

## ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ *Arg91Gly* И *Glu139del* В БЕТА-ТРОПОМИОЗИНЕ, СВЯЗАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННОЙ МИОПАТИЕЙ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЧЕЛОВЕКА, НА АКТИН-МИОЗИНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

© Н. А. Рысев,<sup>1</sup> О. Е. Карничева,<sup>1</sup> В. В. Сиренко,<sup>1</sup>  
А. О. Симонян,<sup>1,2</sup> Ч. С. Рэдвуд,<sup>3</sup> Ю. С. Боровиков<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

<sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, и

<sup>3</sup> Университет Оксфорда, Госпиталь Джона Рэдклиффа, Оксфорд, OX3 9DU, Великобритания;

\* электронный адрес: borovikov@incras.ru

В основе некоторых наследственных заболеваний мышечной ткани человека лежат структурные изменения белков сократительного аппарата мышечного волокна и нарушение их функции вследствие точечных мутаций в этих белках. Одними из таких заболеваний являются кэп-миопатия и дистальный артрогрипоз, которые могут быть связаны с мутациями тропомиозина. Так, делеция глутаминовой кислоты в позиции 139 β-тропомиозина приводит к развитию кэп-миопатии, а замена аргинина в позиции 91 на глицин в этом белке — к дистальному артрогрипозу. Для того чтобы понять, как мутации *Arg91Gly* и *Glu139del* нарушают согласованную работу сократительной системы мышечного волокна, были получены рекомбинантные формы β-тропомиозина человека (дикого типа и содержащие мутации) и встроены в тонкие нити теневого мышечного волокна. Флуоресцентные зонды 1,5-IAEDANS или ФИТЦ-фаллоидин были специфически связаны соответственно с Cys707 субфрагмента-1 миозина и тремя соседними мономерами актина. С помощью метода поляризационной микрофлуориметрии были получены данные о пространственной организации актина и миозина при моделировании различных состояний АТФазного цикла (в присутствии АДФ, АТФ и в отсутствие нуклеотида) при низкой и высокой концентрациях ионов кальция. Оказалось, что обе мутации влияют на конформационные перестройки актина и головки миозина в цикле гидролиза АТФ, что может быть вызвано аномальным поведением тропомиозина в процессе регуляции. Обнаруженные изменения в работе сократительной системы мышечного волокна могут являться одной из причин появления мышечной слабости при наследственных миопатиях, ассоциированных с этими мутациями.

Ключевые слова: мутация в тропомиозине, наследственная миопатия, актин-миозинное взаимодействие, регуляция мышечного сокращения, мышечное волокно, поляризованная флуоресценция.

Принятые сокращения: АТФ — аденозинтрифосфорная кислота, АДФ — аденозиндифосфорная кислота, F-актин — фибриллярный актин, ФИТЦ — флуоресцеин 5-изотиоцианат, ЭГТА — этиленгликольтетраацетат, ЭДТА — этилендиаминтетраацетат, 1,5-IAEDANS — N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)этилендиамин, PMSF — фенилметилсульфонил флуорид, S1 — субфрагмент-1 миозина.

Хорошо известно, что мышечное сокращение происходит вследствие взаимодействия актина и миозина, сопровождаемого гидролизом АТФ. Регуляция этого взаимодействия осуществляется тропомиозином и кальций-чувствительным белком тропонином, которые формируют с F-актином тонкую нить саркомера мышечного волокна. Предполагается, что при низкой концентрации Ca<sup>2+</sup> тропонин, взаимодействуя с мономерами актина, выключает их (Borovikov et al., 2009) и смещает тропомиозин к внешнему домену актина в «блокирующую» позицию (Lehman et al., 2013). Выключенные мономеры актина не способны активировать гидролиз АТФ в головке миозина. При этом тропомиозин закрывает области на актиновой нити, с которыми миозин способен образовывать как сильные, так и слабые формы связывания (McKillop, Geeves, 1993; Lehman, 2016), а выключенные мономеры помогают тропомиозину осуществлять

блокирующую функцию (Borovikov et al., 2017). Активация сокращения мышечного волокна происходит при увеличении концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> в саркомере и их связывании с тропонином. При этом тропонин включает мономеры актина, которые становятся способными активировать гидролиз АТФ в миозине, и сдвигает тропомиозин по направлению к внутреннему домену актина в «закрытую» позицию, позволяя миозину образовывать слабые формы связывания с актином (Galinska-Rakoczy et al., 2008; Lehman, 2016). Генерация силы осуществляется поперечными миозиновыми мостиками и происходит при практически полном включении мономеров актина и смещении тропомиозина дальше к внутреннему домену актина в «открытую» позицию (Borovikov et al., 2009, 2017; Lehman, 2016).

Показано, что точечные мутации в генах мышечных белков могут приводить к серьезным структурным и фун-

кциональным нарушениям в мышечном волокне и быть причиной тяжелых заболеваний сердечной и скелетной мускулатуры человека. Так, в генах тропомиозина идентифицировано уже более 50 мутаций, вызывающих различные наследственные заболевания мышечной ткани (Wallgren-Pettersson et al., 2011; Marttila et al., 2012). Одними из таких заболеваний являются кэп-миопатия и дистальный артрогрипоз. Первое заболевание может быть связано с делецией остатка глутаминовой кислоты в позиции 139  $\beta$ -тропомиозина (ген *TPM2*, мутация *Glu139del*, или *E139X*), тогда как второе заболевание может быть вызвано заменой остатка аргинина в позиции 91 на остаток глицина в этом же белке (мутация *Arg91Gly*, или *R91G*).

Кэп-миопатия была впервые описана в 1981 г. (Fidzianska et al., 1981). При этом заболевании наблюдается накопление шапочкообразных (кэп) структур, состоящих из дезорганизованных сократительных белков и белков Z-линии, под сарколеммой мышечных волокон. Характерным клиническим признаком является медленно прогрессирующая мышечная слабость. Дистальный артрогрипоз — это врожденный порок развития, характеризующийся недоразвитием мышечной и нервной тканей с формированием множественных контрактур и деформацией суставов. Термин «артрогрипоз» впервые был введен Штерном в 1923 г. и в переводе с греческого означает «кривые (или когтеобразные) суставы». Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих заболеваний, до настоящего времени остаются невыясненными. В связи с этим их диагностика и лечение затруднены (Marttila et al., 2012).

В настоящей работе исследовали влияние мутаций *E139X* и *R91G* на регуляцию тропонин-тропомиозиновым комплексом актин-миозинового взаимодействия в одиночном мышечном волокне в различных состояниях АТФазного цикла с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии.

### Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: хлорид калия,  $MgCl_2$ , хлорид натрия,  $CaCl_2$ , фосфорнокислый двузамещенный натрий ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ), фосфорнокислый однозамещенный безводный калий ( $KH_2PO_4$ ), карбонат ( $Na_2CO_3$ ) и гидрокарбонат натрия ( $NaHCO_3$ ), карбонат калия ( $K_2CO_3$ ), азид натрия ( $NaN_3$ ), ЭДТА, PMSF, ЭГТА, глицерин, уксусная кислота, соляная кислота, фенолфталеин, дититреитол, Трис,  $\alpha$ -химотрипсин, АТФ, АДФ и ФИТЦ-фаллоидин (Sigma, США), 1,5-IAEDANS (Invitrogen, США).

Получение глицеринизированных мышечных волокон. Работа выполнена на одиночных мышечных волокнах скелетных мышц кролика с реконструированной сократительной и регуляторной системой. Мышечные волокна получали из *m. psoas* кролика по методу Сент-Дьёрдьи (Szent-Gyorgyi, 1949). Пучок мышечных волокон диаметром около 2 мм выделяли из поясничной мышцы кролика и закрепляли при длине покоя на распялках, а затем помещали на 1 сут в охлажденный до 4 °С глицеринизирующий раствор, содержащий 50 % глицерина, 100 мМ KCl, 1 мМ  $MgCl_2$  и фосфатный буфер (67 мМ, pH 7.0). Через 1 сут пучки мышечных волокон переносили в новую порцию глицеринизирующего раствора на 24 ч. В следующей порции этого раствора материал хранили при -20 °С в течение 3—4 мес. За 2 ч до эк-

сперимента из пучков выделяли одиночные волокна и помещали их в охлажденный до 4 °С отмывающий раствор, содержащий 100 мМ KCl, 1 мМ  $MgCl_2$  и фосфатный буфер (67 мМ, pH 7.0).

Приготовление теневых мышечных волокон. «Теневые» мышечные волокна, состоящие на более чем 80 % из актина, получали из одиночных глицеринизированных мышечных волокон кролика путем экстракции миозина, тропомиозина и тропонина. Для этого волокна помещали в экстрагирующий раствор, содержащий 800 мМ KCl, 1 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ АТФ и 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0), и инкубировали при постоянном медленном помешивании в этом растворе в течение 1.5 ч при 25 °С. Далее теневые мышечные волокна закрепляли на предметных стеклах и помещали в отмывающий раствор, содержащий 100 мМ KCl, 1 мМ  $MgCl_2$ , 67 мМ фосфатный буфер (pH 7.0).

Получение миозина и субфрагмента-1 миозина. Миозин выделяли из скелетных мышц кролика методом, предложенным Ивановым и Юрьевым (1961), с модификациями. Субфрагмент-1 миозина (S1), не содержащий регуляторных легких цепей, получали ограниченным протеолизом скелетного миозина  $\alpha$ -химотрипсином (Okamoto, Sekine, 1985) в буфере, содержащем 10 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 120 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА и 1 мМ  $NaN_3$ , при весовом соотношении миозина и химотрипсина 300 : 1, при 25 °С и постоянном перемешивании в течение 20 мин. Реакцию расщепления ингибировали добавлением PMSF до конечной концентрации 1 мМ и охлаждением на льду. Затем добавляли раствор  $Mg^{2+}$  до концентрации 3 мМ и центрифугировали при 10 000  $xg$  в течение 15 мин. Супернатант смешивали с двумя объемами насыщенного раствора сульфата аммония (до 70 % насыщения) и центрифугировали при 10 000  $xg$  в течение 15 мин. Осадок S1 растворяли в 1 мл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ  $MgCl_2$ , 0.1 мМ дититреитола и 0.1 мМ  $NaN_3$ , а затем диализовали в течение ночи против того же буфера.

Получение рекомбинантного  $\beta$ -тропомиозина. Рекомбинантный  $\beta$ -тропомиозин мутантных форм получали с помощью метода сайтнаправленного мутагенеза и системы бактериальной экспрессии *Escherichia coli* BL21(DE3), как описано ранее (Karpicheva et al., 2016). Полученный препарат подвергали сухой заморозке и хранили при -70 °С.

Модификация мышечных белков флуоресцентными зондами. F-актин теневых волокон окрашивали ФИТЦ-фаллоидином непосредственно в мышечном волокне. Для этого мышечное волокно инкубировали в отмывающем растворе (см. выше), содержащем 40 мкМ красителя, в течение 20 мин при 25 °С (Galazkiewicz et al., 1987). Согласно опубликованным данным (Oda et al., 2005), производные фаллоидина связываются с актином в области контакта трех мономеров актина. Модификацию наиболее реактивной сульфгидрильной группы субфрагмента-1 миозина SH1 (остатка Cys707) флуоресцентным красителем 1,5-IAEDANS осуществляли по описанному методу (Borejdo, Putnam, 1977). Для этого S1 в буфере, содержащем 60 мМ KCl, 0.1 мМ дититреитола и 30 мМ Трис-HCl (pH 7.5), смешивали с 3-кратным количеством красителя в течение 18 ч при 4 °С. Реакцию останавливали избыточным количеством дититреитола. Невсвязавшийся краситель удаляли диализом против раствора, содержащего 10 мМ KCl, 1 мМ  $MgCl_2$ , 0.1 мМ дититреитола и 10 мМ трис-HCl (pH 6.8). Препарат очи-

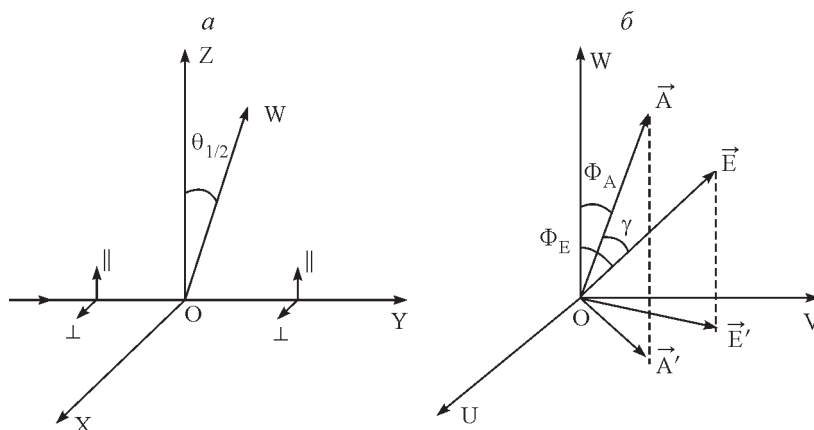


Рис. 1. Диаграммы угловых координат тонкой нити (а) и диполей поглощения ( $O_A$ ) и излучения ( $O_E$ ) флуорофора (б). а: ось актинового филамента (OW) отклоняется от длинной оси мышечного волокна (OZ) на угол  $\theta_{1/2}$ ; знаки  $\perp$  и  $\parallel$  обозначают параллельную и перпендикулярную составляющие поляризованного света. б: осцилляторы поглощения (A) и излучения (E) расположены вдоль образующей поверхности конусов, оси которых совпадают с осью OW, и образуют соответственно углы  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$  при вершине конусов.

