

лизован на актине и подвижность мало зависела от изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , как и в отсутствие EGCG. Однако в присутствии АТФ значения  $N$  увеличивались, что говорит о некотором увеличении подвижности миозиновых головок.

Известно, что EGCG связывается с тропонином С вблизи сайта связывания сенсбилизатора кальция EMD 57033, хотя и с меньшим сродством (Botten et al., 2013). В присутствии тропонина I катехин EGCG образует тройной комплекс, заякоривается на Е- и Н-спиралях тропонина С, ослабляет сродство тропонина С к тропонину I и таким образом передает ингибирующий сигнал вдоль всего тонкого филамента. Флуоресценция S1-AEDANS не изменялась в отсутствие тропонина под действием EGCG, но изменялась в его присутствии (данные не приведены). Следовательно, EGCG связывается с тропонином С и передает сигнал через тропонин I к тропомиозину и далее к актин-миозиновому комплексу.

На основании вышеизложенного мы использовали измерения поляризованной флуоресценции метки в SH1-спирали головки миозина, чтобы исследовать влияние замены Glu150Ala в тропомиозине, связанной с кэп-миопатией и CFTD, на конформационные переходы миозина между различными состояниями АТФазного цикла. Аминокислотная замена Glu150Ala приводила к аномальному увеличению числа миозиновых головок в сильной форме связывания даже при моделировании расслабления мышечного волокна. Отсутствие одного из солевых мостиков вследствие замены Glu150 на Ala в тропомиозине запускает переключение тропонина I на связывание с актином, а не с тропомиозином, что позволяет тропомиозину покинуть блокирующую позицию, и активирует прочное связывание головки миозина с актином.

Впервые показано, что ингибитор тропонина EGCG способен модулировать регуляторную функцию тропонин-тропомиозиновой системы в скелетном мышечном волокне, однако его применение не приводит к полной нормализации регуляции актин-миозинового взаимодействия в присутствии тропомиозина с заменой Glu150Ala. Тем не менее результаты работы имеют важное значение для понимания механизмов регуляции мышечного сокращения и дальнейшего нап-

равления исследований. Показана важность баланса конформационных состояний актин-миозинового комплекса в АТФазном цикле и описаны детали регуляторной функции тропонина и тропомиозина. Оказалось, что недостаточно скорректировать силу связывания миозина с актином при низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ . Обязательным условием для нормализации сократительной функции является сохранение эффективности работы поперечных мостиков, то есть прохождение ими полного АТФазного цикла. Проблема применения EGCG в отношении Glu150Ala-мутантного тропомиозина заключается в ингибировании конформационных перестроек миозина от слабой формы связывания с актином к сильной, поскольку EGCG влияет на каждую стадию АТФазного цикла. Возможным решением проблемы может служить модификация соединения или его применение совместно с другими модуляторами функции миозина или тропонина.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00534).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с лабораторными животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>); они были одобрены комиссией по биомедицинской этике Института цитологии РАН (протокол № 15/23 от 15.08.2023, Санкт-Петербург).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borejdo J., Putnam S. 1977. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibers in rigor and relaxation. *Biochim. Biophys. Acta*. V. 459. P. 578.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(77\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(77)90056-1)

