффинностью к АДФ и большей скоростью его высвобождения.

Homsher et al. [61] в экспериментах со скелетным миозином в ИПС показали, что сердечные тропомиозин и тропонин снижают аффинность миозина к АТР и АДФ. Согласно нашим данным с миозином из сердечной мышцы, сердечные регуляторные белки не оказывают существенного влияния на аффинность к АДФ, что, вероятно, объясняется изоформами миозина.

Мы обнаружили, что *N*-терминальные домены сМуВР-С по-разному влияют на кинетику поперечного мостика предсердного и желудочкового миозина в зависимости от присутствия или отсутствия регуляторных белков на F-актине. Как известно, сМуВР-С увеличивает время жизни актомиозинового комплекса и замедляет выход АДФ из АТР-разного кармана [40–42], ведя к значительному снижению скорости скольжения F-актина по миозину в ИПС. В наших экспериментах добавление АДФ в присутствии фрагмента C0-C2 не влияло на скорость F-актина по обеим изоформам миозина (рис. 5, а и в), а также на скорость скольжения тонкой нити по предсердному миозину. Фрагмент C0-C2 в большей степени подавлял скольжение тонких нитей по предсердному миозину, чем по желудочковому, к тому же оказалось, что предсердный миозин менее чувствителен к АДФ, чем желудочковый.

В присутствии фрагмента C0-C2 АДФ дозозависимо снижал скорость скольжения тонких нитей по миозину желудочков, а аффинность желудочкового миозина к АДФ увеличилась в 2 раза (рис. 5). Увеличение аффинности, в свою очередь, ведёт к увеличению времени жизни головки миозина на актине и, соответственно, к снижению скорости

скольжения тонких нитей при насыщающей концентрации кальция. Эти данные согласуются с результатами, полученными на изолированных препаратах миокарда левого желудочка с экспрессией укороченной формы сМуВР-С, которая приводила к отсутствию сМуВР-С на толстой нити, что снижало аффинность к АDP и увеличивало скорость его выхода из АТРазного кармана β-ТЦМ миозина [40, 41].

Взаимодействие сМуВР-С с изоформами миозина. Отличия влияния АDP на скорость скольжения тонких нитей в присутствии фрагмента C0-C2 по предсердному и желудочковому миозину могут объясняться различием длительности стадий цикла поперечного мостика α- и β-изоформ миозина. Ещё одной причиной этого отличия может быть взаимодействие RLC предсердного и желудочкового миозина с сМуВР-С. Цикл поперечного мостика является общим для всех изученных миозинов, но изоформы отличаются скоростью гидролиза АТР и константами стадий цикла, в частности, константами высвобождения АDP [60]. Кроме того, было показано, что C0-домен сМуВР-С способен связывать RLC сердечного миозина [66], а фрагмент C1-C2 – взаимодействовать с S2 миозина [11, 16]. Предсердный и желудочковый миозин имеют соответственно предсердную и желудочковую изоформы RLC и ELC. Эти различия могут влиять на взаимодействие изоформ сердечного миозина с актином в присутствии фрагмента C1-C2. Ранее на медленном скелетном миозине, содержащем β-изоформу ТЦМ, используя полноразмерный сМуВР-С, мы показали, что изоформы лёгких цепей миозина модулируют эффект сМуВР-С на характеристики актин-миозинового взаимодействия [67]. В частности, сМуВР-С увеличивал максимальную скорость скольжения тонких нитей по медленному миозину в ИПС, в отличие от изоформ сердечного миозина. Таким образом, мы видим, что взаимодействие сМуВР-С с миозином зависит от изоформного состава миозина.

Влияние фрагмента C0-C2 на активацию тонкой нити. Активация тонкой нити – это обеспечение доступа головок миозина к сайтам связывания его на F-актине и образование поперечных мостиков. В поперечнополосатых мышцах этот процесс инициируется связыванием Ca^{2+} тропонином С, а последующая полная активация тонкой нити требует присоединения к ней молекул миозина [68]. Медленный миозин дольше находится в связанном с актином состоянии и тем самым лучше активирует тонкую нить через механизм мостик-мостиковой кооперативности, чем быстро циклирующий миозин [50, 69]. Увеличение аффинности миозина к АDP, т.е. замедление его высвобождения, увеличивает время жизни головки миозина на актине и мостик-мостиковую кооперативность, что способствует активации тонкой

нити и повышению кальциевой чувствительности актин-миозинового взаимодействия.

