

УДК 612.816:612.815.2:576.5:577.25

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИСТРОФИНА, АКТИНА, ЛЕГКИХ И ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ СОМАТИЧЕСКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ДОЖДЕВОГО ЧЕРВЯ *Lumbricus terrestris*

© 2024 г. Л. Ф. Нуруллин^{1, 2, *}, Е. М. Волков^{1, **}

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, 420111, Россия

* E-mail: lenizn@yandex.ru

** E-mail: euroworm@mail.ru

Поступила в редакцию 30.06.2023 г.

После доработки 11.09.2023 г.

Принята к публикации 11.09.2023 г.

В мышечных клетках двигательной мышцы дождевого червя *Lumbricus terrestris* методами флуоресцентной микроскопии определены белки дистрофин, актин, быстрые и медленные изоформы тяжелых цепей миозина. Можно думать, что экспрессия этих белков осуществлялась на самых ранних этапах эволюционного формирования внутриклеточного сократительного аппарата двигательной ткани как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных. Данное исследование позволит дополнить картину эволюционного формирования двигательной мышечной ткани.

Ключевые слова: дистрофин, актин, миозин, соматическая мышца, аннелиды

Принятые сокращения: TMP — тетраметилродамин.

DOI: 10.31857/S0041377124010099, **EDN:** HXYKMJ

Белок дистрофин с молекулярной массой в 427 кДа широко представлен как в мышечной, так и нервной тканях позвоночных (Florczyk-Soluch et al., 2021; Sadoulet-Puccio, Kunkel, 1996). Подобный ему белок с массой в 140 кДа присутствует в аналогичных тканях морской пиявки *Pontobdella muricata* (Royuela et al., 1999, 2001).

Дистрофин стабилизирует сарколемму, прикрепляя внеклеточный матрикс к цитоскелету через F-актин и ряд других дистрофин-ассоциированных белков (Wilson et al., 2022). Показано, что дистрофин-ассоциированные белки вовлечены в процессы внутриклеточной сигнализации с участием нейрональной NO-синтазы, фосфоинозитолтрифосфата 2 и кальмодулина (Pilgram et al., 2010). Кроме того, дистрофин-ассоциированные белки необходимы для кластеризации рецепторов нейротрансмиттеров и ионных каналов, а также поддержания внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} (Pilgram et al., 2010).

Основными моторными белками в соматических мышцах, обеспечивающими их сократительную функцию, являются молекулы актина и миозина (Sweeney, Holzbaur, 2018). Последние состоят из легких и тяжелых цепей (Lowey et al., 1993).

У морской полихеты *Urechis unicinctus* обнаруживаются легкие и тяжелые цепи миозина (Kanzawa et al., 1991).

Легкие цепи миозина относятся к большому семейству Ca^{2+} -связывающих белков (Nieznański et al., 2003). У беспозвоночных увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} приводит к связыванию этих ионов с легкими цепями миозина и запуску каскада биохимических реакций. Так, актин взаимодействуя с миозиновой АТФазой приводит к гидролизу АТФ, что и запускает сокращение тяжелых цепей миозина (Fromherz, Szent-Györgyi, 1995). При этом главными сократительными белками толстых мышечных филаментов выступают именно тяжелые цепи миозина (Wells et al., 1996). Известно, что в соматической мускулатуре представлены быстрые и медленные изоформы тяжелых цепей миозина (Hooper, Thuma, 2005).

Актин играет важную роль в физиологических процессах, связанных с внутриклеточным Ca^{2+} .

Актиновый цитоскелет модулирует вход Ca^{2+} через мембранные лиганд- и потенциал-активируемые Ca^{2+} -каналы. Освобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума при участии IP3- и рианодиновых рецепторов модулируется полимеризацией и деполимеризацией актина (Wang et al., 2002). F-актин мышечной системы хорошо охарактеризован у представителей класса полихет (Filipova et al., 2006, 2010; Rüchel, Müller, 2007; Han et al., 2020). Следует отметить, что прямые доказательства присутствия дистрофина, актина и миозина в мышечных клетках соматической мышцы олигохет к настоящему времени отсутствуют.

