

УДК: 577.32

## Молекулярно-динамическое исследование влияния мутаций в молекуле тропомиозина на свойства тонких нитей сердечной мышцы

В. Д. Гулеенкова<sup>1,a</sup>, Д. М. Ершова<sup>1,b</sup>, А. К. Цатурян<sup>2,c</sup>, Н. А. Кубасова<sup>1,d</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Институт механики,  
Россия, 119192, г. Москва, Мичуринский проспект, д. 1

<sup>2</sup>Университет Тель Авива, медицинский факультет,  
Рамат-Авив, Тель-Авив, 69978, Израиль

E-mail: <sup>a</sup> guleenkova123@gmail.com, <sup>b</sup> dmershova@icloud.com, <sup>c</sup> andrey.tsaturyan@gmail.com,  
<sup>d</sup> natalia@imec.msu.ru

Получено 29.11.2023, после доработки — 09.02.2024.

Принято к публикации 01.03.2024.

Сокращением поперечно-полосатых мышц управляют регуляторные белки — тропонин и тропомиозин, ассоциированные с тонкими актиновыми нитями в саркомерах. В зависимости от концентрации  $Ca^{2+}$  тонкая нить перестраивается, и тропомиозин смещается по ее поверхности, открывая или закрывая доступ к актину для моторных доменов миозиновых молекул и вызывая сокращение или расслабление соответственно. Известны многочисленные точечные аминокислотные замены в тропомиозине, приводящие к генетическим патологиям — мио- и кардиомиопатиям, что обусловлено изменениями структурных и функциональных свойств тонкой нити. Представлены результаты молекулярно-динамического моделирования фрагмента тонкой нити саркомеров сердечной мышцы, образованной фибриллярным актином и тропомиозином дикого типа или тропомиозином с аминокислотными заменами: двойной стабилизирующей D137L/G126R либо кардиомиопатической S215L. Для расчетов использовали новую модель фрагмента тонкой нити, содержащую 26 мономеров актина и 4 димера тропомиозина, с уточненной структурой области перекрытия соседних молекул тропомиозина в каждом из двух тропомиозиновых тяжей. Результаты моделирования показали, что добавление тропомиозина к нити актина существенно увеличивает ее изгибную жесткость, как было ранее найдено экспериментально. Двойная стабилизирующая замена D137L/G126R приводит к дальнейшему увеличению изгибной жесткости нити, а замена S215L, наоборот, — к ее снижению, что также соответствует экспериментальным данным. В то же время эти замены по-разному влияют на угловую подвижность актиновой спирали и лишь незначительно модулируют угловую подвижность тропомиозиновых тяжей по отношению к спирали актина и населенность водородных связей между отрицательно заряженными остатками тропомиозина и положительно заряженными остатками актина. Результаты верификации модели показали, что ее качество достаточно для того, чтобы проводить численное исследование влияния одиночных аминокислотных замен на структуру и динамику тонких нитей и изучать эффекты, приводящие к нарушениям регуляции мышечного сокращения. Эта модель может быть использована как полезный инструмент выяснения молекулярных механизмов некоторых известных генетических заболеваний и оценки патогенности недавно обнаруженных генетических вариантов.

Ключевые слова: сердечная мышца, актин, тропомиозин, молекулярная динамика, мутации, кардиомиопатия

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 22-24-00221.

UDC: 577.32

## Molecular dynamics study of the effect of mutations in the tropomyosin molecule on the properties of thin filaments of the heart muscle

V. D. Guleenkova<sup>1,a</sup>, D. M. Ershova<sup>1,b</sup>, A. K. Tsaturyan<sup>2,c</sup>,  
N. A. Koubassova<sup>1,d</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Institute of mechanics,  
1 Mitchurinsky pr., Moscow, 119192, Russia

<sup>2</sup>Tel Aviv University, Faculty of Medicine,  
Ramat Aviv, Tel Aviv, 69978, Israel

E-mail: <sup>a</sup> guleenkova123@gmail.com, <sup>b</sup> dmershova@icloud.com, <sup>c</sup> andrey.tsaturyan@gmail.com,  
<sup>d</sup> natalia@imec.msu.ru