При сердечных патологиях (ишемия, диабет, хроническая сердечная недостаточность) в миокарде желудочков растёт концентрация АDP [62, 63, 70]. Нарушение сократимости предсердий также связано с увеличением концентрации АDP [71, 72]. Ранее было показано, что избыток АDP увеличивает кальциевую чувствительность зависимости $p\text{Ca}$ -сила изолированных препаратов миокарда, вызывая нарушение расслабления миокарда. Это ведёт к чрезмерному росту силы при ненасыщающих концентрациях кальция и конечно-диастолического давления, и в конечном итоге – к развитию сердечной недостаточности [63]. Мы исследовали влияние АDP на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в предсердиях и желудочках. Добавление АDP увеличивало кальциевую чувствительность скорости скольжения тонких нитей по предсердному и желудочковому миозину в ИПС независимо от присутствия фрагмента C0-C2 (рис. 6; табл. 3), вероятнее всего, через механизм мостик-мостиковой кооперативности. Рост концентрации АDP в миокарде предсердий при хронической сердечной недостаточности вследствие нарушения кальциевой регуляции может вести к развитию фибрилляции предсердий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для полной активации тонкой нити необходимо образование поперечных мостиков [68]. Механизмы кооперативной активации тонкой нити предсердного и желудочкового миозина различаются, и это ведёт к различию сократительных свойств миокарда предсердий и желудочков. Предсердный и желудочковый миозин различаются аффинностью к нуклеотидам и временем жизни актомиозинового комплекса, которое является одним из факторов, определяющих активацию тонкой нити. сМуВР-С увеличивает аффинность желудочкового миозина к АDP и уменьшает аффинность предсердного миозина, таким образом, по-разному влияя на активацию тонкой нити этими изоформами миозина.

Вклад авторов. С.Ю. Бершицкий, Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – концепция и руководство работой; А.М. Кочурова, Е.А. Бельдия, Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – проведение экспериментов в *in vitro* подвижной системе; А.М. Кочурова, Е.А. Бельдия, Г.В. Копылова – обработка экспериментальных данных; Н.С. Рябкова, Д.С. Ямпольская, А.М. Матюшенко и В.В. Нефёдова – экспрессия белков; Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – написание первоначального текста статьи; А.М. Матюшенко, С.Ю. Бершицкий,