щали с помощью колонки с наполнителем Sephadex G-25. Степень модификации, рассчитанная с помощью коэффициента поглощения  $6100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 336 нм, составила 0.90—0.95.

Тропонин выделяли из скелетных мышц кролика в соответствии с методом, предложенным Поттером (Potter, 1982).

Определение актинактивированной АТФазы S1. Скорость АТФазной реакции определяли в растворе, содержащем 1 мкМ S1, 7 мкМ F-актина, 3 мкМ тропонина и 3 мкМ тропомиозина дикого типа или мутантного (мутации *E139X* и *R91G*), в буфере следующего состава: 12 мМ трис-HCl (pH 7.9), 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 15 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 0.2 мМ дитиотреитола и 2 мМ АТФ при 25 °С. Реакцию проводили в диапазоне концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  от  $10^{-9}$  до  $10^{-4}$  М. Концентрацию свободного  $\text{Ca}^{2+}$  рассчитывали в присутствии 2 мМ ЭГТА, используя программу Maxchelator. Реакцию останавливали через 10 мин, добавляя трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5 %. Количество образовавшегося неорганического фосфата определяли методом Фиске и Суббарроу (Fiske, Subbarow, 1925). Было проведено по 3 эксперимента. Статистическую обработку данных, вычисление значения  $p\text{Ca}_{50}$  и построение графиков осуществляли с помощью программы GraphPad Prism.

Поляризационная микрофлуориметрия. Измерение параметров поляризованной флуоресценции зондов, связанных с актином и миозином, проводили на поляризационном микрофлуориметре (Borovikov et al., 2004). Флуоресценцию зондов 1,5-IAEDANS и ФИТЦ-фаллоидин возбуждали светом с длинами волн  $407 \pm 5$  и  $436 \pm 5$  нм соответственно. Флуоресценцию регистрировали в диапазоне 500—600 нм. Измерения проводили в растворе, содержащем 10 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ  $\text{NaN}_3$ , 6.7 мМ Na-, К-фосфатный буфер (pH 7.0) и 0.1 мМ  $\text{CaCl}_2$  или 2 мМ ЭГТА, в отсутствие или в присутствии 2.5 мМ АДФ или 5 мМ АТФ (Borovikov et al., 2009).

Для каждого волокна регистрировали значения четырех составляющих интенсивности поляризованной флуоресценции —  $\parallel I_{\parallel}$ ,  $\perp I_{\perp}$ ,  $\perp I_{\parallel}$ ,  $\parallel I_{\perp}$ , где индексы слева от  $I$  обозначают параллельное ( $\parallel$ ) и перпендикулярное ( $\perp$ ) направления поляризации возбуждающего света, а индексы справа от  $I$  — параллельное и перпендикулярное направ-

ления поляризации флуоресценции зондов относительно оси волокна. Математическая модель, в соответствии с которой производился анализ экспериментальных данных, основана на следующих допущениях (Каулин, 1968; Розанов и др., 1971; Tregear, Mendelson, 1975; Yanagida, Oosawa, 1978; Wilson, Mendelson, 1983; Irving, 1996; Borovikov et al., 2004). Мышечное волокно рассматривается как цилиндрически симметричная система с осью симметрии, ориентированной вдоль волокна. В волокне имеются хаотически расположенные флуорофоры (N) и флуорофоры, ориентированные по спирали (1-N). Флуорофоры неподвижны и не взаимодействуют между собой. Элементарные акты поглощения и испускания света осуществляются линейными, полностью анизотропными осцилляторами поглощения (A) и излучения (E), которые жестко связаны с молекулами флуорофора. Оси осцилляторов, ориентированных флуорофоров располагаются по спирали вдоль образующей поверхности конуса, ось которого совпадает с осью F-актина. Осцилляторы поглощения и излучения образуют при вершине конусов углы  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$  соответственно (рис. 1). Угол  $\gamma$  между осями осцилляторов поглощения и излучения является постоянной величиной для флуорофоров каждого данного зонда. Тонкая нить является гибкой и может отклоняться от оси мышечного волокна на угол  $\theta_{1/2}$ . Соотношения четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции  $\parallel I_{\perp}/\perp I_{\parallel}$ ,  $\perp I_{\perp}/\perp I_{\parallel}$  и  $\perp I_{\parallel}/\parallel I_{\perp}$  рассматривали как функции углов  $\Phi_A$ ,  $\Phi_E$ ,  $\theta_{1/2}$  и числа хаотически расположенных флуорофоров N (Kakol et al., 1987). В рамках описываемой модели  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$  являются показателями ориентации флуорофоров в волокне,  $\theta_{1/2}$  позволяет определить жесткость тонкой нити на изгиб, тогда как величина N прямо пропорциональна подвижности флуорофоров. Поскольку изменения  $\Phi_A$  были аналогичны изменениям  $\Phi_E$ , значения угла  $\Phi_A$  в работе не приводятся. Статистическую достоверность изменений параметров флуоресценции оценивали с помощью критерия Стьюдента, равного 0.95.

## Результаты и обсуждение

В работе исследовали влияние мутаций *E139X* и *R91G* в  $\beta$ -тропомиозине на регуляцию тропонин-тропомиозиновым комплексом актин-миозинового взаимо-