*Received 29.11.2023, after completion – 09.02.2024.*

*Accepted for publication 01.03.2024.*

Muscle contraction is controlled by Ca<sup>2+</sup> ions via regulatory proteins, troponin and tropomyosin, associated with thin actin filaments in sarcomeres. Depending on the Ca<sup>2+</sup> concentration, the thin filament rearranges so that tropomyosin moves along its surface, opening or closing access to actin for the motor domains of myosin molecules, and causing contraction or relaxation, respectively. Numerous point amino acid substitutions in tropomyosin are known, leading to genetic pathologies — myo- and cardiomyopathies caused by changes in the structural and functional properties of the thin filament. The results of molecular dynamics modeling of a fragment of a thin filament of cardiac muscle sarcomeres formed by fibrillar actin and wild-type tropomyosin or with amino acid substitutions: the double stabilizing substitution D137L/G126R and the cardiomyopathic substitution S215L are presented. For numerical calculations, we used a new model of a thin filament fragment containing 26 actin monomers and 4 tropomyosin dimers, with a refined structure of the region of overlap of neighboring tropomyosin molecules in each of the two tropomyosin strands. The simulation results showed that tropomyosin significantly increases the bending stiffness of the thin filament, as previously found experimentally. The double stabilizing replacement D137L/G126R leads to a further increase in this rigidity, and the replacement S215L, on the contrary, leads to its decrease, which also corresponds to experimental data. At the same time, these substitutions have different effects on the angular mobility of the actin helix and only slightly modulate the angular mobility of tropomyosin cables relative to the actin helix and the population of hydrogen bonds between negatively charged tropomyosin residues and positively charged actin residues. The results of the verification of the new model demonstrate that its quality is sufficient for the numerical study of the effect of single amino acid substitutions on the structure and dynamics of thin filaments and study the effects leading to dysregulation of muscle contraction. This model can be used as a useful tool for elucidating the molecular mechanisms of some genetic diseases and assessing the pathogenicity of newly discovered genetic variants.

**Keywords:** cardiac muscle, actin, tropomyosin, molecular dynamics, mutations, cardiomyopathy

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2024, vol. 16, no. 2, pp. 513–524 (Russian).

This work was supported by grant 22-24-00221 of the Russian Science Foundation.

## Введение

Сокращение поперечно-полосатых, т. е. сердечной или скелетных, мышц происходит в результате взаимодействия глобулярных моторных доменов (головок) молекул миозина, выступающих из толстых нитей, с мономерами актина, составляющими основу тонких нитей в саркомерах. Это взаимодействие регулируется ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , увеличение концентрации которых в мышечной клетке приводит к ее сокращению, а уменьшение — к расслаблению. Управление сокращением реализуется регуляторными белками, тропомиозином (Трп) и тропонином (Тп), которые ассоциированы с актиновыми нитями и также входят в структуру тонких нитей [McKillop, Geeves, 1993]. Молекула Трп — длинный, около 40 нм, димер, в котором образующие его  $\alpha$ -спиральные цепи скручены в суперспираль [Невзоров, Левицкий, 2011]. Молекулы Трп соединяются между собой «голова к хвосту», образуя длинный тяж на поверхности актиновой нити, при этом одна молекула Трп взаимодействует с семью мономерами актина. В отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  Тп удерживает Трп в блокирующем положении, в котором он закрывает участки связывания с миозином на актине. Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает перестройку Тп и связанного и с ним Трп так, что тропомиозиновый тяж поворачивается и делает возможным первоначальное связывание миозина с актином — система переходит в закрытое состояние. Переход слабо связанного актин-миозинового комплекса в состояние прочного взаимодействия, сопровождающееся генерацией активной силы, приводит к дальнейшему смещению Трп-тяжа в открытое состояние. В этом состоянии и соседние мономеры актина становятся доступными для связывания с миозином. Таким образом, связывание небольшого числа миозиновых головок с актином облегчает присоединение новых головок, что важно для развития силы. Этот эффект называют кооперативностью актин-миозинового взаимодействия [McKillop, Geeves, 1993]. Регуляторные характеристики комплекса Трп–Тп во многом определяются механическими и динамическими факторами, в частности амплитудой флуктуаций тяжа относительно равновесного положения, его взаимодействием с актином и собственной изгибной жесткостью, благодаря которой локальные изменения, вызванные связыванием ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с тропонином или присоединением миозина к актину, передаются вдоль нити на большие расстояния [Smith, Maytum, Geeves, 2003; Metalnikova, Tsaturyan, 2013; Geeves, Lehrer, Lehman, 2019].