Г.В. Копылова и Д.В. Щепкин – редактирование окончательной версии статьи. Все авторы одобрили окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00174).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagayama, T., Takimoto, E., Sadayappan, S., Mudd, J. O., Seidman, J. G., Robbins, J., and Kass, D. A. (2007) Control of *in vivo* left ventricular [correction] contraction/relaxation kinetics by myosin binding protein C: protein kinase A phosphorylation dependent and independent regulation, *Circulation*, **20**, 2399-2408, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706523.
2. Palmer, B. M., Georgakopoulos, D., Janssen, P. M., Wang, Y., Alpert, N. R., Belardi, D. F., Harris, S. P., Moss, R. L., Burgon, P. G., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Maughan, D. W., and Kass, D. A. (2004) Role of cardiac myosin binding protein C in sustaining left ventricular systolic stiffening, *Circ. Res.*, **94**, 1249-1255, doi: 10.1161/01.RES.0000126898.95550.31.
3. Janssen, P. M. (2010) Kinetics of cardiac muscle contraction and relaxation are linked and determined by properties of the cardiac sarcomere, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**, 1092-1099, doi: 10.1152/ajpheart.00417.2010.
4. Fazlollahi, F., Santini Gonzalez, J. J., Repas, S. J., Canan, B. D., Billman, G. E., and Janssen, P. M. L. (2021) Contraction-relaxation coupling is unaltered by exercise training and infarction in isolated canine myocardium, *J. Gen. Physiol.*, **153**, e202012829, doi: 10.1085/jgp.202012829.
5. Barefield, D., and Sadayappan, S. (2010) Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **48**, 866-875, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.014.
6. Previs, M. J., Mun, J. Y., Michalek, A. J., Previs, S. B., Gulick, J., Robbins, J., Saber, D. M., and Craig, R. (2016) Phosphorylation and calcium antagonistically tune myosin-binding protein C's structure and function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3239-3244, doi: 10.1073/pnas.1522236113.
7. Kumar, M., Haghigh, I. K., Kranias, E. G., and Sadayappan, S. (2020) Phosphorylation of cardiac myosin-binding protein-C contributes to calcium homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **295**, 11275-11291, doi: 10.1074/jbc.RA120.013296.
8. Huang, X., Torre, I., Chiappi, M., Yin, Z., Vydyanath, A., Cao, S., Raschdorf, O., Beeby, M., Quigley, B., de Tombe, P. P., Liu, J., Morris, E. P., and Luther, P. K. (2023) Cryo-electron tomography of intact cardiac muscle reveals myosin binding protein-C linking myosin and actin filaments, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **44**, 165-178, doi: 10.1007/s10974-023-09647-3.
9. Suay-Corredera, C., and Alegre-Cebollada, J. (2022) The mechanics of the heart: zooming in on hypertrophic cardiomyopathy and cMyBP-C, *FEBS Lett.*, **596**, 703-746, doi: 10.1002/1873-3468.14301.
10. Dutta, D., Nguyen, V., Campbell, K. S., Padrón, R., and Craig, R. (2023) Cryo-EM structure of the human cardiac myosin filament, *Nature*, **623**, 853-862, doi: 10.1038/s41586-023-06691-4.
11. Gruen, M., and Gautel, M. (1999) Mutations in β -myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin binding protein-C, *J. Mol. Biol.*, **286**, 933-949, doi: 10.1006/jmbi.1998.2522.
12. Kulikovskaya, I., McClellan, G., Flavigny, J., Carrier, L., and Winegrad, S. (2003) Effect of MyBP-C binding to actin on contractility in heart muscle, *J. Gen. Physiol.*, **122**, 761-774, doi: 10.1085/jgp.200308941.
13. Whitten, A. E., Jeffries, C. M., Harris, S. P., and Trewthella, J. (2008) Cardiac myosin-binding protein C decorates F-actin: implications for cardiac function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18360-18365, doi: 10.1073/pnas.0808903105.
14. Shaffer, J. F., Kensler, R. W., and Harris, S. P. (2009) The myosin-binding protein C motif binds to F-actin in a phosphorylation-sensitive manner, *J. Biol. Chem.*, **284**, 12318-12327, doi: 10.1074/jbc.M808850200.
15. Orlova, A., Galkin, V. E., Jeffries, C. M., Egelman, E. H., and Trewthella, J. (2011) The N-terminal domains of myosin binding protein C can bind polymorphically to F-actin, *J. Mol. Biol.*, **412**, 379-386, doi: 10.1016/j.jmb.2011.07.056.
16. Bhuiyan, M. S., McLendon, P., James, J., Osinska, H., Gulick, J., Bhandary, B., Lorenz, J. N., and Robbins, J. (2016) *In vivo* definition of cardiac myosin-binding protein C's critical interactions with myosin, *Pflugers Arch.*, **468**, 1685-1695, doi: 10.1007/s00424-016-1873-y.
17. Tamborini, D., Wang, Z., Wagner, T., Tacke, S., Stabrin, M., Grange, M., Kho, A. L., Rees, M., Bennett, P., Gautel, M., and Raunser, S. (2023) Structure of the native myosin filament in the relaxed cardiac sarcomere, *Nature*, **623**, 863-871, doi: 10.1038/s41586-023-06690-5.
18. Ponnamm, S., and Kampourakis, T. (2022) Microscale thermophoresis suggests a new model of regulation of cardiac myosin function via interaction with cardiac myosin-binding protein C, *J. Biol. Chem.*, **298**, 101485, doi: 10.1016/j.jbc.2021.101485.

