

УДК 577.3

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ Leu43Pro В ГЕНЕ *TPM1* НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА СЕРДЕЧНОГО ТРОПОМИОЗИНА

© 2025 г. В.В. Нефедова*, С.Г. Роман*, С.Ю. Клеймёнов*, **, А.М. Матюшенко*, Д.И. Левицкий*, #

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Ленинский просп., 33/2, Москва, 119071, Россия

#E-mail: Levitsky@inbi.ras.ru

**Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334, Россия

Поступила в редакцию 26.11.2024 г.

После доработки 26.11.2024 г.

Принята к публикации 04.12.2024 г.

Исследовано влияние мутации Leu43Pro в гене *TPM1*, кодирующем сердечную изоформу тропомиозина, на структуру и свойства молекулы тропомиозина. Для этого был получен рекомбинантный препарат тропомиозина с аминокислотной заменой L43P в обеих α -цепях двойной суперспирали тропомиозина, т. е. с заменой канонических остатков Leu43 на неканонические остатки Pro, и исследовано влияние этой замены на структурно-функциональные свойства тропомиозина. Методом спектроскопии кругового дихроизма показано, что замена L43P существенно нарушает α -спиральную структуру молекулы тропомиозина. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что эта аминокислотная замена вызывает серьезные изменения в доменной структуре молекулы тропомиозина, приводя к значительной дестабилизации N-концевой части молекулы. При измерениях вязкости растворов тропомиозина показано, что замена L43P снижает вязкость тропомиозина более чем в 7 раз по сравнению с вязкостью контрольного препарата тропомиозина дикого типа. Методом соосаждения тропомиозина с F-актином установлено, что замена L43P существенно снижает сродство тропомиозина к F-актину. Полученные данные наглядно свидетельствуют о том, что аминокислотная замена L43P в обеих α -цепях двойной спирали молекулы тропомиозина значительно изменяет как структуру молекулы, так и функциональные свойства сердечного тропомиозина.

Ключевые слова: тропомиозин, круговой дихроизм, дифференциальная сканирующая калориметрия.

DOI: 10.31857/S0006302925010063, EDN: LXLQFC

Тропомиозин (Tpm) – это актин-связывающий белок, играющий ключевую роль в Ca^{2+} -зависимой регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Молекула Tpm представляет собой димер, состоящий из двух α -спиральных полипептидных цепей, образующих двойную левозакрученную суперспираль (coiled coil), способную взаимодействовать с актиновым филаментом. Димерные молекулы Tpm обладают высоким сродством к актиновым нитям (F-актин) и располагаются на их поверхности; при этом соседние димеры Tpm связываются между собой по принципу «голова к хвосту» и образуют непрерывный тяж, который тянется вдоль всей актиновой нити [1, 2].

Сокращения: Tpm – тропомиозин, F-актин – фибриллярный актин, КД – круговой дихроизм, ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.

Характерной особенностью первичной структуры полипептидных цепей Tpm, образующих двойную суперспираль, является периодичность: их аминокислотная последовательность организована в виде повторяющихся мотивов (гептад) из семи аминокислот, где каждой аминокислоте присвоена латинская буква (*abcdefg*)_n. В первую очередь, в положениях *a* и *d* требуется наличие гидрофобных остатков (таких, как валин, лейцин и изолейцин), взаимодействие между которыми является главным фактором стабилизации двойной суперспирали. Другие аминокислотные остатки в этих положениях обладают гораздо меньшей способностью стабилизировать двойную суперспираль Tpm, тогда как пролин в таком положении не стабилизирует, а, напротив, дестабилизирует двойную α -спираль. Кроме того, положения *e* и *g* гептадного повтора обычно заняты аминокислотными остатками с противоположно

заряженными радикалами, электростатическое взаимодействие между которыми дополнительно стабилизирует двойную суперспираль молекулы Трм. И, наконец, оставшиеся позиции *b*, *c* и *f* гептадного повтора заняты остатками с полярными радикалами, поскольку они формируют поверхность двойной спирали, находясь в непосредственном контакте с растворителем и, кроме того, отвечают за взаимодействие Трм с белками-партнерами, такими как актин и тропонин [2].

