

УДК 577.353.2

КАТЕХИН ЗЕЛЕННОГО ЧАЯ EGCG СПОСОБЕН ЧАСТИЧНО ВОССТАНАВЛИВАТЬ РЕГУЛЯЦИЮ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ ТРОПОНИН-ТРОПОМИОЗИНОВЫМ КОМПЛЕКСОМ, НАРУШЕННУЮ ЗАМЕНОЙ GLU150ALA В ГАММА-ТРОПОМИОЗИНЕ

© 2024 г. М. В. Тишкова^{1, *}, О. Е. Карпичева^{1, 2}, Ю. С. Боровиков¹, С. В. Аврова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

²Бостонский университет, Бостон, 02118, США

* E-mail: mariiatiskova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.07.2024

После доработки 31.07.2024

Принята к публикации 10.08.2024

Идентифицировано множество точечных мутаций в генах сократительных и регуляторных белков скелетных мышц, способных приводить к дисфункции мышечной ткани. Молекулярные механизмы мышечного сокращения в присутствии мутантных мышечных белков в саркомере остаются мало изученными. В представленной работе было исследовано влияние аминокислотной замены остатка глутамата на остаток аланина в позиции 150 (Glu150Ala) γ -тропомиозина, ассоциированной с кэп-миопатией и диспропорцией мышечных волокон человека, на молекулярные механизмы регуляции мышечного сокращения тропонин-тропомиозиновым комплексом в одиночном мышечном волокне. Считается, что остаток Glu150 тропомиозина не принимает непосредственного участия во взаимодействии тропомиозина с актином и миозином; однако, согласно структурным моделям тонких филаментов в условиях низкого уровня Ca^{2+} , этот остаток расположен вблизи участка связывания с С-концевым доменом тропонина I. Для оценки работы миозиновых головок в присутствии Glu150Ala-мутантного тропомиозина мы измерили поляризованную флуоресценцию зонда 1,5-IAEDANS, связанного с SH1-спиралью головки миозина. Полученные данные показали аномальное увеличение числа сильно связанных с актином головок миозина при расслаблении мышечного волокна, содержащего Glu150Ala-мутантный тропомиозин. Оказалось, что катехин зеленого чая EGCG, известный как модулятор функции тропонина, ингибирует преждевременный переход миозиновых головок в сильную форму связывания и таким способом ослабляет повреждающее влияние замены GluAla в γ -тропомиозине. Однако EGCG полностью не восстанавливает эффективное прохождение АТФазного цикла миозиновыми поперечными мостиками.

Ключевые слова: регуляция, мышечное сокращение, АТФазный цикл, мутации тропомиозина, врожденные миопатии, конформационные изменения, Ca^{2+} -чувствительность; галлат эпигаллоткатехина

Принятые сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция; 1,5-IAEDANS — N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин; EGCG — галлат эпигаллокатехина; F-актин — фибриллярный актин; S1 — субфрагмент-1 миозина; WT — дикий тип.

DOI: 10.31857/S0041377124050058, **EDN:** DUSZTJ

Наследственные миопатии — это гетерогенная группа наследственных заболеваний скелетных мышц, которая включает немалиновую миопатию, кэп-миопатию, миопатию с зебра-тельцами и стержневую миопатию (North et al., 2014). Характерным свойством этих патологий является генерализованная слабость скелетных мышц различной степени выраженности, начиная от слабой степени вплоть до слабости, представляющей угрозу для жизни,

часто проявляющейся в раннем детском возрасте (Sewry et al., 2017). Морфологические изменения, обнаруживаемые в скелетной мышечной ткани пациента, обычно дают название варианту наследственной миопатии. Например, кэп-структуры при кэп-миопатии представляют собой хорошо видимые в мышечных волокнах периферические структуры, распределение и размер которых зависит от тяжести заболевания (Malfatti et

al., 2014; Sewry et al., 2017). Электронная микроскопия показала, что кэп-структуры образованы дезорганизованными тонкими филаментами и белками Z-линий — α -актином, актином, тропомиозином, небулином, десмином, миотилином, титином, тропонином T и SERCA2. Гипотрофия медленных скелетных мышечных волокон и их преобладание вместе с компенсаторной гипертрофией быстрых скелетных мышечных волокон является одним из общих морфологических изменений скелетной мышечной ткани при наследственных миопатиях, хотя процентное соотношение размеров волокон разного типа может значительно различаться (Clarke et al., 2011). При выраженной разнице размеров в отсутствие гистологически обнаруживаемых включений ставится диагноз врожденной диспропорции типов мышечных волокон (CFTD), который может быть впоследствии изменен на другой диагноз при обнаружении кэп-структур, немалиновых телец или других клеточных включений. Механизмы формирования патологических клеточных структур остаются не исследованными.