19. Doh, C. Y., Bharambe, N., Holmes, J. B., Dominic, K. L., Swanberg, C. E., Mamidi, R., Chen, Y., Bandyopadhyay, S., Ramachandran, R., and Stelzer, J. E. (2022) Molecular characterization of linker and loop-mediated structural modulation and hinge motion in the C4-C5 domains of cMyBPC, *J. Struct. Biol.*, **214**, 107856, doi: 10.1016/j.jsb.2022.107856.
20. Sadayappan, S., and de Tombe, P. P. (2012) Cardiac myosin binding protein-C: redefining its structure and function, *Biophys. Rev.*, **4**, 93-106, doi: 10.1007/s12551-012-0067-x.
21. Walcott, S., Docken, S., and Harris, S. P. (2015) Effects of cardiac Myosin binding protein-C on actin motility are explained with a drag-activation-competition model, *Biophys. J.*, **108**, 10-13, doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.1852.
22. Colson, B. A., Thompson, A. R., Espinoza-Fonseca, L. M., and Thomas, D. D. (2016) Site-directed spectroscopy of cardiac myosin-binding protein C reveals effects of phosphorylation on protein structural dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3233-3238, doi: 10.1073/pnas.1521281113.
23. Moss, R. L. (2016) Cardiac myosin-binding protein C: a protein once at loose ends finds its regulatory groove, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3133-3135, doi: 10.1073/pnas.1602568113.
24. Risi, C., Belknap, B., Forgacs-Lonart, E., Harris, S. P., Schröder, G. F., White, H. D., and Galkin, V. E. (2018) N-Terminal domains of cardiac myosin binding protein C cooperatively activate the thin filament, *Structure*, **26**, 1604-1611.e4, doi: 10.1016/j.str.2018.08.007.
25. Harris, S. P., Belknap, B., Van Sciver, R. E., White, H. D., and Galkin, V. E. (2016) C0 and C1 N-terminal Ig domains of myosin binding protein C exert different effects on thin filament activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 1558-1563, doi: 10.1073/pnas.1518891113.
26. Mun, J. Y., Previs, M. J., Yu, H. Y., Gulick, J., Tobacman, L. S., Beck Previs, S., Robbins, J., Warshaw, D. M., and Craig, R. (2014) Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2170-2175, doi: 10.1073/pnas.1316001111.
27. Inchingolo, A. V., Previs, S. B., Previs, M. J., Warshaw, D. M., and Kad, N. M. (2019) Revealing the mechanism of how cardiac myosin-binding protein C N-terminal fragments sensitize thin filaments for myosin binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 6828-6835, doi: 10.1073/pnas.1816480116.
28. Stelzer, J. E., Fitzsimons, D. P., and Moss, R. L. (2006) Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium, *Biophys. J.*, **90**, 4119-4127, doi: 10.1529/biophysj.105.078147.
29. Stelzer, J. E., Patel, J. R., and Moss, R. L. (2006) Protein kinase A-mediated acceleration of the stretch activation response in murine skinned myocardium is eliminated by ablation of cMyBP-C, *Circ. Res.*, **99**, 884-890, doi: 10.1161/01.RES.0000245191.34690.66.
30. Napierski, N. C., Granger, K., Langlais, P. R., Moran, H. R., Strom, J., Touma, K., and Harris, S. P. (2020) A novel "Cut and Paste" method for *in situ* replacement of cMyBP-C reveals a new role for cMyBP-C in the regulation of contractile oscillations, *Circ. Res.*, **126**, 737-749, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315760.
31. Razumova, M. V., Bezold, K. L., Tu, A. Y., Regnier, M., and Harris, S. P. (2008) Contribution of the myosin binding protein C motif to functional effects in permeabilized rat trabeculae, *J. Gen. Physiol.*, **132**, 575-585, doi: 10.1085/jgp.200810013.
32. Razumova, M. V., Shaffer, J. F., Tu, A. Y., Flint, G. V., Regnier, M., and Harris, S. P. (2006) Effects of the N-terminal domains of myosin binding protein-C in an *in vitro* motility assay: evidence for long-lived cross-bridges, *J. Biol. Chem.*, **281**, 35846-35854, doi: 10.1074/jbc.M606949200.
33. Saber, W., Begin, K. J., Warshaw, D. M., and VanBuren, P. (2008) Cardiac myosin binding protein-C modulates actomyosin binding and kinetics in the *in vitro* motility assay, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **44**, 1053-1061, doi: 10.1016/j.jmcc.2008.03.012.
34. Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Nikitina, L. V., Katsnelson, L. B., and Bershitsky, S. Y. (2010) Effects of cardiac myosin binding protein-C on the regulation of interaction of cardiac myosin with thin filament in an *in vitro* motility assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**, 159-163, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.040.
35. Chandler, J., Treacy, C., Ameer-Beg, S., Ehler, E., Irving, M., and Kampourakis, T. (2012) *In situ* FRET-based localization of the N terminus of myosin binding protein-C in heart muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2222005120, doi: 10.1073/pnas.2222005120.
36. Nelson, S., Beck-Previs, S., Sadayappan, S., Tong, C., and Warshaw, D. M. (2023) Myosin-binding protein C stabilizes, but is not the sole determinant of SRX myosin in cardiac muscle, *J. Gen. Physiol.*, **155**, e202213276, doi: 10.1085/jgp.202213276.
37. Moss, R. L., Fitzsimons, D. P., and Ralphe, J. C. (2015) Cardiac MyBP-C regulates the rate and force of contraction in mammalian myocardium, *Circ. Res.*, **116**, 183-192, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.300561.
38. De Lange, W. J., Grimes, A. C., Hegge, L. F., and Ralphe, J. C. (2013) Ablation of cardiac myosin-binding protein-C accelerates contractile kinetics in engineered cardiac tissue, *J. Gen. Physiol.*, **141**, 73-84, doi: 10.1085/jgp.201210837.
39. McNamara, J. W., Singh, R. R., and Sadayappan, S. (2019) Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation regulates the super-relaxed state of myosin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 11731-11736, doi: 10.1073/pnas.1821660116.