С учетом изложенного целью настоящей работы стало иммунофлуоресцентное определение белков дистрофина, актина, легких и тяжелых изоформ миозина в мышечных клетках эволюционно первичной двигательной мускулатуры олигохеты *Lumbricus terrestris*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для приготовления препарата, дождевого червя *Lumbricus terrestris* разрезали сбоку по всей длине, отрезали головной и хвостовой концы, червя раскрывали и удаляли внутренние органы и перегородки между сегментами (Volkov et al., 2000). Далее фрагменты кожно-мускульного мешка дождевого червя длиной 10–15 сегментов закрепляли с помощью иголок на дне чашек Петри, залитых смолой Sylgard, и перфузировали раствором Древес-Пакса (состав в мМ: 77 NaCl, 4 KCl, 43 Na_2SO_4 , 6 CaCl_2 , 2 триса, 167 сахарозы, pH 7.4) около 30 мин при комнатной температуре (22 ± 1 °C). Затем в течение 30 мин препараты фиксировали в 2%-ном растворе р-формальдегида, отмывали 3 раза по 30 мин в фосфатном буферном растворе. Препарат последовательно инкубировали 30 мин в 0.5%-ном растворе Тритона X-100, 15 мин в растворе, содержащем 5% нормальной козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0.5% Тритона X-100 и еще 15 мин в растворе 1%-ного бычьего сывороточного альбумина и 0.5%-ного Тритона X-100 (раствор А). Все эти растворы были приготовлены на фосфатно-солевом буфере.

Далее препараты инкубировали в течение 12 ч при температуре 4 °C в растворе А с поли- и моноклональными антителами к дистрофину, быстрым и медленным изоформам тяжелых цепей миозина (все в разведении 1:100). Антитела к быстрым и медленным изоформам тяжелых цепей

миозина были выработаны в кролике и мышши, что позволяло проводить двойное иммуномечение исследуемых белков. Препараты отмывали в растворе А 3 раза по 30 мин. и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa 488 или 647 (разведение 1:200) в растворе А.

Для подтверждения специфичности связывания антител с соответствующими белками проводили контрольные эксперименты. Для негативного контроля препарат инкубировали с вторичными антителами без предшествующей инкубации с первичными антителами. Для позитивного контроля проводили предварительную часовую инкубацию первичных антител с иммуногенным пептидом (в соотношении 1:10), на который вырабатывались первичные антитела. Затем в полученном растворе первичных антител с иммуногенным пептидом инкубировали препараты (Li et al., 2016). Отсутствие мечения антителами в контрольных экспериментах указывает на специфичность связывания антител с соответствующими пептидами.

Для окрашивания F-актина использовали токсин фаллоидин, конъюгированный с тетраметилродамином (TMR) в концентрации 10 мкМ. Мечение клеточных ядер проводили в присутствии красителя DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) при концентрации 5 мкМ.

После отмывки в фосфатном буфере препараты помещали в раствор фосфатного буфера с глицерином (1:1) и размещали на предметном стекле для проведения микроскопического исследования на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, США) с применением масляно-иммерсионного объектива 63×/1.4. Для возбуждения эмиссии флуорофоров применяли мультифотонный, Ar и He-Ne лазеры. Длины волн возбуждения: для флуорофоров Alexa 488 — 488, TMR — 543, Alexa 647 — 633, DAPI — 340 нм. Анализ полученных конфокальных изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США).