- Borovikov Y.S., Gusev N.B.* 1983. Effect of troponin-tropomyosin complex and  $\text{Ca}^{2+}$  on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment-1. *Eur. J. Biochem.* V. 136. P. 363.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07750.x>
- Borovikov Y.S.* 1999. Conformational changes of contractile proteins and their role in muscle contraction. *Int. Rev. Cytol.* V. 189. Art. ID 267.  
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61389-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61389-3)
- 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.* V. 86. P. 3020.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74351-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74351-9)
- Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Avrova S.V., Redwood C.S.* 2009. Modulation of the effects of tropomyosin on actin and myosin conformational changes by troponin and  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1794. P. 985.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.014>
- 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 interactions during the ATPase cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 489. P. 20.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.07.018>
- 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.* V. 577. P. 11.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.05.002>
- Borovikov Y.S., Karpicheva O.E., Simonyan A.O., Avrova S.V., Rogozovets E.A., Sirenko V.V., Redwood C.S.* 2018. The primary causes of muscle dysfunction associated with the point mutations in Tpm3.12; conformational analysis of mutant proteins as a tool for classification of myopathies. *Int. J. Mol. Sci.* V. 19. Art. ID 3975.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19123975>
- Borovikov Y.S., Rysev N.A., Karpicheva O.E., Sirenko V.V., Avrova S.V., Piers A., Redwood C.S.* 2017. Molecular mechanisms of dysfunction of muscle fibres associated with Glu139 deletion in TPM2 gene. *Sci. Rep.* V. 7. Art. ID 16797.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17076-9>
- Botten D., Fugallo G., Fraternali F., Molteni C.* 2013. A computational exploration of the interactions of the green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin 3-Gallate with cardiac muscle troponin C. *PLoS One.* V. 8.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070556>
- Chakrawarti L., Agrawal R., Dang S., Gupta S., Gabrani R.* 2016. Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* V. 26. P. 907.  
<https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1203419>
- Claassen W.J., Baelde R.J., Galli R.A., de Winter J.M., Ottenheijm C.A.C.* 2023. Small molecule drugs to improve sarcomere function in those with acquired and inherited myopathies. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* V. 325. P. 60.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00047.2023>
- Clarke N.F.* 2011. Congenital fiber-type disproportion. *Semin. Pediatr. Neurol.* V. 18. P. 264.  
<https://doi.org/10.1016/j.spen.2011.10.008>
- Gordon A.M., Homsher E., Regnier M.* 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* V. 80. P. 853.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.853>
- Hassoun R., Budde H., Mannherz H.G., Lódi M., Fujita-Becker S., Laser K.T., Gärtner A., Klingel K., Möhner D., Stehle R., Sultana I., Schaaf T., Majchrzak M., Krause V., Herrmann C. et al.* 2021. De novo missense mutations in TNNC1 and TNNI3 causing severe infantile cardiomyopathy affect myofilament structure and function and are modulated by troponin targeting agents. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. Art. ID 9625.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22179625>
- Hsu P.J., Wang H.D., Tseng Y.C., Pan S.W., Sampurna B.P., Jong Y.J., Yuh C.H.* 2021. L-Carnitine ameliorates congenital myopathy in a tropomyosin 3 de novo mutation transgenic zebrafish. *J. Biomed. Sci.* V. 28. P. 8.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-020-00707-1>
- Kakol I., Borovikov Y.S., Szczesna D., Kirillina V.P., Levitsky D.I.* 1987. Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost single fiber induced by either phosphorylated or dephosphorylated heavy meromyosin. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 913. P. 1.  
[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90225-1)
- 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.* V. 1864. P. 260.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.12.004>
- Lehman W., Rynkiewicz M.J.* 2023. Troponin-I-induced tropomyosin pivoting defines thin-filament function in relaxed and active muscle. *J. Gen. Physiol.* V. 155.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.202313387>
- Llinas P., Isabet T., Song L., Ropars V., Zong B., Benisty H., Sirigu S., Morris C., Kikuti C., Safer D., Sweeney H.L., Houdusse A.* 2015. How actin initiates the motor activity of Myosin. *Dev. Cell.* V. 33. P. 401.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.202313387>