40. Tanner, B. C., Wang, Y., Robbins, J., and Palmer, B. M. (2014) Kinetics of cardiac myosin isoforms in mouse myocardium are affected differently by presence of myosin binding protein-C, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **35**, 267-278, doi: 10.1007/s10974-014-9390-0.
41. Tanner, B. C. W., Previs, M. J., Wang, Y., Robbins, J., and Palmer, B. M. (2021) Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation accelerates β -cardiac myosin detachment rate in mouse myocardium, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **320**, H1822-H1835, doi: 10.1152/ajpheart.00673.2020.
42. Wang, L., Sadayappan, S., and Kawai, M. (2014) Cardiac myosin binding protein C phosphorylation affects cross-bridge cycle's elementary steps in a site-specific manner, *PLoS One*, **9**, e113417, doi: 10.1371/journal.pone.0113417.
43. Gordon, A. M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle, *Physiol. Rev.*, **80**, 853-924, doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.853.
44. Gorga, J. A., Fishbaugher, D. E., and VanBuren, P. (2003) Activation of the calcium-regulated thin filament by myosin strong binding, *Biophys. J.*, **85**, 2484-2491, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74671-2.
45. Narolska, N. A., Eiras, S., van Loon, R. B., Boontje, N. M., Zaremba, R., Spiegelberg, S. R., Stooker, W., Huybrechts, M. A., Visser, F. C., van der Velden, J., and Stienen, G. J. (2005) Myosin heavy chain composition and the economy of contraction in healthy and diseased human myocardium, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**, 39-48, doi: 10.1007/s10974-005-9005-x.
46. Morano, I. (1999) Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains, *J. Mol. Med.*, **77**, 544-555, doi: 10.1007/s001099900031.
47. Yamashita, H., Sugiura, S., Fujita, H., Yasuda, S., Nagai, R., Saeki, Y., Sunagawa, K., and Sugi, H. (2003) Myosin light chain isoforms modify force-generating ability of cardiac myosin by changing the kinetics of actin-myosin interaction, *Cardiovasc. Res.*, **60**, 580-588, doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.011.
48. Shchepkin, D. V., Nikitina, L. V., Bershitsky, S. Y., and Kopylova, G. V. (2017) The isoforms of α -actin and myosin affect the Ca^{2+} regulation of the actin-myosin interaction in the heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **490**, 324-329, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.043.
49. Kopylova, G., Nabiev, S., Nikitina, L., Shchepkin, D., and Bershitsky, S. (2016) The properties of the actin-myosin interaction in the heart muscle depend on the isoforms of myosin but not of α -actin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **476**, 648-653, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.013.
50. Kopylova, G. V., Berg, V. Y., Kochurova, A. M., Matyushenko, A. M., Bershitsky, S. Y., and Shchepkin, D. V. (2022) The effects of the tropomyosin cardiomyopathy mutations on the calcium regulation of actin-myosin interaction in the atrium and ventricle differ, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 29-33, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.051.
51. Pohlmann, L., Kröger, I., Vignier, N., Schlossarek, S., Krämer, E., Coirault, C., Sultan, K. R., El-Armouche, A., Winegrad, S., Eschenhagen, T., and Carrier, L. (2007) Cardiac myosin-binding protein C is required for complete relaxation in intact myocytes, *Circ. Res.*, **101**, 928-938, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.158774.
52. El-Armouche, A., Boknik, P., Eschenhagen, T., Carrier, L., Knaut, M., Ravens, U., and Dobrev, D. (2006) Molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in human chronic atrial fibrillation, *Circulation*, **114**, 670-680, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.636845.
53. Wakili, R., Yeh, Y. H., Yan Qi, X., Greiser, M., Chartier, D., Nishida, K., Maguy, A., Villeneuve, L.-R., Boknik, P., Voigt, N., Krysiak, J., Kääh, S., Ravens, U., Linke, W. A., Stienen, G. J. M., Shi, Y., Tardif, J.-C., Schotten, U., Dobrev, D., and Nattel, S. (2010) Multiple potential molecular contributors to atrial hypocontractility caused by atrial tachycardia remodeling in dogs, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, **3**, 530-541, doi: 10.1161/CIRCEP.109.933036.
54. Butova, X., Myachina, T., Simonova, R., Kochurova, A., Mukhlynina, E., Kopylova, G., Shchepkin, D., and Khokhlova, A. (2023) The inter-chamber differences in the contractile function between left and right atrial cardiomyocytes in atrial fibrillation in rats, *Front. Cardiovasc. Med.*, **10**, 1203093, doi: 10.3389/fcvm.2023.1203093.
55. Margossian, S. S., and Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle, *Methods Enzymol.*, **85**, 55-71, doi: 10.1016/0076-6879(82)85009-x.
56. Reiser, P. J., and Kline, W. O. (1998) Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species, *Am. J. Physiol.*, **274**, 1048-1053, doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.3.H1048.
57. Pardee, J. D., and Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin, *Methods Enzymol.*, **85**, 164-181, doi: 10.1016/0076-6879(82)85020-9.
58. Mashanov, G. I., and Molloy, J. E. (2007) Automatic detection of single fluorophores in live cells, *Biophys. J.*, **92**, 2199-2211, doi: 10.1529/biophysj.106.081117.
59. Deacon, J. C., Bloemink, M. J., Rezavandi, H., Geeves, M. A., and Leinwand, L. A. (2012) Identification of functional differences between recombinant human α and β cardiac myosin motors, *Cell. Mol. Life Sci.*, **69**, 2261-2277, doi: 10.1007/s00018-012-0927-3.
60. Walklate, J., Ferrantini, C., Johnson, C. A., Tesi, C., Poggesi, C., and Geeves, M. A. (2021) Alpha and beta myosin isoforms and human atrial and ventricular contraction, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 7309-7337, doi: 10.1007/s00018-021-03971-y.