Использовали следующие реактивы: р-формальдегид, трис, фосфатный буфер (137 NaCl, 2.7 KCl, 4.3 Na_2SO_4 , 1.4 KH_2PO_4 , pH 7.2), Тритон X-100, нормальную козью сыворотку, бычий сывороточный альбумин, TMR-фаллоидин, DAPI, глицерин (Sigma-Aldrich, США); первичные кроличьи поликлональные антитела к дистрофину (ab85302; Abcam, Великобритания); первичные кроличьи поликлональные антитела к быстрой изоформе тяжелой цепи миозина (ab91506; Abcam, Велико-

британия); первичные мышинные моноклональные антитела к медленной изоформе тяжелой цепи миозина (ma1064; Bosterbio, США); иммуногенные пептиды, соответствующие поли- и моноклональным антителам (Abcam, Bosterbio); антитела вторичные конъюгированные с Alexa 488 или Alexa 647 (Invitrogen, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что антитела, выработанные против белка дистрофина позвоночных, способны метить также и дистрофин в соматических мышцах аннелид (Royuela et al., 2001). В экспериментах мы окрашивали мышечные препараты дождевого червя антителами против дистрофина позвоночных.

На изображениях видно, что дистрофин присутствует во всех областях мышечной ткани, причем имеются участки с бледным (рис. 1, стрелки вниз) и более интенсивным (рис. 1, стрелки вверх) окрашиванием.

Таким образом, белок дистрофин широко представлен в мышечных клетках двигательной мышцы дождевого червя. Можно думать, что структурно и функционально он близок к своему аналогу в мышечной ткани высших хордовых и беспозвоночных. Последнее говорит в пользу того, что этот белок является обязательным и

функционально важным компонентом моторных мышечных клеток начиная с наиболее ранних этапов филогенетического развития двигательной мускулатуры животных.

Токсин фаллоидин, выделенный из гриба *Amanita phalloides* специфически связывается с фибриллярным F-актином (Dancker et al., 1975). Мы окрашивали мышечные препараты фаллоидином, меченым флуоресцентным красителем, и красителем DAPI (с родством к ядерной ДНК).

Аппликация флуоресцентномеченого фаллоидина выявила непрерывное окрашивание мышечных филаментов по всей их длине (рис. 2а). Таким образом, актиновый цитоскелет присутствует во всех частях мышечных клеток. Окрашивание DAPI выявило типичные интерфазные клеточные ядра с гетеро- и эухроматином (рис. 2б). На наших изображениях видно, что каждой мышечной клетке принадлежит одно или два клеточных ядра (рис. 2в, г). Этот факт подтверждает, что соматическая мускулатура дождевого червя состоит из мышечных клеток (рис. 2), в отличие от мускулатуры позвоночных, содержащей мышечные волокна, что согласуется с данными из литературы (Давид, 1990; Cadot et al., 2015).

Препараты дождевого червя метили антителами на быстрые и медленные изоформы тяжелых цепей миозина и наблюдали характерную косую исчерченность окрашивания мышечных клеток (рис. 3).

Были выявлены обе изоформы миозинов (рис. 3а, б). При этом такое окрашивание во многом совпадало, но в некоторых участках окрашивание на медленную изоформу находилось между участками, окрашенных на быструю изоформу (см. рис. 3в). Высокая специфичность связывания антител при мечении на быструю изоформу тяжелых цепей миозина позволила сделать более детальный снимок. Можно видеть, что блоки миофибрилл состоят из более мелких филаментов (рис. 4).

Таким образом, проведенные исследования показали наличие белков дистрофина, актина, быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина в мышечных клетках двигательной мышцы дождевого червя.

Согласно данным литературы, экспрессия дистрофина, актина и миозина обнаруживается у самого широкого круга представителей животного мира, включая хордовых, членистоногих и нематод (Meedel, 1983; Miller et al., 1983; Roberts, Bobrow, 1998; Giugia et al., 1999; Lovato et al., 2001; Mercer et al., 2011; Ono, Pruyne, 2012).