К настоящему времени в гене *TPM1*, кодирующем сердечную изоформу Трм (Трм1.1), выявлено много мутаций, ассоциированных с развитием таких тяжелых наследственных заболеваний человека, как гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии, а также некомпактная кардиомиопатия левого желудочка [3–6]. Для некоторых из них удалось выяснить, хотя бы отчасти, те молекулярные механизмы, которые лежат в основе развития заболевания. Для этого получали рекомбинантные препараты Трм1.1 с аминокислотными заменами, соответствующими таким мутациям, и исследовали влияние этих замен на структуру молекулы Трм1.1 и ее функциональные свойства, используя для этих целей широкий спектр различных методов и подходов. К числу таких кардиомиопатических мутаций в гене *TPM1*, для которых был достаточно хорошо изучен механизм их патогенности, можно отнести мутации D175N и E180G [7–11], I172T, E180V и L185R [12], M8R, K15N, A277V, M281T и I284V [13], E40K и E54K [11, 14], D84N [15], K15N [16], D230N [17], T237S [18], A219V [19], E98K [20] и ряд других. Однако для большинства кардиомиопатических мутаций в гене *TPM1*, идентифицированных к настоящему времени и приведенных в базе данных ClinVar, мало что пока известно о молекулярном механизме, лежащем в основе их патогенности. Среди множества таких мутаций в гене *TPM1* обнаружено всего 7 мутаций, приводящих к замене лейцина, серина или аланина на остаток пролина, и среди них — только две замены канонического остатка лейцина в положении *a* гептадного повтора на абсолютно неканонический пролин: L43P (с.128T>C) и L57P (с.170T>C).

Как отмечалось выше, введение пролина в положение *a* гептадного повтора должно заметно дестабилизировать структуру двойной α -спирали молекулы Трм. Поэтому можно предположить, что замены L43P или L57P в этом положении должны оказывать влияние как на структуру молекулы Трм1.1, так, по-видимому, и на ее функциональные свойства (такие, например, как способность Трм1.1 взаимодействовать с актином). Для проверки этого предположения мы получили рекомбинантный препарат сердечной изоформы Трм1.1 с одной из этих аминокислотных замен (L43P) в обеих α -цепях двойной суперспирали и исследовали ее влияние на структуру молекулы

Трм1.1 и на ее способность взаимодействовать с F-актином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Рекомбинантный препарат сердечной изоформы Трм1.1 человека с аминокислотной заменой L43P в обеих α -цепях молекулы получали, как описано ранее [19, 20]. Оба исследуемых препарата Трм1.1 — Трм1.1 L43P и контрольный Трм1.1 дикого типа (Трм1.1 WT) — несли на N-конце дополнительный дипептид Ala-Ser для имитации естественного N-концевого ацетилирования Трм [21]. Мутантный препарат Трм1.1 L43P был получен в бактериальной экспрессионной плазмиде pet23a⁺ методом ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза с использованием ДНК-полимеразы Q5 (NEB, New England Biolabs, США). Для получения конструкции, несущей мутацию L43P, использовали следующие олигонуклеотиды: 5'-GAAGATGAG-CCGGTGTCACTGCAAAAG-3' в качестве прямого праймера (мутированный кодон подчеркнут) и 5'-CAGCTGCTTGCTCCTGTCTTCCG-3' в качестве обратного праймера. Полученная плаزمид была проверена путем секвенирования («Евроген», Россия) для подтверждения замены. Экспрессию и очистку белка проводили, как описано ранее [13]. Концентрацию препаратов Трм1.1 WT и Трм1.1 L43P определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции $E^{1\%}$, равного 2.73 см^{-1} .

Актин получали из скелетных мышц кролика по стандартной методике [22]. Мономерный G-актин полимеризовали в филаменты F-актина, добавляя к нему KCl и MgCl_2 до конечной концентрации 100 и 4 мМ соответственно.

Круговой дихроизм. Спектры кругового дихроизма (КД) препаратов Трм (1 мг/мл) в дальнем УФ-диапазоне регистрировали при 5°C на дихрографе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics, Великобритания) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0.2 мм. Измерения теплового разворачивания белка проводили, как описано ранее [12, 20], путем измерения молярной эллиптичности Трм при 222 нм (θ_{222}) в диапазоне температур от 5°C до 75°C при постоянной скорости нагрева 1°C/мин. Эксперименты проводили в 30 мМ HEPES-Na-буфере, pH 7.3, содержащем 100 мМ NaCl и 2 мМ дитиотреитола; концентрация белка составляла 1 мг/мл. Обратимость процесса тепловой денатурации препаратов Трм оценивали путем повторного нагревания образцов непосредственно после их охлаждения. Тепловое разворачивание обоих препаратов Трм, Трм1.1 WT и Трм1.1 L43P, было полностью обратимым.