Для наследственных миопатий описаны доминантные и рецессивные мутации по крайней мере в 12 генах. Во многих случаях наследственные миопатии можно рассматривать как заболевания тонких филаментов, поскольку мутации вызывают нарушение структуры и функции белков тонких филаментов, снижают стабильность тонких филаментов и сродство актин-связывающих белков к актину, а также вызывают дезорганизацию компартментов мышечных волокон и агрегацию белков (Martilla et al., 2012).

Хорошо известно, что сокращение мышцы обеспечивается циклическим связыванием миозиновых головок с актином и их отсоединением, и основная регуляция этого взаимодействия осуществляется расположенным на актине тропонин-тропомиозиновым комплексом Ca^{2+} -зависимым образом (Gordon et al., 2000). Увеличение концентрации саркоплазматического Ca^{2+} при нервно-мышечной активации вызывает конформационные перестройки тропонинового комплекса, состоящего из трех субъединиц, что приводит к смещению тропомиозиновых тяжей на актине. Поскольку тропомиозин

взаимодействует с актином за счет электростатических связей (Lorenz et al., 1995), легко представить, что он изменяет свое расположение относительно сайтов связывания миозиновой головки с актином, стерически закрывая или открывая к ним доступ для миозина. Кроме того, сам актин испытывает конформационные перестройки (Oosawa et al., 1972; Popp et al., 1991) и изменения пространственной организации миозин-связывающего сайта (Borovikov, 1999) и помогает регуляторному комплексу ингибировать или активировать сильное связывание миозина с актином. Область взаимодействия миозина с актином занимает большую площадь и испытывает значительные перестройки в обоих белках; в том числе происходит захлопывание актин-связывающей щели (Llinas et al., 2015). Связывание молекулы АТФ в активном центре головки миозина, сильно связанной с актином, приводит к отсоединению миозина от актина и повторению АТФазного цикла. С понижением концентрации Ca^{2+} тонкие филаменты переходят обратно в состояние, при котором сильное связывание миозина с актином затруднительно (Lehman, Rynkiewicz, 2023).

Имеющиеся данные о конформационных перестройках актина позволяют предполагать, что актин может находиться, по крайней мере, в двух конформационных состояниях — выключенном и включенном, в зависимости от его способности активировать АТФазную активность миозина. При низкой концентрации Ca^{2+} актин находится в выключенной конформации (Borovikov, 1999; Borovikov et al., 2018); тропомиозиновые тяжи на актиновых филаментах смещены ближе к их периферии, а взаимодействие актина с миозином слабое. В этом случае тонкий филамент находится в блокирующем функциональном состоянии (Lehman, Rynkiewicz, 2023). При высокой концентрации Ca^{2+} тропомиозиновые тяжи смещаются ближе к центру актинового филамента; актин переходит во включенное конформационное состояние, и весь тонкий филамент принимает сначала закрытое, а потом открытое функциональное состояние (Vibert et al., 1997; Gordon et al., 2000). В соответствии с функциональным состоянием тонких филаментов различают три позиции

тропомиозина — блокирующую, закрытую и открытую.

Модуляторы функции миозина и тропонина, способные влиять на АТФазную активность миозина и Ca^{2+} -чувствительность мышечного волокна, могут рассматриваться в качестве фармакологических агентов для лечения первичных причин заболеваний скелетной мускулатуры (Claasen et al., 2023). Для использования этих модуляторов необходимо выяснить механизмы нарушения мышечного сокращения вследствие мутаций в генах мышечных белков. При нарушении расслабления в мышечном волокне может остаться аномальное количество миозиновых поперечных мостиков, образующих с актином сильную форму связывания. Такие мостики не способны эффективно проходить АТФазный цикл. При недостаточной активации поперечных мостиков их способность формировать сильную форму связывания, напротив, снижается. В норме же тропонин и тропомиозин определяют возможность миозина сильно связываться с актином при прохождении АТФазного цикла. Тропонин является непосредственным сенсором Ca^{2+} , а тропомиозин обеспечивает доступ миозиновых головок к актину согласно Ca^{2+} -сигналу и высокую кооперативность активации мышечного сокращения и релаксации (Moore et al., 2016).