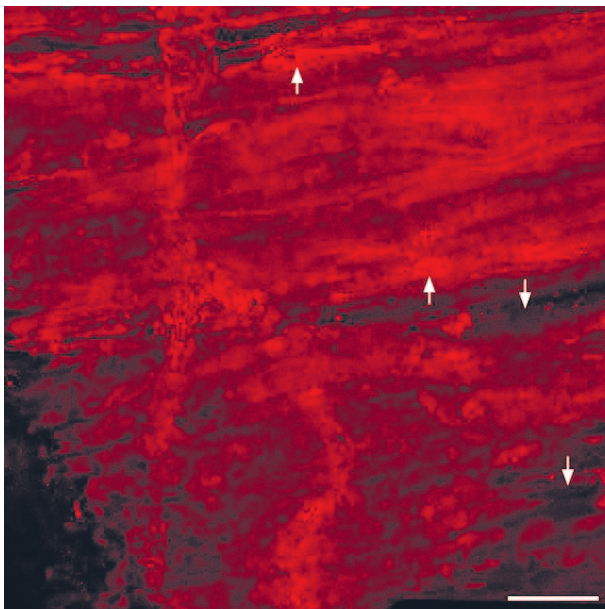


Рис. 1. Окрашивание препарата соматических мышечных клеток дождевого червя антителами к дистрофину. Стрелки вниз и вверх указывают соответственно на участки препарата с бледным окрашиванием и на районы с более интенсивным окрашиванием. Масштабная линейка: 20 мкм.