61. Homsher, E., Nili, M., Chen, I. Y., and Tobacman, L. S. (2003) Regulatory proteins alter nucleotide binding to actomyosin of sliding filaments in motility assays, *Biophys. J.*, **85**, 1046-1052, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74543-3.
62. Tian, R., Christe, M. E., Spindler, M., Hopkins, J. C., Halow, J. M., Camacho, S. A., and Ingwall, J. S. (1997) Role of MgADP in the development of diastolic dysfunction in the intact beating rat heart, *J. Clin. Invest.*, **99**, 745-751, doi: 10.1172/JCI119220.
63. Sequeira, V., Najafi, A., McConnell, M., Fowler, E. D., Bollen, I. A., Wüst, R. C., dos Remedios, C., Helmes, M., White, E., Stienen, G. J., Tardiff, J., Kuster, D. W., and van der Velden, J. (2015) Synergistic role of ADP and Ca²⁺ in diastolic myocardial stiffness, *J. Physiol.*, **593**, 3899-3916, doi: 10.1113/JP270354.
64. Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Momomura, S., Chaen, S., Omata, M., and Sugi, H. (1998) Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation, *Circ. Res.*, **82**, 1029-1034, doi: 10.1161/01.res.82.10.1029.
65. Palmiter, K. A., Tyska, M. J., Dupuis, D. E., Alpert, N. R., and Warshaw, D. M. (1999) Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms, *J. Physiol.*, **519**, 669-678, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0669n.x.
66. Ratti, J., Rostkova, E., Gautel, M., and Pfuhl, M. (2011) Structure and interactions of myosin-binding protein C domain C0: cardiac-specific regulation of myosin at its neck? *J. Biol. Chem.*, **286**, 12650-12658, doi: 10.1074/jbc.M110.156646.
67. Nabiev, S. R., Kopylova, G. V., and Shchepkin, D. V. (2019) The effect of cardiac myosin-binding protein c on calcium regulation of the actin-myosin interaction depends on myosin light chain isoforms, *Mol. Biophys.*, **64**, 690-693, doi: 10.1134/S000635091905018X.
68. McKillop, D. F., and Geeves, M. A. (1993) Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament, *Biophys. J.*, **65**, 693-701, doi: 10.1016/S0006-3495(93)81110-X.
69. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Bershtitsky, S. Y., and Levitsky, D. I. (2020) Unique functional properties of slow skeletal muscle tropomyosin, *Biochimie*, **174**, 1-8, doi: 10.1016/j.biochi.2020.03.013.
70. Papp, Z., Szabó, A., Barends, J. P., and Stienen, G. J. (2002) The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes, *J. Physiol.*, **543**, 177-189, doi: 10.1113/jphysiol.2002.022145.
71. Cha, Y. M., Dzeja, P. P., Shen, W. K., Jahangir, A., Hart, C. Y., Terzic, A., and Redfield, M. M. (2003) Failing atrial myocardium: energetic deficits accompany structural remodeling and electrical instability, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1313-H1320, doi: 10.1152/ajpheart.00337.2002.
72. Shimura, D., Nakai, G., Jiao, Q., Osanai, K., Kashikura, K., Endo, K., Soga, T., Goda, N., and Minamisawa, S. (2012) Metabolomic profiling analysis reveals chamber-dependent metabolite patterns in the mouse heart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **305**, H494-H505, doi: 10.1152/ajpheart.00867.2012.