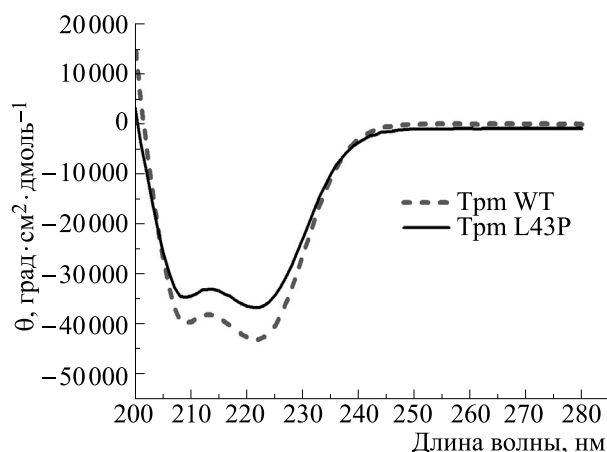


Рис. 1. Спектры КД препаратов Трм дикого типа (Трм WT) и мутантного белка с заменой L43P (Трм L43P), зарегистрированные при 5°C и концентрации белка 1 мг/мл.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Эксперименты методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили, как описано ранее [19, 20], на дифференциальном сканирующем микрокалориметре MicroCal VP-Capillary (Malvern Instruments, США) при скорости нагрева 1 К/мин в 30 мМ HEPES-Na-буфере, pH 7.3, содержащем 100 мМ NaCl. Концентрация белка составляла 2 мг/мл. Образцы Трм были восстановлены перед этими экспериментами путем нагревания при 60°C в течение 20 мин в присутствии 3 мМ дитиотреитола. После такой процедуры все образцы Трм находились в полностью восстановленном состоянии [23]. Тепловая денатурация исследованных препаратов Трм была полностью обратимой, что позволяло провести деконволюцию кривых теплопоглощения, то есть их разложение на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены). Деконволюционный анализ был выполнен с использованием программного обеспечения Origin v. 7.5 (MicroCal Inc., США), как было описано ранее [23].

Вязкозиметрия. Измерения вязкости растворов Трм проводили с помощью микровязкозиметра с падающим шариком фирмы Anton Paar AMVn (США) в капилляре емкостью 0.5 мл при 20°C, как описано ранее [13, 20, 24]. Все измерения проводили при концентрации Трм 4.0 мг/мл в 30 мМ HEPES-Na-буфере (pH 7.3), содержащем 100 мМ NaCl и 2 мМ дитиотреитола. Вязкость каждого образца Трм измеряли не менее трех раз, значения вязкости усредняли по сравнению с вязкостью буфера.

Соосаждение тропомиозина с F-актином. Сродство препаратов Трм к F-актину оценивали с помощью анализа их совместного осаждения [13, 20]. Вкратце, F-актин в концентрации 10 мкМ

смешивали с увеличивающимися концентрациями Трм при 20°C в 30 мМ HEPES-Na-буфере, pH 7.3, содержащем 200 мМ NaCl, после чего F-актин осаждали ультрацентрифугированием при 100 000 g в течение 40 мин, и эквивалентные образцы осадка и супернатанта подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [25]. Белковые полосы сканировали и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.53k (Scion Corp., США). Для каждого образца Трм проводили два-три измерения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего мы исследовали влияние мутации L43P на вторичную структуру молекулы Трм1.1 (далее — просто Трм), используя метод КД. В первую очередь мы сравнили спектр КД, полученный для Трм с мутацией L43P, со спектром для контрольного Трм WT (рис. 1). Хорошо видно, что величина отрицательного максимума при 222 нм, отражающего содержание α-спиралей в белке, у Трм L43P заметно ниже (на 16 %), чем у Трм WT. Это свидетельствует о том, что мутация L43P существенно нарушает α-спиральную структуру молекулы Трм. Затем мы исследовали методом КД тепловую денатурацию Трм L43P, регистрируя температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм для этого препарата и сравнивая их с зависимостями, полученными для Трм WT (рис. 2). Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что такие зависимости существенно различаются у Трм L43P и Трм WT, особенно в области относительно высоких температур (выше 35°C) (рис. 2а). Наиболее отчетливо это различие видно при переводе интегральных кривых, приведенных на рис. 2а, в дифференциальную форму (рис. 2б). В этом случае отчетливо видна разница между Трм L43P и Трм WT: у Трм L43P почти полностью исчезает плечо в области с 50°C до 60°C, характерное для Трм WT, а главный пик, наблюдаемый для Трм L43P при 42.7°C, смещен на 3.3°C в сторону более низких значений температуры относительно пика для Трм WT (рис. 2б). Все это свидетельствует о том, что мутация L43P вызывает существенную дестабилизацию молекулы Трм.

