

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-271

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ РАЗВИТИЯ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ И ГУБЧАТОГО МИОКАРДА НА ПРИМЕРЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *TPM1****EXPLORATION OF MOLECULAR DETERMINANTS OF DILATED CARDIOMYOPATHY AND NON-COMPACT MYOCARDIUM DEVELOPMENT ON THE EXAMPLE OF MUTATIONS IN *TPM1* GENE**В. В. Нефёдова¹, С. Ю. Клейменов^{1,2}, К. К. Лапшина^{1,3}, А. М. Матюшенко¹¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва²Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва³Московский государственный университет им. М. В. ЛомоносоваV. V. Nefedova¹, S. Y. Kleymenov^{1,2}, K. K. Lapshina^{1,3}, A. M. Matyushenko¹¹Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow²Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow³Lomonosov Moscow State University

✉ victoria.v.nefedova@mail.com

Аннотация

Кардиомиопатии — это серьезные патологии миокарда. Было исследовано влияние мутаций в гене *TPM1* на свойства сердечной (Tpm1.1) и цитоплазматической (Tpm1.7) изоформ тропомиозина. Замены E40K и L113V дестабилизируют молекулу Tpm. Замены E40K и E54K снижали способность Tpm к формированию концевых взаимодействий. Разрезающая/деполимеризующая активность кофилина-2 снижалась в присутствии Tpm1.1, мутации E40K и E54K не оказывали на это влияния.

Abstract

Cardiomyopathies are serious myocardial pathologies. The effect of mutations in *TPM1* gene on the properties and structure of cardiac (Tpm1.1) and cytoplasmic (Tpm1.7) isoforms of tropomyosin were studied. Substitutions E40K and L113V destabilized Tpm1.7 molecule. Substitutions E40K and E54K reduced the ability of Tpm to form end-to-end interactions. The severing/depolymerizing activity of cofilin-2 decreased in the presence of the Tpm1.1, the E40K and E54K mutations did not affect such properties.

Сердечно-сосудистые заболевания являются первой причиной смертности во всем мире и составляют порядка 32 % от всех смертей по данным ВОЗ. По современной классификации кардиомиопатии можно разделить на 5 типов: гипертрофическая, дилатационная (ДКМП), рестриктивная и аритмогенная кардиомиопатии, а также некомпактный миокард левого желудочка (НМЛЖ) или губчатый миокард. При исследовании генетически обусловленных кардиомиопатий обычно в центре внимания находятся саркомерные белки, напрямую обуславливающие возможность или невозможность нормального сокращения сердечной мышцы. Однако в случае с дилатационной кардиомиопатией и губчатым миокардом, вызванными мутациями в гене *TPM1*, есть предпосылки обратить внимание не только на регуляторную функцию Tpm, которая реализуется через изоформу Tpm1.1, экспрессирующуюся в саркомерах кардиомиоцитов, но и на его участие в формировании компартментов клетки и роль в ремоделировании актинового цитоскелета мышечной клетки за счет других изоформ, получаемых с гена *TPM1* в результате альтернативного сплайсинга. Tpm — это альфа-спиральный белок, формирующий coiled-coil структуру и способный образовывать полимерный тяж на поверхности актинового филамента. Для ДКМП и НМЛЖ были показаны генетические причины возникновения, среди которых мутации в гене *TPM1*, которые приводят к заменам E40K и E54K в изоформах, начинающихся с экзонов 1a2b и заменам L113V и D159N в изоформах, содержащих 3-й и 4-й экзоны. В связи с этим целью работы было изучение влияния мутаций в гене *TPM1* на свойства цитоплазматической изоформы Tpm1.7 и саркомерной изоформы Tpm1.1.

Вязкость растворов Tpm отображает концевые взаимодействия между димерами тропомиозина. Способность Tpm образовывать протяженный тяж может влиять в том числе и на свойства актинового филамента, которым он декорирован. В целом вязкость растворов Tpm1.7 отличается довольно высокими значениями относительно других изоформ Tpm. Замены E40K и E54K заметно (в два раза, $0,523 \pm 0,032$ для Tpm E40K и $0,570 \pm 0,034$ для Tpm E54K против $1,030 \pm 0,041$ мПа·с для белка дикого типа) снижали вязкость растворов Tpm1.7, что указывает на сниженную способность формировать междимерное взаимодействие. Замена L113V не оказывала влияния на способность Tpm1.7 образовывать филаменты.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00128).

© В. В. Нефёдова, С. Ю. Клейменов, К. К. Лапшина, А. М. Матюшенко, 2025

Структура белка была изучена методами дифференциально сканирующей калориметрии и спектроскопии кругового дихроизма. Для белка Trpm1.7 характерно наличие трех тепловых переходов при температурах 35,2, 44,2 и 51,4 °С, соответствующих центральному, С-концевому и N-концевому участкам структуры белка. У мутантной формы E40K были идентифицированы три перехода с T_m , равными 35,5, 41,9 и 47,6 °С. Для белка с аминокислотной заменой E54K температуры полупереходов составили 32,8, 40,8 и 51,8 °С, а для белка Trpm1.7 L113V они были равны 33,9, 42,8 и 46,5 °С. Таким образом, мутации E40K и L113V действительно более чем на 4 °С дестабилизируют N-концевой участок молекулы Trpm1.7. Обращает внимание и то, что все мутации так же на 2–3 °С дестабилизируют С-концевой домен и на 1–2 °С снижаются температуры полупереходов центральной части молекулы. Это указывает на дальнедействующие эффекты изменений в структуре, при которых изменения в одной части молекулы могут заметно влиять на другую.

Trpm принимает самое активное участие в регуляции перестройки актинового цитоскелета. Известно, что Trpm способен как защищать филамент актина от разборки, так и, напротив, привлекать «разрезающие» белки, например кофилин. Для исследования роли мутантных форм Trpm1.1 в регуляции динамики актинового цитоскелета был использован белок кофилин-2 (cof-2). Для оценки деполимеризующего и разрезающего действия кофилина нами был использован метод вискозиметрии. Добавление cof-2 приводило к снижению вязкости растворов как F-актина, так и актиновых филаментов, декорированных Trpm. Добавление Trpm1.1 увеличивало вязкость растворов актина, что может свидетельствовать о формировании более протяженных фибрилл в присутствии Trpm. Как белок Trpm1.1 дикого типа, так и две мутантные формы E40K и E54K обладали выраженным защитным действием и защищали актиновый филамент от действия cof-2.

Таким образом, мы предполагаем, что мутации E40K и E54K не оказывают влияния на «защитные» свойства Trpm в отношении воздействия кофилина.