N-TERMINAL FRAGMENT OF CARDIAC MYOSIN BINDING PROTEIN C MODULATES COOPERATIVE MECHANISMS OF THE THIN FILAMENT ACTIVATION IN THE ATRIA AND VENTRICLES

**A. M. Kochurova¹, E. A. Beldiia^{1,2}, V. V. Nefedova³, N. S. Ryabkova^{4,5},
D. S. Yampolskaya³, A. M. Matyushenko³, S. Y. Bershtitsky¹,
G. V. Kopylova¹, and D. V. Shchepkin^{1*}**

¹ *Institute of Immunology and Physiology of the Russian Academy of Sciences,
620049 Yekaterinburg, Russia; e-mail: dvshchepkin@gmail.com*

² *Ural Federal University, 620002 Ekaterinburg, Russia*

³ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia*

⁴ *Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁵ *HyTest Ltd., 20520 Turku, Finland*

Cardiac myosin binding protein C (сМЫВР-С) is one of the essential control components of the myosin cross-bridge cycle. The C-terminal part of сМЫВР-С lies on the surface of the thick filament, and its

N-terminal part interacts with actin, myosin, and tropomyosin, affecting both the kinetics of the ATP hydrolysis cycle and the lifetime of the cross bridge, as well as the calcium regulation of actin-myosin interaction, thereby modulating the contractile function of the myocardium. The role of cMyBP-C in atrial contraction is poorly studied. We examined the effect of the N-terminal C0-m-C2 (C0-C2) fragment of cMyBP-C on actin-myosin interaction using ventricular and atrial myosin in an *in vitro* motility assay. The C0-C2 fragment of cMyBP-C significantly reduced the maximum sliding velocity of thin filaments on both myosin isoforms and increased the calcium sensitivity of actin-myosin interaction. The C0-C2 fragment had different effects on the kinetics of nucleotide, ATP, and ADP exchange, increasing the affinity of ventricular myosin for ADP and decreasing the affinity of atrial myosin. The effect of the C0-C2 fragment on the activation of the thin filament depended on the myosin isoforms. Atrial myosin activates the thin filament less strongly than ventricular myosin, and the C0-C2 fragment makes these differences in myosin isoforms more pronounced.

Keywords: cardiac myosin binding protein C, myocardium, atrial and ventricular myosin, cardiac muscle, regulatory proteins, actin-myosin interaction, calcium regulation, thin filament activation, *in vitro* motility assay