- Lorenz M., Poole K.J.V., Popp D., Rosenbaum G., Holmes K.C. 1995. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J. Mol. Biol.* V. 246. P. 108.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0070>
- Malfatti E., Lehtokari V.L., Böhm J., De Winter J.M., Schäffer U., Estournet B., Quijano-Roy S., Monges S., Lubieniecki F., Bellance R., Viou M.T., Madelaine A., Wu B., Taratuto A.L., Eymard B. et al. 2014. Muscle histopathology in nebulin-related nemaline myopathy: ultrastructural findings correlated to disease severity and genotype. *Acta Neuropathol. Commun.* V. 2. P. 44.  
<https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-44>
- Margossian S., Lowey S. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* V. 85. P. 55.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85009-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85009-X)
- Matyushenko A.M., Nefedova V.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Berg V.Y., Pivovarova A.V., Kleymentov S.Y., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. 2020. Mechanisms of disturbance of the contractile function of slow skeletal muscles induced by myopathic mutations in the tropomyosin TPM3 gene. *FASEB J.* V. 34. Art. ID 13507.  
<https://doi.org/10.1096/fj.202001318R>
- 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.* V. 22. P. 4978.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt345>
- Marttila M., Lemola E., Wallefeld W., Memo M., Donner K., Laing N.G., Marston S., Grönholm 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.* V. 442. P. 231.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20111030>
- Moore J.R., Campbell S.G., Lehman W. 2016. Structural determinants of muscle thin filament cooperativity. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 594. P. 8.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.016>
- Moraczewska J. 2020. Thin filament dysfunctions caused by mutations in tropomyosin Tpm3. 12 and Tpm1. *J. Muscle Res. Cell Motil.* V. 41. P. 39.  
<https://doi.org/10.1007/s10974-019-09532-y>
- North K.N., Wang C.H., Clarke N., Jungbluth H., Vainzof M., Dowling J.J., Amburgey K., Quijano-Roy S., Beggs A.H., Sewry C., Laing N.G., Bönnemann C.G. 2014. Approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Neuromuscul. Disord.* V. 24. P. 97.  
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.11.003>
- Okamoto Y., Sekine T. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biochem.* V. 98. P. 1143.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135365>
- Oosawa F., Fujime S., Ishiwata S. I., Mihashi K. 1973. Dynamic property of F-actin and thin filament. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* V. 37. P. 277.  
<https://doi.org/10.1101/SQB.1973.037.01.038>
- Popp D., Maeda Y., Stewart A. A., Holmes K. C. 1991. X-ray diffraction studies on muscle regulation. *Adv. Biophys.* V. 27. P. 89.  
[https://doi.org/10.1016/0065-227x\(91\)90010-b](https://doi.org/10.1016/0065-227x(91)90010-b)
- Potter J.D. 1982. Preparation of troponin and its subunits. *Methods Enzymol.* V. 85. P. 241.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)85024-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)85024-6)
- Roopnarine O., Thomas D.D. 1996. Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* V. 70. P. 2795.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79849-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79849-1)
- Sakuma A., Kimura-Sakiyama C., Onoue A., Shitaka Y., Kusakabe T., Miki M. 2006. The second half of the fourth period of tropomyosin is a key region for Ca(2+)-dependent regulation of striated muscle thin filaments. *Biochemistry.* V. 45. P. 9550.  
<https://doi.org/10.1021/bi060963w>
- Sewry C.A., Wallgren-Pettersson C. 2017. Myopathology in congenital myopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* V. 43. P. 5.  
<https://doi.org/10.1111/nan.12369>
- Spudich J.A., Watt S. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* V. 246. P. 4866.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62016-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62016-2)
- Tadano N., Du C.K., Yumoto F., Morimoto S., Ohta M., Xie M.F., Nagata K., Zhan D.Y., Lu Q.W., Miwa Y., Takahashi-Yanaga F., Tanokura M., Ohtsuki I., Sasaguri T. 2010. Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C. *Br. J. Pharmacol.* V. 161. P. 1034.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00942.x>
- Vibert P., Craig R., Lehman W. 1997. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* V. 266. P. 8.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0800>
- Yanagida T., Oosawa F. 1978. Polarized fluorescence from epsilon-ADP incorporated into F-actin in a myosin-free single fiber: Conformation of F-actin and changes induced in it by heavy meromyosin. *J. Mol. Biol.* V. 126. P. 507.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90056-6)

# GREEN TEA CATECHIN EGCG IS ABLE TO PARTIALLY RESTORE THE REGULATION OF MUSCLE CONTRACTION BY THE TROPONIN-TROPOMYOSIN COMPLEX, IMPAIRED BY THE GLU150ALA SUBSTITUTION IN $\gamma$ -TROPOMYOSIN

M. V. Tishkova<sup>a, \*</sup>, O. E. Karpicheva<sup>a, b</sup>, Y. S. Borovikov<sup>a</sup>, S. V. Avrova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064, Russia*

<sup>b</sup> *Department of Pharmacology, Physiology, and Biophysics, Boston University, Boston, 02118, MA, USA*

\* *E-mail: mariiatiskova@gmail.com*

A number of point mutations has been identified in the genes of contractile and regulatory proteins of skeletal muscle that can lead to dysfunction of muscle tissue. The molecular mechanisms of muscle contraction in the presence of mutant muscle proteins in the sarcomere remain poorly understood. In the current study, we examined the impact of the glutamate-to-alanine substitution at position 150 (Glu150Ala) of  $\gamma$ -tropomyosin associated with cap disease and fiber-type disproportion in humans on the molecular mechanisms of troponin-tropomyosin-related regulation of muscle contraction in a single muscle fiber. It is believed that tropomyosin residue Glu150 is not directly involved in the interaction of tropomyosin with actin and myosin interactions; however, according to structural models of thin filaments under low  $\text{Ca}^{2+}$  conditions, this residue is located close to site of binding with the C-terminal domain of troponin I. To assess the performance of myosin heads in the presence of Glu150Ala mutant tropomyosin, we measured the polarized fluorescence of 1,5-IAEDANS probe bound to the SH1-helix of myosin. The obtained results indicate an abnormal increase in the number of myosin heads strongly bound to actin during relaxation of muscle fibres containing Glu150Ala mutant tropomyosin. It has been shown that the green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG), known as a modulator of troponin function, inhibits the premature transition of myosin heads into a state of strong actin binding, and thus weakens the damaging effect of the mutation. However, EGCG does not completely restore the effective behavior of myosin cross-bridges during the ATPase cycle.

**Keywords:** regulation, muscle contraction, ATPase cycle, tropomyosin mutations, congenital myopathies, conformational changes,  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity, epigallocatechin gallate