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния аминокислотной замены Glu150Ala в γ -изоформе тропомиозина медленных скелетных мышц Tpm3.12, связанной с кэп-миопатией и CFTD, на механизмы взаимодействия мышечных белков, а также поиск путей восстановления сократительной функции мышечной ткани. Данная аминокислотная замена происходит в *c*-положении гептапептидного повтора, что указывает на ее расположение на наружной поверхности молекулы (Moraczewska, 2020). Предполагается, что остатки 150–180 тропомиозина играют ключевую роль в запуске конформационных изменений, необходимых для полной активации актинового филамента (Sakuma et al., 2006). Аминокислотная замена Glu150Ala как в одной, так и в обеих цепях тропомиозина (Borovikov et al., 2018; Matyushenko et al., 2020), может приводить к развитию гипертрофического фенотипа (Marston et al., 2013). Мы предположили, что аномальная

активация тонких филаментов в присутствии замены Glu150Ala может быть потенциальной терапевтической мишенью и оценили возможность восстановления сократительной функции с использованием ингибитора тропонина — биологически активного вещества галлата эпигаллоткатехина (EGCG).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использованные реактивы: N-йодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин (1,5-IAEDANS; Molecular Probes, Орегон, США); α -химотрипсин, АТФ, АДФ, ЭДТА (Sigma–Aldrich, Миссури, США); EGCG (Merck, Дармштадт, Германия).

Выделение и очистка белков. С использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) была наработана кДНК человека, несущая ген *TPM3*, кодирующий изоформу тропомиозина медленных скелетных мышц Tpm3.12 (UniProtcode: P06753). Отсутствие ацетилирования и как следствие сниженное сродство рекомбинантного тропомиозина к актину компенсировали включением N-концевой вставки, кодирующей дополнительную последовательность аминокислот Met–Ala–Ser. Полученной конструкцией трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Массачусетс, США). Для внесения точечных мутаций в последовательность гена тропомиозина использовали метод направленного мутагенеза, основанный на двухстадийной ПЦР. Рекомбинантный белок очищали с помощью анионообменной хроматографии.

Миозин и тропонин выделяли из медленных скелетных мышц (Spudich, Watt, 1971; Margossian, Lowey, 1982; Potter, 1982). Исследования с применением животных проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Головки миозина (субфрагмент-1 миозина или S1) получали расщеплением миозина α -химотрипсином при 25 °C в течение 20 мин (Okamoto, Sekine, 1985). Специфическую модификацию S1 осуществляли с использованием флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS (Borejdo, Putnam, 1977; Borovikov et al., 2009). Концентрацию красителя подбирали таким образом, чтобы соотношение красителя и белка состав-

ляло не более 1:1 для предотвращения неспецифической модификации других цистеиновых остатков миозина.

Подготовка модельных мышечных волокон. Изучение конформационных перестроек миозина проводили на «тенивых» волокнах, выделенных из *m. psoas* кролика с реконструированными регуляторной и сократительной системами (Borovikov, Gusev, 1983; Borovikov et al., 2017). Теневые волокна на 80–90% состояли из фибриллярного актина, на 100% идентичного актину скелетной мускулатуры человека. Реконструкцию регуляторной системы осуществляли с использованием рекомбинантного тропомиозина и тропонина из медленной скелетной мускулатуры кролика. Сократительный аппарат восстанавливали с использованием S1, способного проникать через мембрану теневого волокна и изменять свою конформацию при связывании нуклеотидов и аналогов АТФ (Borovikov et al., 2009). Инкубация мышечных волокон в растворе, содержащем S1 в концентрации 2.2 мг/мл на протяжении двух часов приводила к связыванию S1 с актином в молярном соотношении 1:2.8 (± 0.4) в отсутствие тропомиозина и 1:4.2 (± 0.3) в присутствии тропомиозина.

Включение мутантного тропомиозина в тонкие филаменты отслеживали с помощью флуоресцентной метки 5-IAF и конфокального микроскопа Olympus FLUOVIEW FV3000 (Karpicheva et al., 2016).

Белковый состав мышечных волокон контролировали методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием камеры Mini-PROTEAN® Tetra (BioRad, Калифорния, США) с последующим анализом гелей в системе гель-документирования ChemiDocMP (BioRad, Калифорния, США) и в программе ImageLab (версия 6.0.0).