Многие заболевания сердечной и скелетных мышц связаны с мутациями в генах, кодирующих различные изоформы Трп мышц [Матюшенко, Левицкий, 2020]. Молекулярные механизмы патогенности большинства таких мутаций остаются неизвестными, но при некоторых патологиях наблюдают определенные закономерности, которые связаны в том числе с изменением механических характеристик Трп. Например, при гипертрофической кардиомиопатии наблюдают утолщение стенок левого желудочка сердца и уменьшение объема его полости: это часто связано с дестабилизацией блокированного состояния, увеличением восприимчивости сократительного аппарата к концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , что в некоторых случаях сопровождается изменением персистентной длины Трп-молекул [Li et al., 2012; Kopylova et al., 2019].

Одним из подходов к пониманию этих механизмов является молекулярно-динамическое (МД) моделирование, позволяющее исследовать влияние аминокислотных замен на структуру и динамику молекул Трп и их комплексов с другими белками тонкой нити. До недавнего времени МД-моделирование было направлено лишь на исследования отдельных Трп-молекул (см., например, [Li, Lehman, Fischer, 2010; Matyushenko et al., 2014]), что не позволяло учесть взаимодействие Трп с Тп и актином и передачу механической информации вдоль относительно жесткого Трп-тяжа. В последние годы появились публикации с результатами МД моделирования фрагментов тонкой нити [Zheng, Hitchcock-DeGregori, Barua, 2016; Zheng, Wen, 2019; Lehman et al., 2019]. Однако качество и предсказательная сила МД-расчетов были ограничены качеством исходных структур тонкой нити, имевших низкое разрешение. Лишь после публикации структуры тонкой нити сердечной мышцы достаточно высокого разрешения [Yamada, Namba, Fujii, 2020]

появилась возможность МД-исследований мутаций в молекуле Trpm в комплексе с актином на атомном уровне.

Надо отметить, что основные молекулярные механизмы, ответственные за сокращение мышц и его регуляцию (присоединение и отсоединение миозиновых головок от актина, конформационные изменения миозиновой головки и ее комплекса с актином, связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  тропонином, последующая перестройка тропонин-тропомиозинового комплекса), происходят на миллисекундной временной шкале, недоступной для МД-моделирования. Тем не менее некоторые важные характеристики белков тонкой нити и их комплекса, в том числе стабильность актин-миозинового взаимодействия и механические параметры, определяющие кооперативность регуляторной системы, могут быть оценены из достаточно коротких МД-траекторий. В частности, мы показали, что достаточно длинный 75-нм фрагмент тонкой нити устойчив в МД-расчетах, а оценки параметров спирали актина, а также изгибной, продольной и крутильной жесткости тонкой нити, выполненные по данным МД-моделирования, близки к найденным экспериментально [Koubassova, Tsaturyan, 2023].

В настоящей работе описана новая уточненная модель актин-Trpm нити и результаты ее использования для МД-моделирования тонкой нити, содержащей Trpm дикого типа (WT) и Trpm с аминокислотными заменами: парной стабилизирующей заменой D137L и G126R в центральной части молекулы Trpm и заменой S215L в С-концевой части молекулы, ассоциированной с гипертрофической кардиомиопатией. Оба эти варианта были исследованы различными экспериментальными методами, что позволяет верифицировать результаты моделирования.