Для более подробного анализа структурных изменений, вызываемых в молекуле Трм мутацией L43P, мы применили метод ДСК, позволяющий проводить деконволюционный анализ температурных зависимостей теплопоглощения белка, т. е. разлагать эти зависимости на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), отражающие тепловую денатурацию различных участков белковой молекулы. Данные, полученные методом ДСК при сравнении доменных

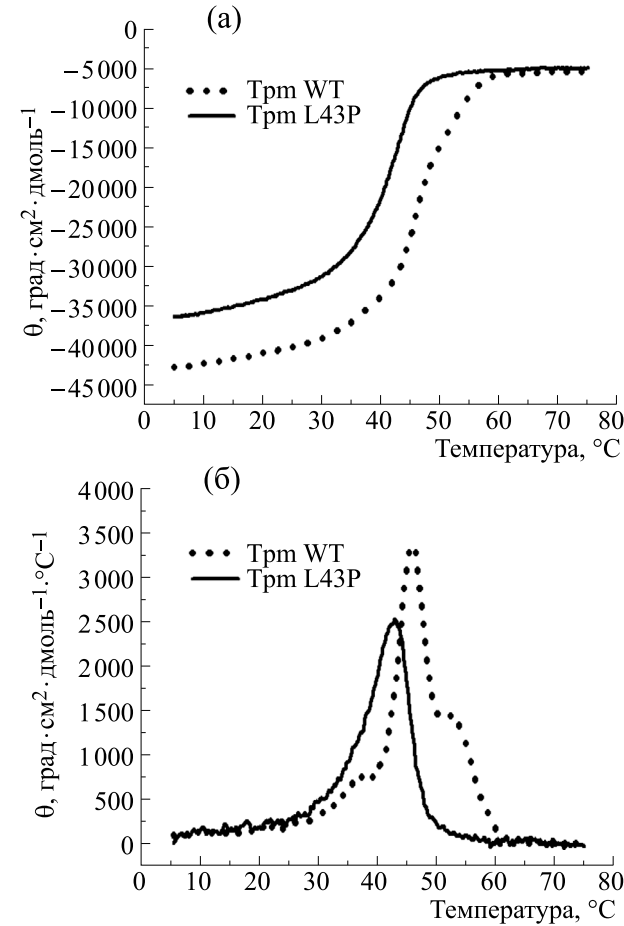


Рис. 2. Температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для Trpm WT и Trpm L43P. Данные представлены как в интегральном виде (а), так и в дифференциальном виде (б), т.е. в виде первых производных от зависимостей, представленных на рисунке (а).

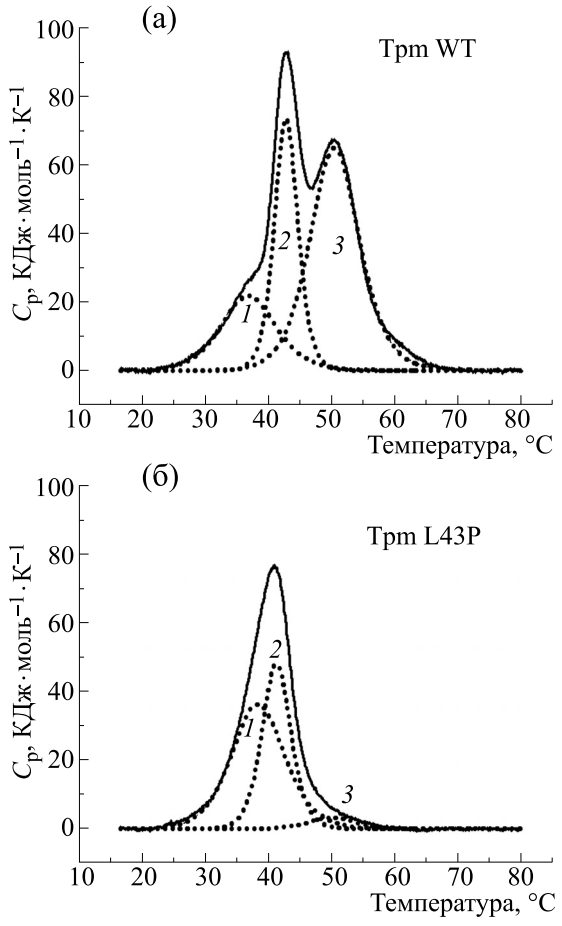


Рис. 3. Температурные зависимости избыточной теплоемкости (C_p), полученные методом ДСК для Trpm WT (а) и Trpm L43P (б), и результаты разложения этих зависимостей на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены 1, 2 и 3, показанные пунктиром).