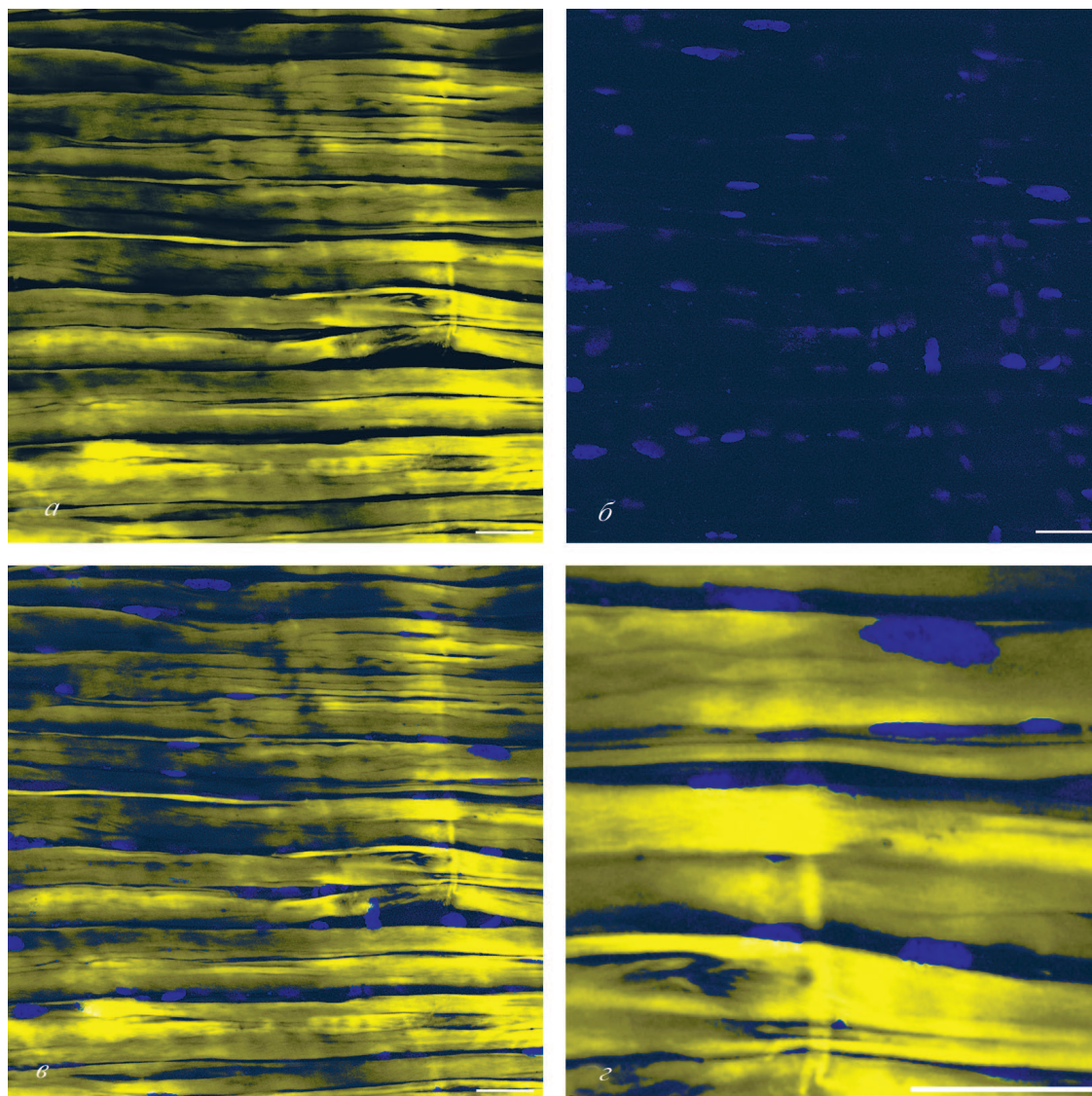


Рис. 2. Двойное окрашивание препарата соматических мышечных клеток дождевого червя на F-актин фаллоидином, меченым флуоресцентным красителем, и DAPI для выявления ядер клеток: *а* — окрашивание TMR-фаллоидином; *б* — окрашивание DAPI; *в* — наложение изображений *а* и *б*; *г* — увеличенная область изображения *в*. Масштабная линейка: 20 мкм.

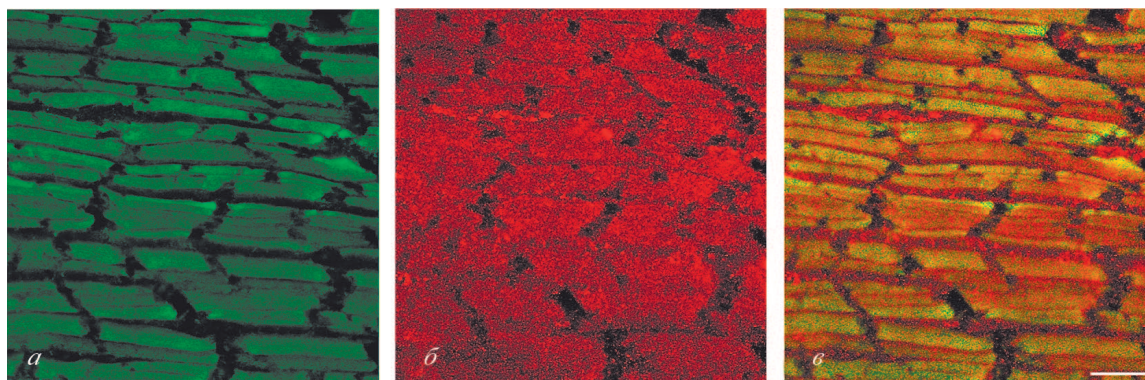


Рис. 3. Выявление быстрой и медленной изоформ тяжелых цепей миозина в препарате соматических мышечных клеток дождевого червя при двойном флуоресцентном окрашивании антителами: *а* — окрашивание антителами на быструю изоформу тяжелых цепей миозина (зеленый цвет); *б* — окрашивание антителами на медленную изоформу тяжелых цепей миозина (красный цвет); *в* — наложение изображений *а* и *б*. Масштабная линейка: 20 мкм.