Поляризационная микрофлуориметрия. Поляризационную флуоресценцию зонда 1,5-IAEDANS, связанного с 707 остатком цистеина в SH1-спирали S1, измеряли в стационарных экспериментах в теневых волокнах с использованием проточной камеры с помощью поляризационного микрофлуориметра (Borovikov et al., 2004). Для возбуждения флуоресценции 1,5-IAEDANS использовали длину волны 407 ± 5 нм; регистрацию осуществляли в диапазоне 500–600 нм, измеряя 4 компонента интенсивно-

сти поляризованной флуоресценции: $I_{||}$, $I_{\perp}$, I_{45} и I_{135} . Индексы $||$ (параллельно) и $\perp$ (перпендикулярно) обозначают направление поляризации относительно оси мышечного волокна. Первый индекс указывает на направление поляризации падающего света, второй — на направление поляризации излучаемого света. Во всех экспериментах величина фоновой флуоресценции, полученная для теневых волокон, была на 2–3 порядка ниже интенсивности флуоресценции мышечных волокон, содержащих S1-AEDANS; при обработке полученных данных эти значения учитывались.

Анализ экспериментальных данных осуществляли модель-зависимым методом (Yanagida, Oosawa, 1978; Kakol et al., 1987; Borovikov et al., 2004), согласно которому в мышечном волокне существует две популяции флуорофоров: упорядоченные флуорофоры (в количестве $1-N$), осцилляторы поглощения и излучения которых расположены под углами Φ_A и Φ_E относительно оси мышечного волокна соответственно, и хаотически расположенные флуорофоры в количестве N , число которых отражает подвижность миозиновой головки. Подвижность флуоресцентной метки в головке миозина оценивали величиной угла γ между диполями поглощения и излучения зонда (Borovikov et al., 2004).

Измерения флуоресценции проводили в отсутствие нуклеотидов, в присутствии 3 мМ Mg-АДФ и 5 мМ Mg-АТФ для моделирования стадий цикла гидролиза АТФ: AM, $AM^* \cdot ADP$ и $AM^* \cdot ATP$ соответственно, где A — актин, M^* и M^* — разные конформационные состояния миозина.

С помощью модель-зависимого метода определяли следующие параметры поляризованной флуоресценции: ориентацию диполей излучения флуоресцентной метки (Φ_E) и число дезориентированных флуорофоров (N) (Borejdo, Putnam, 1977; Roopnarine, Thomas, 1996). С помощью этих параметров оценивали изменения характера связывания головок миозина с актином, в частности относительное количество поперечных мостиков, сильно связанных с F-актином, и их подвижность (Borovikov et al., 2009).

Для моделирования функциональных состояний тонких филаментов мышечное волокно инкубировали в ряде растворов, содержащих 5 мМ ЭГТА для связывания свободных ионов кальция или 5 мМ ЭГТА и 4.5 мМ $CaCl_2$ для

моделирования повышения концентрации Ca^{2+} до 10^{-5} М, что соответствует физиологическим показателям при активации сокращения. Эффект модулятора функции тропонина оценивали путем добавления к волокну 30 мкМ EGCG. Для каждого конформационного состояния было проведено 20–25 измерений в 4–5 теневых волокнах. Статистическую значимость изменений в экспериментах оценивали попарно (в присутствии мутантного тропомиозина и тропомиозина дикого типа; в отсутствие и в присутствии EGCG) с использованием *t*-критерия Стьюдента; различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ключевые особенности подхода, позволяющего получать данные о конформационных перестройках миозина в одиночном мышечном волокне. Данные о конформационных перестройках головок миозина, меченных флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS, получали непосредственно в мышечном волокне при моделировании разных функциональных состояний тонких филаментов и стадий АТФазного цикла. Замена Glu150Ala в тропомиозине не препятствовала включению белка в состав тонких филаментов (рис. 1). Следовательно, мутантный тропомиозин может действовать в тонких филаментах как токсичный белок и изменять механизмы регуляции актин-миозинового взаимодействия. Как показало высокоскоростное соосаждение тропомиозина с F-актином, замена Glu150Ala не снижает сродства тропомиозина к актину (Matyushenko et al., 2020).