Таблица 1. Значения калориметрических параметров для отдельных тепловых переходов (калориметрических доменов) препаратов сердечного тропомиозина

Препарат Trpm	T_m , °C	ΔH_{cal} , кДж/моль	ΔH_{cal} , % от суммарной	Суммарная ΔH_{cal} , кДж/моль
Trpm WT				1280
Домен 1	36.8	250	20	
Домен 2	42.7	360	28	
Домен 3	50.4	670	52	
Trpm L43P				730
Домен 1	38.3	405	55	
Домен 2	41.2	290	40	
Домен 3	50.0	35	5	

Примечание. Значения калориметрических параметров получены из данных ДСК (рис. 3) для препаратов Trpm дикого типа (Trpm WT) и с мутацией L43P (Trpm L43P). Ошибка приведенных значений температуры максимума теплового перехода (T_m) не превышала $\pm 0.2^\circ\text{C}$, а относительная ошибка значений калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}) не превышала $\pm 10\%$.

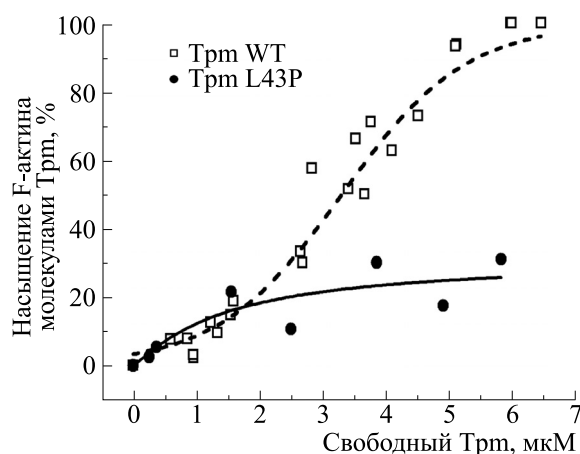


Рис. 4. Влияние аминокислотной замены L43P на сродство Trpm к F-актину. Результаты получены при анализе соосаждения Trpm WT и Trpm L43P с F-актином и представлены в виде зависимости доли F-актина, насыщенного молекулами Trpm, от концентрации свободного Trpm, обнаруженного в супернатанте.

структур Trpm L43P и Trpm WT, представлены на рис. 3 и в табл. 1. Сразу отметим, что значение калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}), т. е. площади под кривой теплопоглощения, в случае Trpm L43P намного ниже (в 1.75 раза), чем в случае Trpm WT (см. табл. 1). Это обусловлено главным образом тем, что в случае Trpm L43P на термограмме почти полностью исчезает самый термостабильный калориметрический домен 3, характерный для Trpm WT (рис. 3). При этом у Trpm L43P, по сравнению с Trpm WT, на 20% снижается энтальпия домена 2, но заметно повышается (на 60%) энтальпия домена 1 (см. табл. 1). Все это свидетельствует о том, что мутация L43P вызывает серьезные изменения в доменной структуре молекулы Trpm.

В предыдущих исследованиях была проведена идентификация калориметрических доменов на термограмме Trpm WT (т. е. было выявлено их соответствие определенным частям молекулы Trpm) и было установлено, что домены 2 и 3 отражают соответственно тепловую денатурацию С-концевой и N-концевой частей молекулы Trpm [9, 23], тогда как наименее термостабильный домен 1 отражает, скорее всего, денатурацию некоторых других областей молекулы, таких как ее средняя часть или перекрывающееся соединение между N- и С-концами соседних молекул Trpm [13, 23]. Исходя из этих данных и сопоставляя их с результатами ДСК (рис. 3а,б), можно заключить, что аминокислотная замена L43P приводит к очень серьезной дестабилизации N-концевой части молекулы Trpm; в результате некоторые области в этой части молекулы денатурируют при гораздо более низких температурах, повышая таким образом энтальпию наименее термостабильного калориметрического домена 1.

Результаты, полученные методом ДСК и показывающие значительную дестабилизацию N-концевой части молекулы Trpm L43P (рис. 3б), позволяют предположить, что аминокислотная замена L43P, расположенная довольно близко к N-концу молекулы, может оказывать влияние на взаимодействие между N- и С-концами молекул Trpm, необходимое для полимеризации Trpm с образованием длинных нитей. Чтобы проверить это предположение, мы измерили вязкость раствора Trpm L43P и сравнили ее с вязкостью Trpm WT. Результаты показали, что после вычитания вязкости буфера вязкость раствора Trpm L43P (0.08 ± 0.02 мПа·с) резко отличается от вязкости для Trpm WT (0.61 ± 0.03 мПа·с). Это свидетельствует о том, что аминокислотная замена L43P, снижающая вязкость раствора Trpm более чем в 7 раз, оказывает сильное влияние на взаимодействие между N- и С-концами молекул Trpm, практически предотвращая формирование длинных нитей, образуемых молекулами Trpm при их полимеризации.