## Расчетная модель и методы

Ранее нами были предложены МД-модели регуляторной единицы тонкой нити саркомера сердечной мышцы в заблокированном состоянии [Koubassova, Tsaturyan, 2023] на основе предложенных ранее атомных структур комплекса актина, Trpm и Tn [Pavadai, Lehman, Rynkiewicz, 2020; Yamada, Namba, Fujii, 2020]. Начальное положение тропомиозиновых тяжей относительно актина в рассмотренных моделях было несколько различным, но МД-моделирование показало, что при достижении стационарного состояния занимаемые положения весьма близки. Уточненная модель, использованная в данной работе, показана на рис. 1. Она состоит из 26 мономеров актина в комплексе с окружающими ее тропомиозиновыми тяжами, положение которых было взято из модели 1 [Koubassova, Tsaturyan, 2023]. Каждый Trpm-тяж состоит из одной полной тропомиозиновой молекулы в центре, включающей 284 остатка, одного длинного фрагмента, включающего остатки 51–284 (на рис. 1 слева), и одного короткого, из первых 32 остатков, обеспечивающего устойчивость зоны перекрытия Trpm (на рис. 1 справа). Участок зоны перекрытия тропомиозиновых молекул, подвергавшийся значительным флуктуациям в предыдущих МД-расчетах, был заменен моделью из 6 актинов с окружающими N- и С-концевыми участками тропомиозина (8dd0 в базе данных PDB, [Risi et al., 2022]). На рис. 1 светло-серым и темно-серым цветом показаны две актиновые псевдоспиральи, соединяющие мономеры F-актина с осевым шагом 5,5 нм — вдвое большим, чем истинный период спиральной упаковки мономеров в нити. Два тропомиозиновых тяжа, покрашенные в разные тона, соответствуют одной (условно первой, светлой) и другой (второй, темной) длинным актиновым спиральям. Точечные мутации в структуру тропомиозина вносили с помощью программы USCF Chimera [Pettersen et al., 2004] и встроенной в нее библиотеки ротамеров боковых цепей аминокислотных остатков [Shapovalov, Dunbrack, 2011].

Методика проведения МД-расчетов и их анализа подробно описана ранее [Кубасова, Цатурян, 2022; Koubassova, Tsaturyan, 2023]. В настоящей работе использовали программный пакет GROMACS 2022.2 [Abraham et al., 2015], силовое поле CHARMM36 и модель воды TIP3P, скорректированную для использования с этим силовым полем [Huang, MacKerell, 2013; Huang et al.,

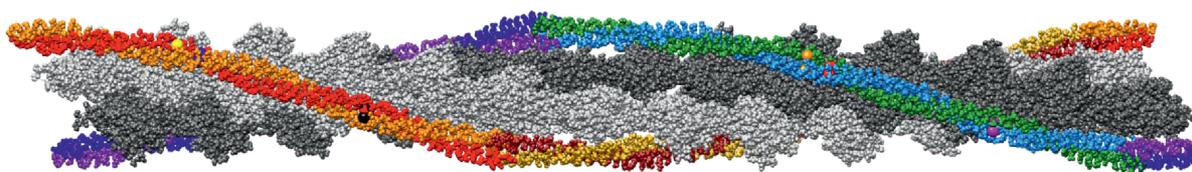


Рис. 1. Расчетная модель фрагмента тонкой нити сердечной мышцы. Мономеры актина первой и второй псевдоспирали актиновой нити показаны светло- и темно-серым соответственно. Мономеры Трп показаны различными цветами. Остатки тропомиозина, подвергавшиеся точечным заменам, показаны более крупными сферами: G126 — сферы желтого (на первом Трп-тяже) и оранжевого (на втором Трп-тяже) цвета, D137 — синего и ярко-зеленого, S215 — черного и пурпурного соответственно. Возрастание номеров Трп-остатков в молекулах модели соответствует направлению слева направо на рисунке. Дополнительные пояснения даны в тексте

2017]. Расчеты проводили при температуре 300 К и давлении 1 атм, длительность МД-траекторий составляла 204,8 нс с шагом 2 фс, координаты атомов записывали каждые 200 пс. Расчетная модель содержала 1 790 556 атомов, из них 187 086 атомов белка.

Для анализа структурных изменений и оценки изгибной жесткости тонкой нити использовали комплекс разработанных нами программ, написанных на языках С и Python.

В каждом из кадров МД-траектории убирали смещение всего белкового комплекса как твердого тела, совмещая ось актиновой спирали с координатной осью  $z$  так, чтобы центр масс актиновых мономеров имел осевое положение  $z = 0$ .

Актиновую спираль описывали средним расстоянием вдоль оси нити между центрами масс соседних мономеров,  $d$ , и средним спиральным углом между центрами масс соседних мономеров,  $\psi$ , в цилиндрических координатах  $(r, \varphi, z)$ . Период спирали вычисляли как  $P = \frac{\pi d}{\pi - \psi}$ .