Ранее было показано, что модификация S1 флуоресцентной меткой существенно не влияет на сродство миозина к актину (Borovikov et al., 2015). Встраивание S1 в мышечное волокно вызывало появление поляризованной флуоресценции. Модельные мышечные волокна считали полностью функциональными, если параметры поляризованной флуоресценции S1-AEDANS изменялись при изменении концентрации Ca^{2+} и при добавлении АДФ и АТФ. Это означало, что мышечные белки сохраняли способность к конформационным перестройкам, которые лежат в основе генерации силы. При низкой концентрации Ca^{2+} и при добавлении АТФ моделировали состояние деактивации

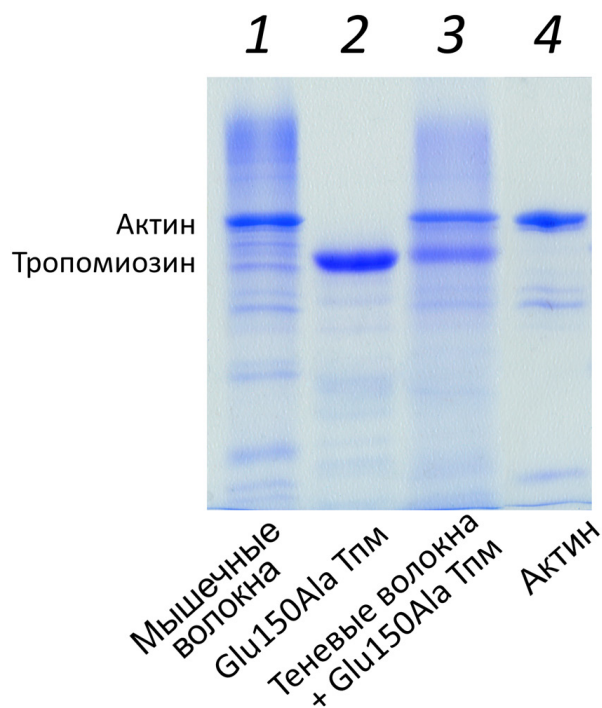


Рис. 1. Контрольная электрофореграмма связывания Glu150Ala-мутантного тропомиозина (Glu150Ala Тпм) с актином.

Из мышечных волокон (дорожка 1) были экстрагированы миозин и регуляторные белки для получения теневых волокон, тонкие филаменты в которых были реконструированы тропомиозином (дорожка 3), а затем тропонином. Изолированные тропомиозин и актин показаны на дорожках 2 и 4 соответственно.

сократительного аппарата, при высокой концентрации Ca^{2+} и в отсутствие нуклеотидов или в присутствии АДФ моделировали состояние активации сократительного аппарата.

Поскольку флуоресцентный зонд специфично связывался с SH1-спиралью, то изменения ориентации диполей зонда и их подвижности рассматривали как изменения ориентации и подвижности этой спирали.

Головка миозина в течение АТФазного цикла претерпевает конформационные перестройки (Borovikov et al., 2009). Ранее было показано, что SH1-спираль изменяет свою ориентацию при переходе из слабой формы связывания с актином в сильную. Методом электронной микроскопии показано, что моторный домен головки миозина наклоняется к актиновому филаменту при образовании сильного связывания с актином. При этом диполи флуоресцентной метки 1,5-IAEDANS, прикрепленной к Cys707 SH1-спирали головки

миозина, наклоняются также к оси мышечного волокна. При добавлении в мышечное волокно АДФ при высокой концентрации Ca^{2+} значения угла диполей метки оказываются наименьшими, что говорит о повороте SH1-спирали, значения количества дезориентированных флуорофоров также наименьшие, что свидетельствует об иммобилизации головки миозина.

При слабом взаимодействии миозина с актином головка миозина отдаляется от актина, при этом угол диполей красителя увеличивается, достигая максимального значения при добавлении АТФ при низкой концентрации Ca^{2+} . Количество дезориентированных флуорофоров увеличивается, а анизотропия флуоресценции снижается, поскольку слабо связанная головка очень подвижна. Одновременно в мышечном волокне головки миозина могут быть в разных функциональных состояниях, то есть наблюдается несколько популяций миозиновых головок. Таким образом, анализ ориентации SH1-спирали может предоставить информацию о конформационном состоянии всей головки миозина и характере ее связывания с актином.

При моделировании перехода от слабой формы связывания к сильной диполи флуорофоров S1-AEDANS поворачиваются на несколько градусов. Высокая специфичность окрашивания препарата миозина, а также высокое качество используемых белков позволяли получить амплитуду изменений в ориентации

SH1-спирали миозина до 11 град. (Borovikov et al., 2009). Одновременно сравнивали две модельные системы, в одной из которых присутствовал тропомиозин дикого типа (WT), в другой — мутантный белок. Затем к мутантному тропомиозину добавляли ингибитор тропонина EGCG и выявляли эффекты этого соединения. Результаты измерений флуоресценции представлены в виде гистограмм значений угла ориентации диполей излучения красителя (Φ_E) и количества дезориентированных флуорофоров (N).