Образование длинных нитей Trpm является необходимым условием для полноценного взаимодействия молекул Trpm с актиновыми филаментами. Поэтому легко предположить, что замена L43P, значительно снижающая вязкость раствора Trpm, должна оказывать существенное влияние на способность молекул Trpm связываться с F-актином. Для проверки этого предположения мы исследовали влияние аминокислотной замены L43P на сродство Trpm к F-актину, используя метод соосаждения Trpm с F-актином. Суть такого подхода состоит в том, что F-актин, в отличие от Trpm, осаждается при ультрацентрифугировании, а Trpm может попасть в осадок только вследствие его взаимодействия с актиновыми филаментами. Полученные результаты свидетельствуют о том,

что аминокислотная замена L43P существенно снижает сродство Трм к F-актину. В условиях, когда актиновые филаменты полностью насыщены молекулами Трм WT (при концентрации Трм WT, равной 6 мкМ), насыщение филаментов молекулами Трм с заменой L43P едва достигает 25–30% (рис. 4).

Интересно отметить, что сходная ситуация наблюдалась нами ранее при исследовании влияния кардиомиопатической мутации M8R в гене *TPM1* на свойства сердечного Трм [13]. Было показано, что аминокислотная замена M8R, расположенная поблизости от N-конца молекулы Трм, резко снижает, подобно замене L43P, как вязкость раствора Трм, так и сродство Трм к F-актину [13]. Следует отметить, однако, что в последующих исследованиях было установлено, что в присутствии полного тропонинового комплекса сродство Трм M8R к F-актину почти полностью восстанавливается и мало отличается от сродства, характерного для Трм WT [26]. Было высказано предположение, что тропонин может «прижимать» Трм к поверхности актинового филамента, восстанавливая взаимодействие между молекулами Трм на поверхности филамента, нарушенное мутацией M8R [26]. Не исключено, что нечто подобное может, в принципе, иметь место и в случае Трм с аминокислотной заменой L43P. Проверка этого предположения составит предмет наших дальнейших исследований в данном направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные наглядно свидетельствуют о том, что аминокислотная замена L43P в обеих α -цепях двойной спирали молекулы Трм (т. е. замена канонического остатка Leu в положении *a* гептадного повтора на абсолютно неканонический Pro) значительно изменяет структуру и свойства Трм. Представляется крайне маловероятным, что такая серьезная мутация в гене *TPM1* могла бы иметь место в гомозиготном состоянии, поскольку в этом случае она, скорее всего, приводила бы к преждевременной смерти плода еще до рождения. Более вероятным, однако, представляется наличие мутации L43P в гене *TPM1* в гетерозиготном состоянии; в этом случае молекулы Трм могли бы нести мутацию лишь в одной из двух α -цепей двойной спирали. Для проверки этого предположения следует получить препараты Трм с заменой L43P лишь в одной из двух цепей молекулы, что является весьма непростой задачей. Тем не менее, в дальнейшем мы собираемся получить такие препараты и выяснить, как влияет замена L43P в одной из двух α -цепей на структуру и свойства сердечного Трм. Другой важной задачей наших дальнейших исследований является изучение функциональных свойств регулируемых ак-