Можно думать, что экспрессия этих белков осуществлялась на самых ранних этапах эволюционного формирования внутриклеточного сократительного аппарата двигательной ткани как у беспозвоночных, так позвоночных животных. Проведенное исследование позволит дополнить картину эволюционного формирования двигательной мышечной ткани.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда № 23-24-00239 (<https://rscf.ru/project/23-24-00239/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют, что все манипуляции с животными соответствовали нормам российского законодательства, а также рекомендациям Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309053773>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Давид О.Ф. Морфофизиологические основы локомоции аннелид. АН СССР. Ин-т эвол. физиол. и биохим. им. И.М. Сеченова. Л.: Наука, 1990. 168 с. (David O.F. 1990. Morfofiziologicheskie osnovy lokomocii annelid. AN SSSR. In-t evoluc. fiziologii i biohimii im. I.M. Sechenova. L.: Nauka. 168 p.)
- Cadot B., Gache V., Gomes E.R. 2015. Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle — one step at a time. *Nucleus*. V. 6. P. 373. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1090073>
- Dancker P., Löw I., Hasselbach W., Wieland T. 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 400. P. 407. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90196-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90196-8)
- Filippova A., Purschke G., Tzetlin A.B., Müller M.C.M. 2006. Three-dimensional reconstruction of the F-actin musculature of *Dorvillea kastjani* (Dorvilleidae, Polychaeta) by means of phalloidin-labelling and cLSM. *Scientia Marina*. V. 70(S3). P. 293. <https://doi.org/10.3989/scimar.2006.70s3293>
- Filippova A., Purschke G., Tzetlin A.B., Müller M.C.M. 2010. Musculature in polychaetes: comparison of *Myrianida prolifera* (Syllidae) and *Sphaerodoropsis* sp. (Sphaerodoridae). *Invertebrate Biology*. V. 129. P. 184. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2010.00191.x>
- Florczyk-Soluch U., Polak K., Dulak J. 2021. The multifaceted view of heart problem in Duchenne muscular dystrophy. *Cell. Mol. Life. Sci.* V. 78. P. 5447. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03862-2>
- Fromherz S., Szent-Györgyi A.G. 1995. Role of essential light chain EF hand domains in calcium binding and regulation of scallop myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 92. P. 7652. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.92.17.7652>
- Giugia J., Gieseler K., Arpagaus M., Ségalat L. 1999. Mutations in the dystrophin-like dys-1 gene of *Caenorhabditis elegans* result in reduced acetylcholinesterase activity. *FEBS Lett.* V. 463. P. 270. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01651-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01651-8)
- Han Y.H., Ryu K.B., Medina Jiménez B.I., Kim J., Lee H.Y., Cho S.J. 2020. Muscular development in *Urechis unicinctus* (Echiura, Annelida). *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms21072306>
- Hooper S.L., Thuma J.B. 2005. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins. *Physiol. Rev.* V. 85. P. 1001. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2004>
- Kanzawa N., Kawamura Y., Matsuno A., Maruyama K. 1991. Characterization of myosin isolated from bodywall smooth muscle of the annelid, *Urechis unicinctus*. *Proc. Japan Acad.* V. 67. P. 176. <https://doi.org/10.2183/pjab.67.176>
- Li Y., Hu H., Butterworth M.B., Tian J.B., Zhu M.X., O'Neil R.G. 2016. Expression of a Diverse array of Ca²⁺-activated K⁺ channels (SK1/3, IK1, BK) that functionally couple to the mechanosensitive TRPV4 channel in the collecting duct system of kidney. *PLoS One*. V. 11: e0155006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155006>
- Lovato T.L., Meadows S.M., Baker P.W., Sparrow J.C., Cripps R.M. 2001. Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types. *Insect. Mol. Biol.* V. 10. P. 333. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00270.x>
- Lowey S., Waller G.S., Trybus K.M. 1993. Function of skeletal muscle myosin heavy and light chain isoforms by an in vitro motility assay. *J. Biol. Chem.* V. 268. P. 20414. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)80744-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)80744-3)
- Meedel T.H. 1983. Myosin expression in the developing ascidian embryo. *J. Exp. Zool.* V. 227. P. 203. <https://doi.org/10.1002/jez.1402270205>
- Mercer R.C., Mudalige W.A., Ige T.O., Heeley D.H. 2011. Vertebrate slow skeletal muscle actin — conservation, distribution and conformational flexibility. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 1814. P. 1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.06.009>
- Miller D.M. 3rd, Ortiz I., Berliner G.C., Epstein H.F. 1983. Differential localization of two myosins within nematode thick filaments. *Cell*. V. 34. P. 477. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90381-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90381-1)
- Nieznanski K., Nieznanska H., Skowronek K., Kasprzak A.A., Stepkowski D. 2003. Ca²⁺ binding to myosin regulatory light chain affects the conformation of the N-terminus of essential light chain and its binding to actin. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 417. P. 153. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00382-5](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00382-5)
- Ono S., Pruyne D. 2012. Biochemical and cell biological analysis of actin in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