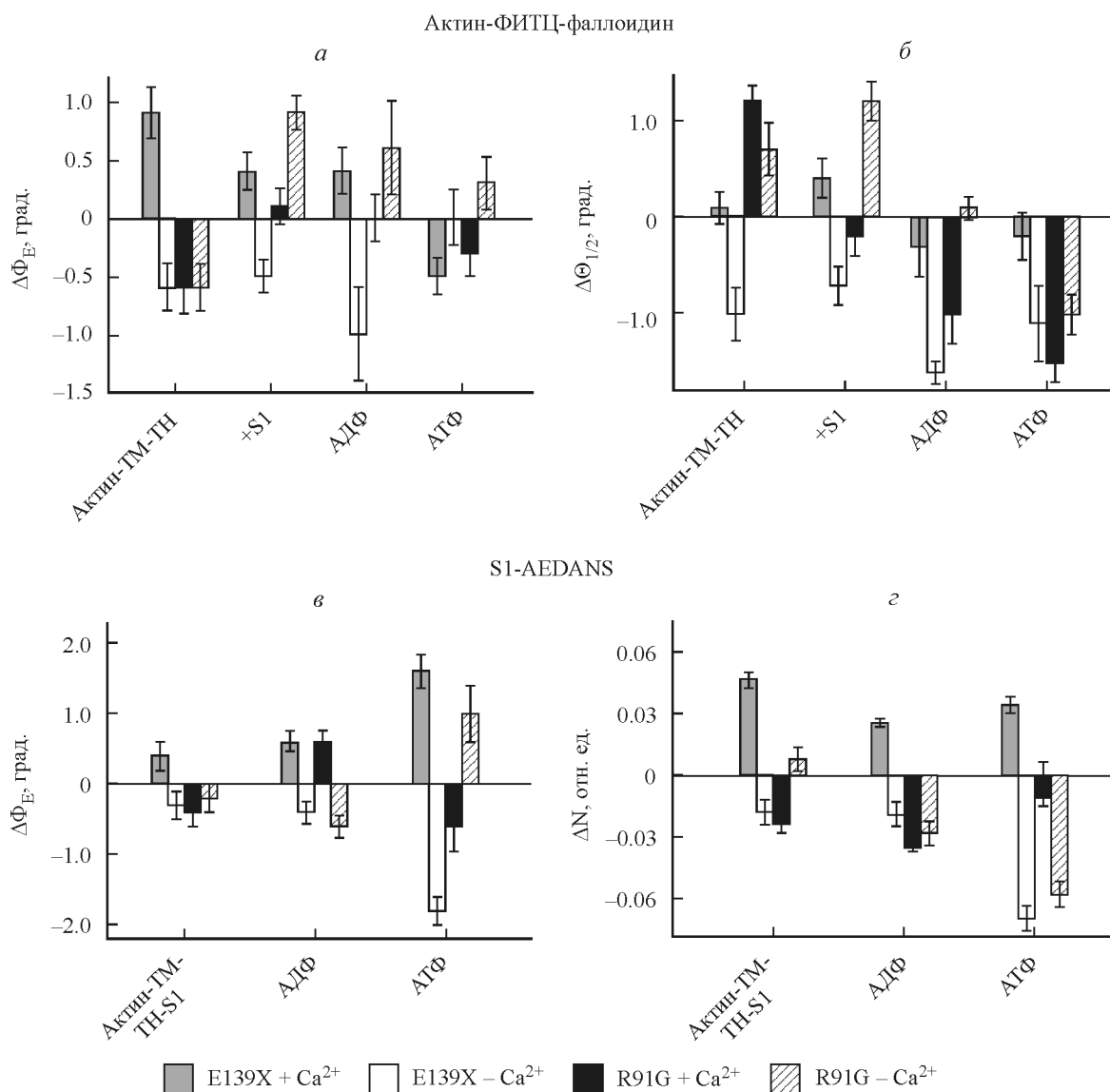


Рис. 2. Изменения значений  $\Phi_E$  (а) и  $\theta_{1/2}$  (б) для комплекса актин—ФИТЦ-фаллоидин, а также  $\Phi_E$  (в) и  $N$  (г) для S1-AEDANS в присутствии *E139X*- и *R91G*-мутантных тропомиозинов относительно соответствующих значений в присутствии контрольного белка (дикого типа) при моделировании различных промежуточных состояний цикла гидролиза АТФ в теновом мышечном волокне.

$\Phi_E$  — угол между диполем излучения флуорофора и осью тонких нитей,  $\theta_{1/2}$  — угол отклонения актиновой нити, характеризующий ее гибкость,  $N$  — количество хаотически ориентированных флуорофоров, +Ca<sup>2+</sup> и (Ca<sup>2+</sup> — данные при высокой и низкой концентрациях ионов кальция соответственно, ТН — тропонин, ТМ — тропомиозин. Все изменения достоверны ( $P < 0.05$ ). Вертикальные отрезки показывают стандартную ошибку среднего значения.

действия с помощью метода поляризационной флуориметрии. Для этого в теновых мышечных волокнах, содержащих чистые актиновые нити, реконструировали сократительную и регуляторную системы. Реконструкция осуществлялась при инкубации теновых мышечных волокон в растворах, содержащих тропомиозин, тропонин и S1. Для того чтобы выявить конформационные изменения в S1, флуоресцентный зонд 1.5-IAEDANS был специфически связан с остатком Cys707, расположенным в области SH1 спирали моторного домена S1 (S1-AEDANS). Для получения информации о конформационных перестройках в актине использовали ФИТЦ-фаллоидин (актин—ФИТЦ-фаллоидин), который специфически связывается с тремя соседними мономерами актина (Oda et al., 2005).

Как следует из данных, представленных на рис. 2, мутация *E139X* в тропомиозине оказывает существенное влияние на структурное состояние актина и на связывание головки миозина с F-актином при моделировании различных состояний цикла гидролиза АТФ. Так, при высокой концентрации Ca<sup>2+</sup> (pCa 4) значение  $\Phi_E$  для комплекса актин—ФИТЦ-фаллоидин, связанного с мутантным тропомиозином, выше на 0,9° по сравнению с тропомиозином дикого типа (рис. 2, а). При низкой концентрации Ca<sup>2+</sup> (pCa 8) значение  $\Phi_E$ , наоборот, ниже соответствующего значения в теновом волокне, содержащем тропомиозин дикого типа (т. е. контрольный тропомиозин). Более высокие и низкие значения параметра  $\Phi_E$  соответственно при высокой и низкой концентрациях Ca<sup>2+</sup> наблюдаются также при моделировании большинства со-

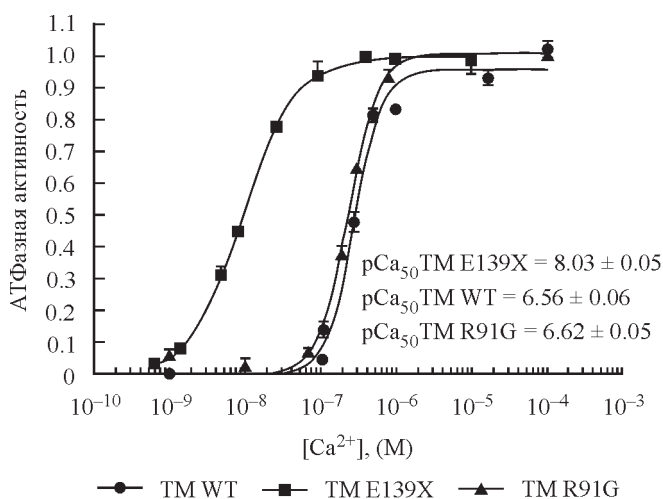


Рис. 3. Зависимость от концентрации ионов кальция АТФазной активности субфрагмента-1 миозина, связанного с актином, в присутствии тропонина и тропомиозина дикого типа или его мутантных форм (E139X и R91G).

АТФазную активность определяли с помощью метода Фиске и Суббароу (Fiske, Subbarow, 1925). ТН — тропонин, ТМ — тропомиозин, ТМ WT — тропомиозин дикого типа.  $pCa_{50}$  — величина, при которой достигается половина максимальной АТФазной активности (кальциевая чувствительность). Вертикальные отрезки показывают стандартную ошибку среднего значения.