Изгибную жесткость,  $K_b$ , и персистентную длину,  $\xi$ , вычисляли пользуясь стандартной для описания полимеров теорией полужесткого нерастяжимого стержня (worm-like chain) [Flory, 1969]:

$$\langle \cos(\alpha) \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \cos(\alpha^i)}{n} = \exp\left(\frac{-l}{\xi}\right), \quad \xi = \frac{K_b}{k_B T}, \quad (1)$$

где  $l$  — расстояние от начала координат до конца сегмента актиновой нити,  $k_B$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $n$  — число кадров, выбранное для анализа. Поскольку  $l \ll \xi$ , косинус угла между осью  $z$  и касательной к параболе на конце сегмента актиновой нити в момент времени  $i$  определяли в квадратичном приближении:

$$\cos(\alpha^i) = \sqrt{\frac{1}{1 + l^2 \left( (k_x^i)^2 + (k_y^i)^2 \right)}}, \quad (2)$$

где  $k_x^i, k_y^i$  — коэффициенты квадратичных членов аппроксимирующих функций.

Положение тропомиозинового тяжа на поверхности актиновой нити оценивали по угловому смещению по отношению к спирали, проведенной по  $C_\alpha$  атомам 328 остатков актина, участвующих в образовании водородных связей, удерживающих тропомиозин в заблокированном и, возможно, закрытом состояниях на поверхности актиновой нити.

Флуктуации тропомиозиновых тяжей относительно актиновой нити анализировали по изменению положения  $C_\alpha$  атомов молекул Трп относительно соответствующих длинных актиновых спиралей в цилиндрических координатах. Длинные псевдоспирали актина определяли по положению  $C_\alpha$  атомов остатков актина Lys328. После вычисления их цилиндрических координат, обеспечивая монотонность зависимости угловой координаты,  $\varphi$ , от осевой,  $z$ , для обеих

спиралей зависимость  $\varphi(z)$  аппроксимировали линейной функцией в каждом сохраненном кадре МД-расчета. Затем для каждого  $C_\alpha$  атома Трм в модели вычисляли отклонение текущего значения угловой координаты от значения, соответствующего этой линейной аппроксимации.

Водородные связи между актином и тропомиозином вычисляли с помощью встроенных функций пакета Gromacs.

## Результаты

Как показали МД-расчеты, выполненные на различных моделях фрагмента тонкой нити [Koubassova, Tsaturyan, 2023], для достижения стационарного состояния такой большой системы необходимо 80–100 нс. Поэтому для анализа результатов расчетов и оценки параметров системы мы отбрасывали первые 102,4 нс и рассматривали только вторую по времени половину каждой МД-траектории, состоящую из  $n = 512$  кадров. Параметры актиновой спирали приведены в таблице 1. Для анализа использовали 24 мономера (с номерами  $j = 2, \dots, 25$ ), исключая крайние, наиболее подверженные флуктуациям.

Таблица 1. Параметры спирали F-актина (FA), рассчитанные по положениям центров масс актиновых мономеров для моделей тонких нитей с Трм дикого типа и с мутациями: парной заменой G126R/D137L и заменой S215L

Модель нити	$d$ , нм	$\psi$ , °	$P$ , нм
FA WT Трм	2,74 (0,11)	166,4 (13,9)	36,1 (1,4)
FA G126R/D137L Трм	2,76 (0,06)	166,4 (10,4)	36,4 (2,0)
FA S215L Трм	2,74 (0,07)	166,0 (12,2)	35,2 (1,1)

Указаны средние значения и (в скобках) стандартные отклонения величин, измеренных по второй части МД-траектории,  $n = 512$ .

Среднеквадратичное отклонение угловых координат центров масс мономеров псевдоспиралей актина от их средних значений в МД-расчетах показано на рис. 2.