тиновых филаментов, содержащих тропонин и Трм, несущий замену L43P либо в обеих α -цепях, либо только в одной из них.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00059).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием животных и человека в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perry S. V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **22**, 5–49 (2001).
2. Nevzorov I. A. and Levitsky D. I. Tropomyosin: double helix from the protein world. *Biochemistry (Moscow)*, **76** (13), 1507–1527 (2011). DOI: 10.1134/S0006297911130098
3. Redwood C. and Robinson P. Alpha-tropomyosin mutations in inherited cardiomyopathies. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **34**, 285–294 (2013). DOI: 10.1007/s10974-013-9358-5
4. Moraczewska J. Thin filament dysfunctions caused by mutations in tropomyosin Tpm3.12 and Tpm1.1. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **41**, 39–53 (2020). DOI: 10.1007/s10974-019-09532-y
5. Matyushenko A. M. and Levitsky D. I. Molecular mechanisms of pathologies of skeletal and cardiac muscles caused by point mutations in the tropomyosin genes. *Biochemistry (Moscow)*, **85** (Suppl. 1), S20–S33 (2020). DOI: 10.1134/S0006297920140023
6. Man Y., Yi C., Fan M., Yang T., Liu P., Liu S., and Wang G. Identification of a novel missense mutation in the *TPM1* gene via exome sequencing in a Chinese family with dilated cardiomyopathy: a case report and literature review. *Medicine*, **101**, e28551 (2022). DOI: 10.1097/MD.00000000000028551
7. Bing W., Knott A., Redwood C., Esposito G., Purcell I., Watkins H., and Marston S. Effect of hypertrophic cardiomyopathy mutations in human cardiac muscle α -tropomyosin (Asp175Asn and Glu180Gly) on the regulatory properties of human cardiac troponin determined by *in vitro* motility assay. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **32** (8), 1489–1498 (2000). DOI: 10.1006/jmcc.2000.1182
8. Golitsina N., An Y., Greenfield N. J., Thierfelder L., Iizuka K., Seidman J. G., Seidman C. E., Lehrer S. S., and Hitchcock-DeGregori S. E. Effects of two familial hyper-

- trophic cardiomyopathy-causing mutations on α -tropomyosin structure and function. *Biochemistry*, **36** (15), 4637–4642 (1997). DOI: 10.1021/bi962970y
9. Kremneva E., Boussof S., Nikolaeva O., Maytum R., Geeves M. A., and Levitsky D. I. Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in α -tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin. *Biophys. J.*, **87**, 3922–3933 (2004). DOI: 10.1529/biophysj.104.048793
 10. Li X. E., Suphamungmee W., Janco M., Geeves M. A., Marston S. B., Fischer S., and Lehman W. The flexibility of two tropomyosin mutants, D175N and E180G, that cause hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424**, 493–496 (2012). DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.141
 11. Kopylova G. V., Shchepkin D. V., Nabiev S. R., Matyushenko A. M., Koubassova N. A., Levitsky D. I., and Bershitsky S. Y. Cardiomyopathy-associated mutations in tropomyosin differently affect actin-myosin interaction at single-molecule and ensemble levels. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **40**, 299–308 (2019). DOI: 10.1007/s10974-019-09560-8
 12. Matyushenko A. M., Shchepkin D. V., Kopylova G. V., Poprug K. E., Artemova N. V., Pivovarova A. V., Bershitsky S. Y., and Levitsky D. I. Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in troponin T-binding region of cardiac tropomyosin. *Biochemistry*, **56**, 250–259 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00994
 13. Matyushenko A. M., Koubassova N. A., Shchepkin D. V., Kopylova G. V., Nabiev S. R., Nikitina L. V., Bershitsky S. Y., Levitsky D. I., and Tsaturyan A. K. The effects of cardiomyopathy-associated mutations in the head-to-tail overlap junction of α -tropomyosin on its properties and interaction with actin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 1266–1274 (2019). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.105
 14. Mirza M., Robinson P., Kremneva E., Copeland O., Nikolaeva O., Watkins H., Levitsky D., Redwood C., El-Mezgueldi M., and Marston S. The effect of mutations in α -tropomyosin (E40K and E54K) that cause familial dilated cardiomyopathy on the regulatory mechanism of cardiac muscle thin filaments. *J. Biol. Chem.*, **282**, 13487–13497 (2007). DOI: 10.1074/jbc.M701071200
 15. Van de Meerakker J. B., Christiaans I., Barnett P., Lekanne Deprez R. H., Ilgun A., Mook O. R., Mannens M. M., Lam J., Wilde A. A., Moorman A. F., and Postma A. V. A novel alpha-tropomyosin mutation associates with dilated and non-compaction cardiomyopathy and diminishes actin binding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 833–839 (2013). DOI: 10.1016/j.bbamer.2012.11.003
 16. Colpan M., Ly T., Grover S., Tolkatchev D., and Kostyukova A. S. The cardiomyopathy-associated K15N mutation in tropomyosin alters actin filament pointed end dynamics. *Arch. Biochem. Biophys.*, **630**, 18–26 (2017). DOI: 10.1016/j.abb.2017.07.006
 17. Lakdawala N. K., Dellefave L., Redwood C. S., Sparks E., Cirino A. L., Depalma S., Colan S. D., Funke B., Zimmerman R. S., Robinson P., Watkins H., Seidman C. E., Seidman J. G., McNally E. M., and Ho C. Y. Familial dilated cardiomyopathy caused by an alpha-tropomyosin mutation: the distinctive natural history of sarcomeric dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **55** (4), 320–329 (2010). DOI: 10.1016/j.jacc.2009.11.017
 18. Barrick S. K., Garg A., Greenberg L., Zhang S., Lin C.-Y., Stitzel N. O., and Greenberg M. J. Functional assays reveal the pathogenic mechanism of a *de novo* tropomyosin variant identified in patient with dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **176**, 58–67 (2023). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2023.01.014
 19. Tsaturyan A. K., Zaklyazminskaya E. V., Polyak M. E., Kopylova G. V., Shchepkin D. V., Kochurova A. M., Gonchar A. D., Kleymenov S. Y., Koubassova N. A., Bershitsky S. Y., Matyushenko A. M., and Levitsky D. I. *De novo* Asp219Val mutation in cardiac tropomyosin associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (1), 18 (2023). DOI: 10.3390/ijms24010018
 20. Matyushenko A. M., Nefedova V. V., Kochurova A. M., Kopylova G. V., Koubassova N. A., Shestak A. G., Yampolskaya D. S., Shchepkin D. V., Kleymenov S. Y., Ryabkova N. S., Katrukha I. A., Bershitsky S. Y., Zaklyazminskaya E. V., Tsaturyan A. K., and Levitsky D. I. Novel mutation Glu98Lys in cardiac tropomyosin alters its structure and impairs myocardial relaxation. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 12359 (2023). DOI: 10.3390/ijms241512359
 21. Monteiro P. B., Lатарo R. C., Ferro J. A., and Reinach F. D. C. Functional α -tropomyosin produced in *Escherichia coli*. A dipeptide extension can substitute the amino-terminal acetyl group. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10461–10466 (1994).
 22. Pardee J. D. and Spudich J. A. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.*, **85** (Pt B), 164–179 (1982). DOI: 10.1016/0076-687985020-9
 23. Matyushenko A. M., Artemova N. V., Sluchanko N. N., and Levitsky D. I. Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin on the domain structure of its molecule. *Biophys. Chem.*, **196**, 77–85 (2015). DOI: 10.1016/j.bpc.2014.10.001
 24. Nefedova V. V., Koubassova N. A., Borzova V. A., Kleymenov S. Y., Tsaturyan, A. K., Matyushenko A. M., and Levitsky D. I. Tropomyosin pseudo-phosphorylation can rescue the effects of cardiomyopathy-associated mutations. *Int. J. Biol. Macromol.*, **166**, 424–434 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.201
 25. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
 26. Nefedova V. V., Kopylova G. V., Shchepkin D. V., Kochurova A. M., Kechko O. I., Borzova V. A., Ryabkova N. S., Katrukha I. A., Mitkevich V. A., Bershitsky S. Y., Matyushenko A. M., and Levitsky D. I. Impact of troponin in cardiomyopathy development caused by mutations in tropomyosin. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15723 (2022). DOI: 10.3390/ijms232415723