Замена Glu150Ala в тропомиозине активирует образование сильной формы связывания миозиновых мостиков с актином. Характерная картина изменений значений Φ_E для S1-AEDANS наблюдалась при измерении параметров флуоресценции в мышечных волокнах, содержащих WT-тропомиозин Trp3.12 в составе тонких филаментов (рис. 2, голубые и синие столбики). При этом наблюдали снижение значений Φ_E в диапазоне 1.0–2.1 град. при создании активирующих условий для тонких филаментов, то есть при увеличении концентрации ионов кальция и связывании с актином головок миозина в отсутствие нуклеотидов и в присутствии АДФ. Если изменение концентрации Ca^{2+} имело модулирующее действие на конформационные перестройки в области SH1-спирали миозина, то нуклеотиды АДФ и АТФ вызывали больший эффект,

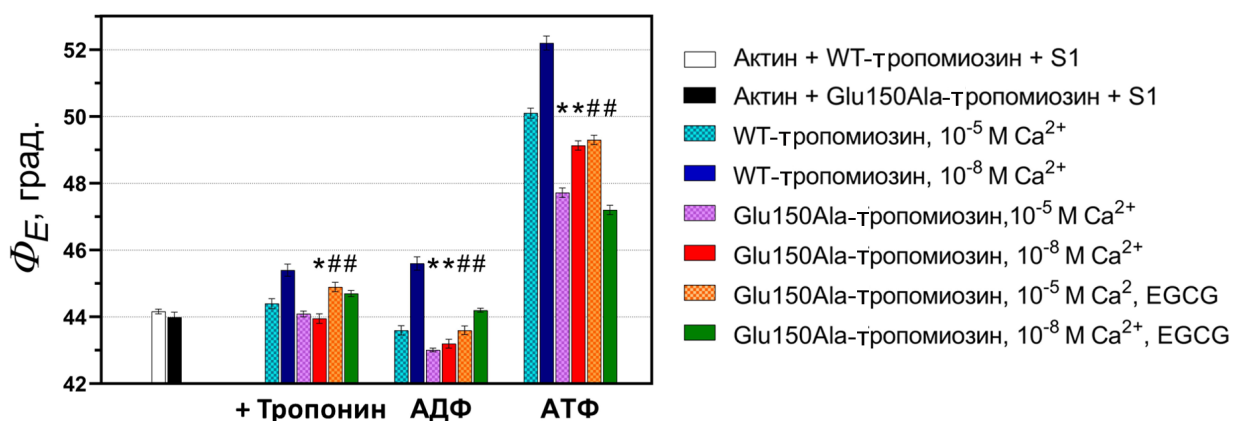


Рис. 2. Влияние замены Glu150Ala в тропомиозине на значение угла ориентации диполей излучения Φ_E S1-AEDANS в мышечных волокнах, содержащих регулируемые тонкие филаменты, в отсутствие и в присутствии ингибитора тропонина EGCG.

Измерения проводили при низкой (10^{-8} M) и высокой (10^{-5} M) концентрации ионов Ca^{2+} в отсутствие нуклеотидов (+ Тропонин) и в присутствии АДФ и АТФ. Изменения значений Φ_E между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин дикого типа (WT-тропомиозин) и тропомиозин с заменой Glu150Ala (Glu150Ala-тропомиозин) (*), а также между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин с заменой Glu150Ala в отсутствие и в присутствии EGCG (#) достоверны при $P < 0.05$.

провоцируя наклон SH1-спирали к оси волокна на 8.6 град. при переходе от слабой формы связывания к сильной.

Присутствие в тропомиозине замены Glu150Ala влияло на характер изменений Φ_E (рис. 2, розовые и красные столбики). Значение Φ_E больше не реагировало на изменение концентрации Ca^{2+} в мышечном волокне в отсутствие нуклеотидов и в присутствии АДФ. То есть присутствие мутантного тропомиозина ингибировало характерные при увеличении Ca^{2+} конформационные перестройки миозина в области SH1-спирали; по-видимому, нарушалась передача Ca^{2+} -сигнала с тропонинового комплекса на миозин. Кроме того, при моделировании каждой стадии АТФазного цикла значение Φ_E снижалось, что типично для наклона SH1-спирали миозина к оси мышечного волокна при образовании сильной формы связывания с актином. В присутствии АТФ значение Φ_E также снижалось (на 2.3–3.1 град.), что указывало на то, что в мышечном волокне оставалось больше миозиновых головок в сильной форме связывания. В целом при моделировании перехода от слабой формы связывания к сильной SH1-спираль миозина поворачивалась азимутально на 6.1 град. (в отличие от 8.6 град. для WT-тропомиозина) в основном за счет ингибирования перехода в слабую форму связывания миозиновых головок в присутствии мутантного

тропомиозина. Таким образом, конформационные переходы миозина были выражены слабее в присутствии мутантного тропомиозина.