стояний АТФазного цикла. Так, при моделировании сильной формы связывания миозина с актином (в присутствии S1 и АДФ) угол  $\Phi_E$  для комплекса актин—ФИТЦ-фаллоидин выше на  $0.4^\circ$  при  $pCa$  4 и ниже на  $0.5^\circ$  при  $pCa$  8. В присутствии АТФ угол  $\Phi_E$  ниже или аналогичен значению  $\Phi_E$ , обнаруженному в экспериментах с тропомиозином дикого типа (рис. 2, а).

Увеличение угла  $\Phi_E$  для комплекса актин—ФИТЦ-фаллоидин может быть интерпретировано как увеличение относительного количества включенных мономеров актина в тонких нитях, тогда как уменьшение этого угла указывает на их уменьшение (Borovikov et al., 2009). Исходя из этого можно предположить, что E139X-мутантный тропомиозин при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  активирует включение актиновых мономеров в тонкой нити (т. е. мономеров, способных активировать образование сильных форм связывания миозина с актином), тогда как при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  вызывает их выключение. Это означает, что в присутствии мутантного тропомиозина с делецией E139 тропонин сохраняет способность осуществлять  $Ca^{2+}$ -зависимую регуляцию актин-миозинового взаимодействия.

Ранее было показано, что мутация E139X приводит к anomalно высокой чувствительности тонких филаментов к  $Ca^{2+}$  (Marston et al., 2013; Marttila et al., 2014). Однако молекулярные механизмы высокой  $Ca^{2+}$ -чувствительности до настоящего времени остаются невыясненными. Наши данные свидетельствуют о том, что anomalно высокая  $Ca^{2+}$ -чувствительность, ассоциированная с мутацией E139X, скорее всего, не связана с нарушением способности тропонина выключать мономеры актина при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ , поскольку тропонин сохраняет свою регуляторную функцию — способность выключать и включать мономеры актина (рис. 2, а).

В присутствии мутации R91G в тропомиозине тропонин также сохраняет свою способность к  $Ca^{2+}$ -зависимой

регуляции. Как следует из данных, представленных на рис. 2, а, при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  (в отсутствие S1) значение  $\Phi_E$  для комплекса актин—ФИТЦ-фаллоидин становится даже ниже тех, которые наблюдали в присутствии контрольного тропомиозина. Это означает, что тропонин увеличивает относительное количество выключенных мономеров актина, т. е. сохраняет способность выключать мономеры актина в тонких нитях при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ . По-видимому, anomalно высокая  $Ca^{2+}$ -чувствительность, показанная в присутствии мутации R91G тропомиозина (Marston et al., 2013), также не связана с ингибированием способности тропонина выключать тонкие нити мышечного волокна.

Следует отметить, что мутации по-разному влияют на способность тропонина включать мономеры актина в тонких нитях при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  (рис. 2, а). Так, в присутствии E139X-мутантного тропомиозина способность тропонина включать мономеры актина увеличивается, тогда как в присутствии R91G-мутантного тропомиозина, наоборот, уменьшается. Действительно, при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  значения угла  $\Phi_E$  в присутствии R91G-мутантного тропомиозина ниже, а в присутствии E139X-мутантного тропомиозина — выше по сравнению с тропомиозином дикого типа (рис. 2, а). Следовательно, в отсутствие S1 мутация E139X увеличивает относительное количество включенных мономеров актина, а мутация R91G в аналогичных экспериментальных условиях уменьшает количество таких мономеров.

В присутствии S1 и нуклеотидов для E139X-мутантного тропомиозина практически во всех моделируемых состояниях цикла гидролиза АТФ наблюдается увеличение включенных мономеров актина при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  и уменьшение таких мономеров при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ . Для мутации R91G при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  в цикле гидролиза АТФ также наблюдается уменьшение количества включенных мономеров, однако при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  относительное количество включенных мономеров актина мало отличается от соответствующего количества в экспериментах с тропомиозином дикого типа (рис. 2, а). Таким образом, мутации R91G и E139X тропомиозина позволяют тропонину осуществлять включение и выключение мономеров актина в тонкой нити при высокой и низкой концентрациях  $Ca^{2+}$  в цикле гидролиза АТФ, однако мутация E139X активирует эту способность, тогда как мутация R91G, наоборот, ее ингибирует (рис. 2, а).

Обе мутации оказывают влияние на гибкость F-актина в тонкой нити. Так, в отсутствие S1 делеция E139 приводит к увеличению значения  $\theta_{1/2}$  на  $0.1^\circ$  при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  и к уменьшению этой величины на  $1.0^\circ$  при низкой концентрации (рис. 2, б). Мутация R91G вызывает увеличение  $\theta_{1/2}$  на  $1.0$  и  $0.7^\circ$  при высокой и низкой концентрациях  $Ca^{2+}$  соответственно (рис. 2, б). Увеличение этого параметра отражает увеличение гибкости актиновой нити (Borovikov et al., 2009). Следовательно, в отсутствие S1 делеция E139 увеличивает гибкость нити при высокой концентрации  $Ca^{2+}$  и значительно снижает ее при низкой концентрации, тогда как мутация R91G приводит к увеличению гибкости актиновой нити как при высокой, так и при низкой концентрации  $Ca^{2+}$ .

Поскольку увеличение гибкости тонкой нити может облегчить связывание головки миозина с актином, можно предположить, что увеличение гибкости, которое наблюдается при низкой концентрации  $Ca^{2+}$  для мутации R91G, может облегчить связывание миозина с актином и вы-

звать повышение чувствительности актомиозина к  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот вывод хорошо согласуется с нашими данными о том, что *R91G*-мутантный тропомиозин увеличивает  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность актомиозина (рис. 3). Из данных рис. 3 следует, что  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность активирующей системы, составленной из актина, субфрагмента-1 миозина, тропонина и *R91G*-мутантного  $\beta$ -тропомиозина, заметно выше чувствительности системы с участием тропомиозина дикого типа. Значительно большая чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  (более чем на порядок) была обнаружена для *E139X*-мутантного тропомиозина (рис. 3), что можно объяснить уменьшением аффинности взаимодействия между мутантным тропомиозином и актиновой нитью. Интересно отметить, что, согласно данным из литературы, взаимодействие между *E139X*-мутантным тропомиозином и актином было настолько слабым, что авторам не удалось исследовать зависимость движения флуоресцентномеченных актиновых филаментов от концентрации кальция в системе искусственной подвижности (Marttila et al., 2012). По-видимому, глутаминовая кислота в положении 139 является важной для связывания тропомиозина с актином. Действительно, было показано, что эта аминокислота, находясь в положении *f* гептопептидного повтора, образует связь с актином (Brown et al., 2005). В то же время делеция E139 лишь незначительно нарушает скрученную спираль димера тропомиозина на участке между аминокислотами 138—154 (Lehtokari et al., 2007), что указывает на то, что нарушение структуры суперспирали не является основной причиной патологии.