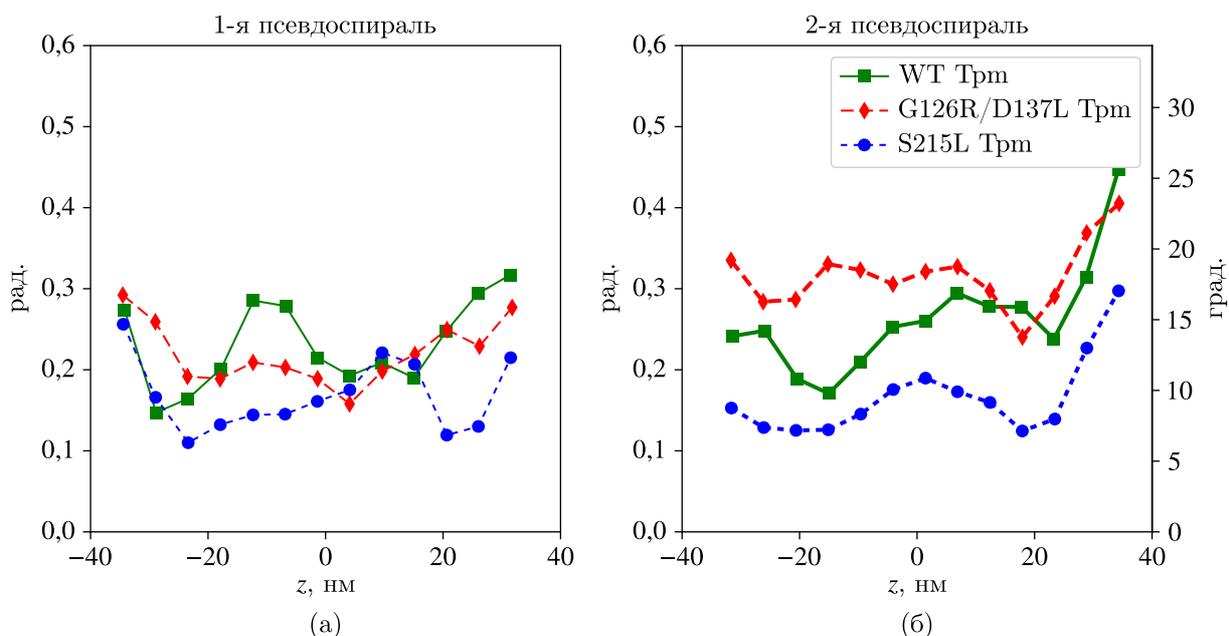


Рис. 2. Среднеквадратичные отклонения центров масс мономеров двух псевдоспиралей актина от их средних значений для трех МД-расчетов

Заметим, что во всех трех расчетах можно наблюдать увеличение отклонений мономеров на концах модели, обусловленное их меньшей стабильностью. Это связано с тем, что у этих мономеров нет полного набора «соседей» по актиновой нити. Отметим, что амплитуда угловых колебаний мономеров актина в тонкой нити с S215L Тpm была меньше, чем для WT Тpm (рис. 2). В то же время в нити с G126R/D137L Тpm амплитуды угловых колебаний мономеров актина в двух псевдоспиралях были различными (рис. 2).