Выводы об увеличении числа головок миозина в сильной форме связывания подтверждались данными об уменьшении количества дезориентированных флуорофоров (N , рис. 3), которое может наблюдаться при иммобилизации миозиновых головок. Для мышечных волокон, содержащих WT-тропомиозин, наблюдали слабую дезориентацию проб при высокой концентрации ионов кальция (значения N низкие: 0.17–0.18 отн. ед.). Величина N повышалась при низкой концентрации Ca^{2+} (до 0.27–0.28 отн. ед.) и достигала наибольшего значения в присутствии АТФ (0.46 отн. ед.). Для мышечных волокон, содержащих мутантный тропомиозин, значение N аномально снижалось при низкой концентрации ионов кальция (до 0.15 отн. ед.) и в присутствии АТФ (до 0.13 отн. ед.). Такое снижение значений N характерно для образования конформации миозина, имеющей множественные связи с актином, ограничивающие ее подвижность. Данные об ориентации SH1-спирали миозина в совокупности с данными о подвижности S1 свидетельствуют об увеличении популяции миозиновых головок в сильной форме связывания с актином и ингибировании Ca^{2+} -чувствительности конформационных перестроек

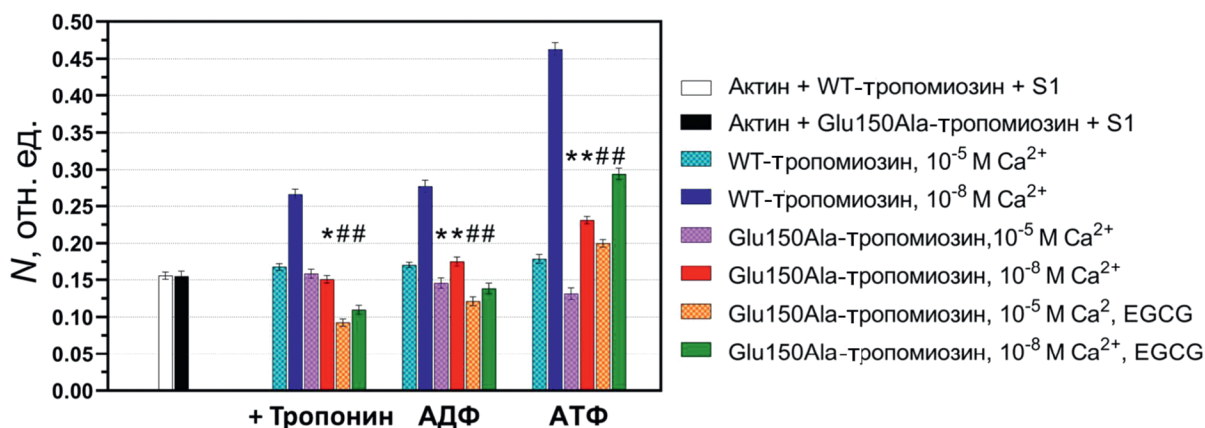


Рис. 3. Влияние замены Glu150Ala в тропомиозине на количество дезориентированных флуорофоров 1,5-IAEDANS, связанных с SH1-спиралью миозина (N) в мышечных волокнах, содержащих регулируемые тонкие филаменты, в отсутствие и в присутствии ингибитора тропонина EGCG.

Измерения проводили при низкой (10^{-8} М) и высокой (10^{-5} М) концентрации ионов Ca^{2+} в отсутствие нуклеотидов (+ Тропонин) и в присутствии АДФ и АТФ. Изменения значений N между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин дикого типа (WT-тропомиозин) и тропомиозин с заменой Glu150Ala (Glu150Ala-тропомиозин) (*), а также между мышечными волокнами, содержащими тропомиозин с заменой Glu150Ala в отсутствие и в присутствии EGCG (#) достоверны при $P < 0.05$.

миозина в присутствии замены Glu150Ala в тропомиозине.