Как следует из данных рис. 2, мутация *R91G* вызывает уменьшение гибкости актина в тонкой нити при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при моделировании всех форм связывания S1 с актином. При низкой же концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  эта мутация вызывает увеличение гибкости F-актина при моделировании сильных форм связывания и уменьшение гибкости F-актина при моделировании слабых форм связывания миозина с актином (рис. 2, б). В противоположность этому мутация *E139X* уменьшает жесткость тонкой нити почти во всех формах связывания как при высокой, так и при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , за исключением сильной формы связывания в отсутствие нуклеотидов при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ . В случае мутации *E139X* также обнаружено увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности (Robinson et al., 2007; Marttila et al., 2012; Marston et al., 2013), однако корреляции между увеличением чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  и увеличением гибкости актина не обнаружено (рис. 2, б).

Ранее было показано, что при переходе мышечного волокна из расслабленного состояния в ригор увеличение относительного количества включенных мономеров актина в тонких нитях сопровождается смещением тропомиозина к внутреннему актиновому домену и увеличением относительного количества головок миозина, которые образуют с актином сильную форму связывания, существенную для генерации силы (Borovikov et al., 2009). Эта закономерность наблюдается также в присутствии тропомиозина и тропонина дикого типа (Borovikov et al., 2009). Данные, представленные на рис. 2, в, указывают на то, что мутации *R91G* и *E139X* тропомиозина могут нарушать эту закономерность. Оказалось, что увеличение относительного количества включенных мономеров актина для этих мутаций не всегда сопровождается увеличением относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином. Так, делеция глутаминовой кислоты в

позиции 139 приводит к увеличению значения  $\Phi_E$  для S1-IAEDANS при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и к уменьшению этой величины при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 2, в) при моделировании большинства состояний АТФазного цикла. Увеличение этого параметра интерпретируется как уменьшение относительного количества головок миозина, образующих сильную форму связывания с актином (Borovikov et al., 2009). Таким образом, наблюдается снижение относительного количества S1 в сильной форме связывания при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при одновременном увеличении количества включенных мономеров актина. При низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  происходит увеличение количества S1 в сильной форме связывания с актином и уменьшение количества включенных мономеров актина (рис. 2, а, в). Следовательно, эта мутация тропомиозина сопровождается нарушением корреляции между включением мономеров актина и образованием сильных форм связывания миозина с актином, которая характерна для тропомиозина дикого типа. Таким образом, полученные данные указывают на нарушение регуляции актин-миозинового взаимодействия *E139X*-мутантным тропомиозином. Несмотря на сохранение способности тропонина включать и выключать мономеры актина в тонкой нити, тропомиозин утрачивает способность предотвращать образование сильной формы связывания миозина с актином при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , а при высокой концентрации ионов ослабляет способность тропонина активировать образование сильной формы связывания миозина с актином (рис. 2, а, б). Появление сильно связанных головок миозина при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  указывает на то, что мутация *E139X* тропомиозина вызывает увеличение чувствительности актомиозина к  $\text{Ca}^{2+}$ . Этот вывод согласуется с данными, представленными на рис. 3, где показано, что мутация *E139X* заметно увеличивает  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность актомиозина.

Надо отметить, что при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  эта мутация приводит к увеличению величины N (рис. 2, з), что интерпретируется как увеличение подвижности головок миозина. Это может быть связано с уменьшением сродства миозина к актину (Borovikov et al., 2009). При низкой же концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  делеция увеличивает подвижность S1 в отсутствие нуклеотида и уменьшает ее в присутствии АТФ. В параллельных экспериментах относительное количество включенных мономеров актина увеличивается и уменьшается при высокой и низкой концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  соответственно (рис. 2, а). Следовательно, и в этих экспериментах наблюдается нарушение согласованных перестроек актина и миозина.

Мутация *R91G* при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивает относительное количество головок миозина, образующих сильные формы связывания в отсутствие нуклеотида и в присутствии АТФ и уменьшает их количество в присутствии АДФ (рис. 2, з). При низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  эта мутация приводит к увеличению числа головок миозина, жестко связанных с актином при моделировании сильных форм связывания, и к уменьшению их количества при моделировании слабой формы связывания (в присутствии АТФ). Данные изменения согласуются с картиной изменений в поведении актина в тонкой нити. Увеличение относительного количества включенных мономеров актина коррелирует с увеличением относительного количества молекул головок миозина, образующих с актином сильную форму связывания. Следовательно, мутация *R91G* не нарушает согласованности

между изменениями конформации актина и миозина. При низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при моделировании большинства состояний АТФазного цикла увеличивается относительное количество включенных мономеров актина и головок миозина, которые образуют с актином сильную форму связывания, существенную для генерации силы. Это может привести к усилению сократительной функции мышечной ткани, которая типична для дистального артрогрипоза, связанного с мутацией *R91G* (Marttila et al., 2012).

Известно, что клинические симптомы, описанные у пациентов с мутациями *R91G* и *E139X*, несколько отличаются друг от друга. Так, мутация *R91G* вызывает контрактуру мышечной ткани (Sung et al., 2003), тогда как таких аномальных изменений мышечной ткани в присутствии *E139X*-мутантного тропомиозина обнаружено не было (Marttila et al., 2012). Наши данные свидетельствуют о том, что на молекулярном уровне эти мутации также демонстрируют некоторые различия. В случае мутации *E139X* при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  моделирование различных состояний АТФазного цикла приводит к увеличению относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином. Появление ригорных миозиновых мостиков обнаружено даже при моделировании расслабления мышечного волокна (рис. 2, в). Понятно, что появление таких мостиков при расслаблении волокна, а также увеличение относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином в цикле гидролиза АТФ, могут не только привести к ослаблению сократительной функции, но и вызвать разрывы мышечной ткани. Возможно, появление таких миозиновых мостиков является одной из причин образования кэп-структур, которые типичны для миопатии, связанной с мутацией *E139X* тропомиозина (Marttila et al., 2012). В противоположность этому в присутствии *R91G*-мутантного тропомиозина не было обнаружено заметного появления ригорных миозиновых мостиков при моделировании расслабления мышечного волокна (рис. 2, в), однако и эта мутация вызывает увеличение относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином, что может привести к ослаблению сократительной функции мышечной ткани, содержащей *R91G*-мутантный тропомиозин.

Считается, что основная причина дисфункции мышечной ткани, которая связана с мутациями тропомиозина в позициях 91 и 139 аминокислотной последовательности, заключается в повышении чувствительности тонких нитей к ионам кальция, что впервые было показано *in vitro* motility assay (Robinson et al., 2007; Marttila et al., 2012; Marston et al., 2013). Наши данные не противоречат таким представлениям. Действительно, данные, представленные на рис. 2 и 3, свидетельствуют о том, что при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  поперечные мостики способны образовывать с актином сильную форму связывания, существенную для генерации силы.