- Methods. V. 56. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.09.008>
- Pilgram G.S., Potikanond S., Baines R.A., Fradkin L.G., Noor-dermeer J.N. 2010. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol. Neurobiol.* V. 41. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8089-5>
- Roberts R.G., Bobrow M. 1998. Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum. Mol. Genet.* V. 7. P. 589. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.4.589>
- Royuela M., Hugon G., Rivier F., Paniagua R., Mornet D. 2001. Dystrophin-associated proteins in obliquely striated muscle of the leech *Pontobdella muricata* (Annelida, Hirudinea). *Histochem. J.* V. 33. P. 135. <https://doi.org/10.1023/A:1017979623095>
- Royuela M., Paniagua R., Rivier F., Hugon G., Robert A., Mornet D. 1999. Presence of invertebrate dystrophin-like products in obliquely striated muscle of the leech, *Pontobdella muricata* (Annelida, Hirudinea). *Histochem. J.* V. 31. P. 603. <https://doi.org/10.1023/A:1003855108802>
- Rüchel J., Müller M.C.M. 2007. F-actin framework in *Spirorbis cf. spirorbis* (Annelida: Serpulidae): phalloidin staining investigated and reconstructed by cLSM. *Invertebr. Biol.* V. 126. P. 173. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2007.00087.x>
- Sadoulet-Puccio H.M., Kunkel L.M. 1996. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* V. 6. P. 25. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00780.x>
- Sweeney H.L., Holzbaur E.L.F. 2018. Motor proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 10: a021931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>
- Volkov E.M., Nurullin L.F., Svandová I., Nikolsky E.E., Vyskocil F. 2000. Participation of electrogenic Na^+, K^+ -ATPase in the membrane potential of earthworm body wall muscles. *Physiol. Res.* V. 49. P. 481. http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/49/49_481.pdf
- Wang Y., Mattson M.P., Furukawa K. 2002. Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J. Neurochem.* V. 82. P. 945. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01059.x>
- Wells L., Edwards K.A., Bernstein S.I. 1996. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *EMBO J.* V. 15. P. 4454. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00822.x>
- Wilson D.G.S., Tinker A., Iskratsch T. 2022. The role of the dystrophin glycoprotein complex in muscle cell mechanotransduction. *Commun. Biol.* V. 5. P. 1022. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03980-y>

IMMUNOFLUORESCENT IDENTIFICATION OF DYSTROPHIN, ACTIN, MYOSIN LIGHT AND HEAVY CHAINS IN SOMATIC MUSCLE CELLS OF EARTHWORM *Lumbricus terrestris*

L. F. Nurullin^{a, b, *}, E. M. Volkov^{a, **}

^a Kazan state medical university, Kazan, 420012, Russia

^b Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, 420111, Russia

* E-mail: lenizn@yandex.ru

** E-mail: euroworm@mail.ru

In muscle cells of the motor muscles of the earthworm *Lumbricus terrestris* dystrophin, actin, fast and slow isoforms of myosin heavy chains were identified by fluorescence microscopy. It can be assumed that the expression of these proteins was carried out at the earliest stages of the evolutionary formation of the intracellular contractile apparatus of the motor tissue in both invertebrates and vertebrates. This study will complement the picture of the evolutionary formation of motor muscle tissue.

Keywords: dystrophin, actin, myosin, somatic muscle, annelids