Effects of Leu43Pro Mutation in the *TPM1* Gene on the Structure and Properties of Cardiac Tropomyosin

V.V. Nefedova*, S.G. Roman*, S.Y. Kleymenov*, **, A.M. Matyushenko*, and D.I. Levitsky*

**Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

***Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

We investigated the effect of the Leu43Pro mutation in the *TPM1* gene encoding the cardiac tropomyosin isoform on the structure and properties of the tropomyosin molecule. For this purpose, we obtained a recombinant tropomyosin preparation with the L43P amino acid substitution in both α -chains of the tropomyosin double superhelix, i.e. with the substitution of the canonical Leu43 residues by the non-canonical Pro residues, and studied the effect of this substitution on the structural and functional properties of tropomyosin. Circular dichroism spectroscopy showed that the L43P substitution significantly disrupts the α -helical structure of the tropomyosin molecule. Differential scanning calorimetry showed that this amino acid substitution causes serious changes in the domain structure of the tropomyosin molecule, leading to significant destabilization of the N-terminal part of the molecule. Measurements of the viscosity of tropomyosin solutions showed that the L43P substitution reduced the viscosity of tropomyosin by more than 7 times compared to the viscosity of the control wild type tropomyosin preparation. It was found, using the method of co-precipitation of tropomyosin with F-actin, that the L43P substitution significantly reduced the affinity of tropomyosin for F-actin. The data obtained clearly indicate that the L43P substitution in both α -chains of the double helix of the tropomyosin molecule significantly changes both the structure of the molecule and the functional properties of cardiac tropomyosin.

Keywords: tropomyosin, circular dichroism, differential scanning calorimetry