Ранее было показано, что в отсутствие тропомина мутации *E139X* и *R91G* вызывают смещение тропомиозина к внутреннему домену актина, что сопровождается соответственно уменьшением и увеличением относительного количества головок миозина, сильно связанных с актином в цикле гидролиза АТФ. В параллельных исследованиях мутации *E139X* и *R91G* вызывают соответственно увеличение и уменьшение относительного количества включенных мономеров актина (Borovikov et al., 2015), т. е. в отсутствие тропомина данные о влиянии мутаций

на конформационные перестройки актомиозина близки к тем, которые были получены в настоящей работе в присутствии тропомина при высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 2, а, в). Поскольку тропоин сохраняет способность осуществлять  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в присутствии этих мутантных тропомиозинов, можно предположить, что именно мутации тропомиозина вызывают такие изменения в конформации этого белка, которые приводят к измененному ответу актина и головок миозина в АТФазном цикле, тогда как тропоин сохраняет свои регуляторные функции.

Таким образом, одной из причин нарушения сократительной функции, описанной в литературе для мышечной ткани, содержащей *E139X*- и *R91G*-мутантные формы тропомиозина (Muthuchamy et al., 1999; Sung et al., 2003; Kremneva et al., 2004; Ochala et al., 2008; Marston et al., 2013), является, по-видимому, аномальное поведение мутантных форм тропомиозина в цикле гидролиза АТФ и нарушение взаимодействия миозина с актином.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-00865; изучение конформационных перестроек актина и S1 в присутствии тропомина и мутантных форм тропомиозина) и Российского научного фонда (проект 17-14-01224; получение рекомбинантного тропомиозина дикого типа и мутантных форм, моделирование различных состояний АТФазного цикла, а также определение функциональных свойств исследуемых белков).

#### Список литературы

- Иванов И. И., Юрьев В. А. 1961. Биохимия и патобиохимия мышц. Л.: Медгиз. 271 с. (Ivanov I. I., Yur'ev V. A. 1961. Biochemistry and pathobiochemistry of muscles. Leningrad: Medgiz. 271 p.)
- Каулин А. Б. 1968. Поляризованная флуоресценция акридинового оранжевого в мышечных волокнах в норме и при повреждении. Цитология. 10 (1): 123—125. (Kaulin A. B. 1968. Polarized fluorescence of acridine orange in muscle fibers in normal and damaged. Tsitologiya. 10 (1): 123—125.)
- Розанов Ю. М., Черноградская Н. А., Барский И. Я., Боровиков Ю. С., Шудель М. С. 1971. Поляризованная ультрафиолетовая флуоресценция мышечных волокон и некоторых других цитологических анизотропных объектов. Цитология. 13 (2): 190—200. (Rozanov Y. M., Chernogradskaya N. A., Barskii I. Y., Borovikov Y. S., Shudel M. S. 1971. Polarized ultraviolet fluorescence of muscle fibers and some other cytological anisotropic objects. Tsitologiya. 13 (2): 190—200.)
- Borejdo J., Putnam S. 1977. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibres in rigor and relaxation. Biochim. biophys. acta. 459: 578—595.
- Borovikov Y. S., Avrova S. V., Rysev N. A., Sirenko V. V., Simonyan A. O., Chernev A. A., Karpicheva O. E., Piers A., Redwood C. S. 2015. Aberrant movement of  $\beta$ -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. Arch. Biochem. Biophys. 577—578: 11—23.
- Borovikov Y. S., Dedova I. V., dos Remedios C. G., Vikhoreva N. N., Vikhorev P. G., Avrova S. V., Hazlett T. L., Van Der Meer B. W. 2004. Fluorescence depolarization of actin filaments in reconstructed myofibers: the effect of S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin. Biophys. J. 86: 3020—3029.
- Borovikov Y. S., Karpicheva O. E., Avrova S. V., Robinson P., Redwood C. S. 2009. The effect of the dilated cardiomyopathy-causing mutation Glu54Lys of alpha-tropomyosin on actin-myosin in-

teractions during the ATPase cycle. Arch. Biochem. Biophys. 489 : 20—24.

Borovikov Y.S., Rysev N.A., Avrova S.V., Karpicheva O.E., Borovs D., Moraczewska J. 2017. Molecular mechanisms of deregulation of the thin filament associated with the R167H and K168E substitutions in tropomyosin Tpm 1.1. Arch. Biochem. Biophys. 614 : 28—40.

Brown J. H., Zhou Z., Reshetnikova L., Robinson H., Yammani R. D., Tobacman L. S., Cohen C. 2005. Structure of the mid-region of tropomyosin: bending and binding sites for actin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 18 878—18 883.

Fidzianska A., Baburska B., Ryniewicz B., Dembek I. 1981. «Cap disease»: new congenital myopathy. Neurology. 31 : 1113—1120.

Fiske C. H., Subbarow Y. 1925. Determination of inorganic phosphate. J. Biol. Chem. 66 : 375—400.

Galazkiewicz B., Borovikov Y. S., Dabrowska R. 1987. The effect of caldesmon on actin-myosin interaction in skeletal muscle fibers. Biochim. biophys. acta. 916 : 368—375.

Galińska-Rakoczy A., Engel P., Xu C., Jung H., Craig R., Tobacman L. S., Lehman W. 2008. Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. J. Mol. Biol. 79 : 929—935.

Irving M. 1996. Steady-state polarization from cylindrically symmetric fluorophores undergoing rapid restricted motion. Biophys. J. 70 : 1830—1835.

Kakol I., Borovikov Y. S., Szczesna D., Kirillina V. P., Levitsky D. I. 1987. Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost fibre induced by phosphorylated or dephosphorylated heavy meromyosin. Biochim. biophys. acta. 913 : 1—9.

Karpicheva O. E., Simonyan A. O., Kuleva N. V., Redwood C. S., Borovikov Y. S. 2016. Myopathy-causing Q147P TPM2 mutation shifts tropomyosin strands further towards the open position and increases the proportion of strong-binding cross-bridges during the ATPase cycle. Biochim. biophys. acta. 1864 : 260—267.

Kremneva E., Boussouf S., Nikolaeva O., Maytum R., Geeves M. A., Levitsky D. I. 2004. Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin, Asp175Asn and ArgGlu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin. Biophys. J. 87 : 3922—3933.

Lehman W. 2016. Thin filament structure and the steric blocking model. Compr. Physiol. 6 : 1043—1069.

Lehman W., Orzechowski M., Li X. E., Fischer S., Raunser S. 2013. Gestalt-binding of tropomyosin on actin during thin filament activation, J. Muscle Res. Cell Motil. 34 : 155—163.