Ранее с помощью анализа подвижности *in vitro* было показано, что мутация снижает скорость движения миозиновых головок на 25–35% (Matyuschenko et al., 2020). Исследования *in vivo* на трансгенных *Danio rerio* демонстрировали снижение скорости плавания рыб на 7 сут после оплодотворения (Hsu et al., 2021). Снижение скорости может быть напрямую связано с ингибированием конформационных переходов миозина вследствие неправильной передачи Ca^{2+} -сигнала. Несмотря на увеличение числа сильно связанных головок миозина, не следует ожидать усиления сократительной функции мышечных волокон, так как для нее необходима эффективная работа миозина и полный конформационный переход от слабой формы связывания к сильной. В случае мутации, с одной стороны, увеличивалось количество миозиновых головок в сильной форме связывания при низком уровне Ca^{2+} , с другой стороны – подавлялась Ca^{2+} -чувствительность конформационных переходов миозина. Нарушения могут происходить в процессе приема Ca^{2+} -сигнала мутантным тропомиозином с тропонином или (и) вследствие изменения взаимодействия между мутантным тропомиозином и миозином.

Влияние ингибитора тропонина EGCG на конформационное состояние головок миозина в мышечном волокне в присутствии мутантного тропомиозина. Наши ранее полученные данные (Borovikov et al., 2018) и настоящая работа дают представление о потенциальных мишенях, на которые можно воздействовать для восстановления сократительной функции в присутствии мутации Glu150Ala в Trp3.12. Такими мишенями может служить ингибирование сильных форм связывания миозина с актином и снижение Ca^{2+} -чувствительности тропонин-тропомиозиновой регуляции.

Мы оценили эффекты биологически активного соединения зеленого чая EGCG, которое, как известно, ингибирует аномальную чувствительность к Ca^{2+} в изолированных волокнах сердца в модели гипертрофической кардиомиопатии (Tadano et al., 2010). EGCG обладает выраженной антиоксидантной, противоопухолевой, кардиопротекторной и проти-

вирусной активностью (Chakrawarti et al., 2016). В *in vitro* исследованиях EGCG стабилизировал структурную целостность тонких филаментов и способствовал восстановлению некоторых аспектов сокращения, нарушенных мутациями в субъединицах С и I тропонина, связанных с кардиомиопатиями (Hassoun et al., 2021). Таким образом, EGCG является потенциальным фармакологическим агентом для восстановления сократительной функции при значительном увеличении Ca^{2+} -чувствительности.

Поскольку флуоресценция S1-AEDANS высокочувствительна к изменению концентрации Ca^{2+} и к характеру связывания миозина с актином, можно оценить эффект модуляторов тропонина и миозина непосредственно в упорядоченной системе мышечного волокна. Анализ поляризованной флуоресценции зонда 1,5-IAEDANS, специфически связанного с Cys707 S1, обнаружил в присутствии EGCG изменения параметров Φ_E и N . В мышечных волокнах, содержащих мутантный тропомиозин (рис. 2, 3, оранжевые и зеленые столбики), при низкой концентрации Ca^{2+} в состояниях цикла актин-миозин и актин-миозин-АДФ происходило повышение параметров Φ_E , что характерно для отклонения головок миозина от оси мышечного волокна, хотя значение и не достигало значения Φ_E , полученного в присутствии WT-тропомиозина. EGCG оказывал эффект и при высокой концентрации Ca^{2+} , не восстанавливая в итоге Ca^{2+} -зависимые конформационные переходы миозина.

При моделировании слабой формы связывания миозина с актином (в присутствии АТФ) EGCG оставлял значения Φ_E низкими, что характеризовало наклон головок к оси мышечного волокна и задерживание головок миозина в сильной форме связывания с актином. Значения Φ_E изменялись при переходе от слабой формы связывания к сильной на 5.7 град, то есть EGCG существенно (на 34%) ингибировал конформационные перестройки головок миозина, не позволяя поперечным миозиновым мостикам эффективно проходить стадии АТФазного цикла.

Добавление EGCG при моделировании сильных форм связывания миозина с актином снижало количество дезориентированных флуорофоров до 0.09 отн. ед. Это указывает на то, что миозин был существенно иммоби-

лизирован на актине и подвижность мало зависела от изменения концентрации 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 сенсibilизатора 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 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 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 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 β -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., Bershtitsky 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 β -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 γ -TROPOMYOSIN

M. V. Tishkova^{a, *}, O. E. Karpicheva^{a, b}, Y. S. Borovikov^a, S. V. Avrova^a

^a *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064, Russia*

^b *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 γ -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 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, Ca^{2+} -sensitivity, epigallocatechin gallate