Lehtokari V. L., Ceuterick-de Groote C., de Jonghe P., Marttila M., Laing N. G., Pelin K., Wallgren-Pettersson C. 2007. Cap disease caused by heterozygous deletion of the beta-tropomyosin gene TPM2. Neuromuscul Disord. 17 : 433—442.

Marston S., Memo M., Messer A., Papadaki M., Nowak K., McNamara E., Ong R., El-Mezgueldi M., Li X., Lehman W. 2013. Mutations in repeating structural motifs of tropomyosin cause gain of function in skeletal muscle myopathy patients. Hum. Mol. Genet. 22 : 4978—4987.

Marttila M., Lehtokari V. L., Marston S., Nyman T. A., Barnerias C., Beggs A. H., Bertini E., Ceyhan-Birsoy O., Cintas P., Gerard M., Gilbert-Dussardier B., Hogue J. S., Longman C., Eymard B., Frydman M., Kang P. B., Klinge L., Kolski H., Lochmüller H., Magy L., Manel V., Mayer M., Mercuri E., North K. N.,

Peudenier-Robert S., Pihko H., Probst F. J., Reisin R., Stewart W., Taratuto A. L., de Visser M., Wilichowski E., Winer J., Nowak K., Laing N. G., Winder T. L., Monnier N., Clarke N. F., Pelin K., Grönholm M., Wallgren-Pettersson C. 2014. Mutation update and genotype-phenotype correlations of novel and previously described mutations in TPM2 and TPM3 causing congenital myopathies. Hum. Mutat. 35 : 779—790.

Marttila M., Lemola E., Wallefeld W., Memo M., Donner K., Laing N. G., Marston S., Gronholm M., Wallgren-Pettersson C. 2012. Abnormal actin binding of aberrant beta-tropomyosins is a molecular cause of muscle weakness in TPM2-related nemaline and cap myopathy. Biochem J. 442 : 231—239.

McKillop D. F., Geeves M. A. 1993. Regulation of the interaction between actin and myosin S1 : evidence for three states of the thin filament. Biophys. J. 65 : 693—701.

Muthuchamy M., Pieples K., Rethinasamy P., Hoit B., Grupp I. L., Boivin G. P., Wolska B., Evans C., Solaro R. J., Wieczorek D. F. 1999. Mouse model of a familial hypertrophic cardiomyopathy mutation in alpha-tropomyosin manifests cardiac dysfunction. Circ. Res. 85 : 47—56.

Ochala J., Li M., Ohlsson M., Oldfors A., Larsson L. 2008. Defective regulation of contractile function in muscle fibres carrying an E41K beta-tropomyosin mutation. J. Physiol. 586 : 2993—3004.

Oda T., Namba K., Maeda Y. 2005. Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. Biophys. J. 88 : 2727—2736.

Okamoto Y., Sekine T. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. J. Biol. Chem. 98 : 1143—1145.

Potter J. D. 1982. Preparation of troponin and its subunits. Methods Enzym. 85 : 241—263.

Robinson P., Lipscomb S., Preston L. C., Altin E., Watkins H., Ashley C. C., Redwood C. S. 2007. Mutations in fast skeletal troponin I, troponin T, and beta-tropomyosin that cause distal arthrogryposis all increase contractile function. FASEB J. 21 : 896—905.

Sung S. S., Brassington A. M., Grannatt K., Rutherford A., Whitby F. G., Krakowiak P. A., Jorde L. B., Carey J. C., Bamshad M. 2003. Mutations in genes encoding fast-twitch contractile proteins cause distal arthrogryposis syndromes. Amer. J. Hum. Genet. 72 : 681—690.

Szent-Gyorgyi A. G. 1949. Free-energy relations, contraction of actomyosin. Biol. Bull. 96 : 140—161.

Tregear R. T., Mendelson R. A. 1975. Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle. Biophys. J. 15 : 455—467.

Wallgren-Pettersson C., Sewry C. A., Nowak K. J., Laing N. G. 2011. Nemaline myopathies. Semin Pediatr. Neurol. 18 : 230—238.

Wilson M. G. A., Mendelson R. A. 1983. A comparison of order and orientation of cross-bridges in rigor and relaxed muscle fibres using fluorescence polarization. J. Muscle Res. Cell Motil. 4 : 671—693.

Yanagida T., Oosawa F. 1978. Polarized fluorescence from e-ADP incorporated into F-actin in a myosin-free single fibre: conformation of F-actin and changes induced in it by heavy meromyosin. J. Mol. Biol. 126 : 507—524.



THE EFFECT OF THE *Arg91Gly* AND *Glu139del* MUTATIONS IN BETA-TROPOMYOSIN ASSOCIATED WITH CONGENITAL MYOPATHY OF SKELETAL MUSCLES OF HUMAN ON ACTIN-MYOSIN INTERACTION

N. A. Rysev,<sup>1</sup> O. E. Karpicheva,<sup>1</sup> V. V. Sirenko,<sup>1</sup>  
A. O. Simonyan,<sup>1,2</sup> C. S. Redwood,<sup>3</sup> Y. S. Borovikov<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, and

<sup>3</sup> University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, OX3 9DU, UK;

\* e-mail: borovikov@incras.ru

The structural changes in proteins of the contractile apparatus of muscle fibre and the violation of their function due to the point mutations in these proteins can be a cause of many hereditary diseases of the human muscular tissue. One of such diseases are cap-myopathy and distal arthrogryposis, which may be associated with tropomyosin mutations. The deletion of glutamic acid residue at position 139 of  $\beta$ -tropomyosin leads to the development of cap-myopathy, and the replacement of arginine at position 91 with glycine in this protein is linked to distal arthrogryposis. In order to understand how the *Arg91Gly* и *Glu139del* mutations disrupt the coordinated work of the contractile system of muscle fibres, recombinant  $\beta$ -tropomyosins of the wild type and mutant were overexpressed and were incorporated into the thin filaments of ghost muscle fibre. The fluorescent probes of 1,5-IAEDANS or FITC-phalloidin were specifically linked to the Cys707 of the myosin subfragment-1 and the three neighboring actin monomers, respectively. The polarized fluorescence technique was used to study the spatial arrangements of actin and the myosin at modelling of different stages of the ATPase cycle (in the presence of ADP, ATP and in the absence of a nucleotide) at low and high concentration of calcium ions. Both mutations were shown to change the conformational rearrangements of actin and myosin in the ATP hydrolysis cycle that can be caused by the abnormal behavior of the mutant tropomyosins during regulation. The altered work of the contractile system can be one of the causes of muscle weakness in congenital myopathies associated with these mutations.

**Key words:** mutation in tropomyosin, hereditary myopathy, actin-myosin interaction, regulation of muscle contraction, muscle fibre, polarized fluorescence.