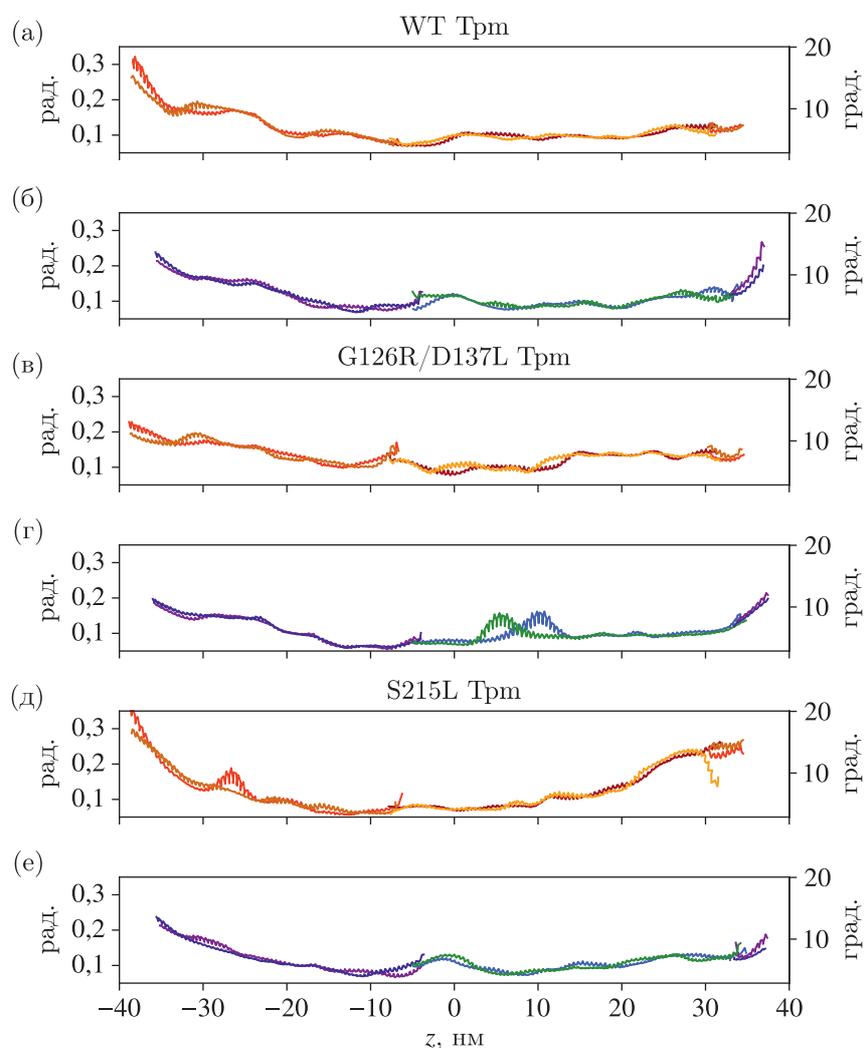


Рис. 3. Среднеквадратичные амплитуды колебаний Тpm-тяжей относительно актиновой спирали для трех МД-расчетов. Цвета цепей тропомиозиновых молекул соответствуют рис. 1. В каждом тропомиозиновом тяже в модели присутствуют две области перекрытия Тpm-молекул, они видны на графиках в положениях около  $-5$  нм и  $35$  нм

Значения персистентной длины и изгибной жесткости тонкой нити приведены в таблице 2.

Таблица 2. Персистентная длина и изгибная жесткость тонкой нити

Модель нити	$\xi$ , мкм	$K_b$ , $10^{-26}$ Нм <sup>2</sup>
WT Тpm	17,1	7,1
G126R/D137L Тpm	19,7	8,2
S215L Тpm	9,7	4,1

Устойчивость положения тропомиозинового тяжа на актине оценивали по среднеквадратическим отклонениям азимутального угла от его усредненного по времени значения в координатах относительно актиновой спирали (см. «Расчетная модель и методы»). Графики зависимости азимутальных флуктуаций  $\text{Trm}$  относительно актина от положения вдоль оси нити показаны на рис. 3.

Наиболее высокую подвижность наблюдали на концах тропомиозиновых тяжей. Это было, по-видимому, вызвано искусственным ограничением длины расчетной модели и размера МД-ячейки и отсутствием дополнительных условий на свободных концах модели. В середине расчетной модели нити среднеквадратичная амплитуда колебаний не превышала  $10^\circ$ . Для каждого из трех расчетов колебания обоих  $\text{Trm}$ -тяжей в середине расчетной модели были примерно одинаковыми, за исключением тонкой нити, содержащей G126R/D137L  $\text{Trm}$ , в которой наблюдали небольшое локальное увеличение амплитуды колебаний на участке, примерно соответствующем области взаимодействия  $\text{Trm}$  с одним мономером актина (рис. 3).

Чтобы изучить, как эти флуктуации повлияли на взаимодействие актина и  $\text{Trm}$ , мы оценивали относительное время жизни водородных связей (h-связей) между Lys326- и Lys328-остатками актина и тропомиозином. В каждом кадре МД-траектории населенность считали равной 1, если между ними существовала хотя бы одна водородная связь; в противном случае эту величину считали равной 0. На рис. 4 показаны усредненные по времени значения определенной таким образом населенности связей для каждого мономера актина.

Для всех трех МД-расчетов населенность водородных связей между отрицательно заряженными остатками актина и положительно заряженными остатками  $\text{Trm}$  была для большинства мономеров актина выше 90%. Исключение составляли один из концевых мономеров актина для нити с  $\text{Trm}$  дикого типа и один из мономеров второй псевдоспирали актина в середине расчетной модели для нитей с G126R/D137L  $\text{Trm}$  и S215L  $\text{Trm}$ , для которых населенность водородных связей составляла 70–75% (рис. 4). Отметим, что снижение населенности водородных связей коррелировало с локальным увеличением амплитуды колебаний  $\text{Trm}$  относительно спирали актина на рис. 3.

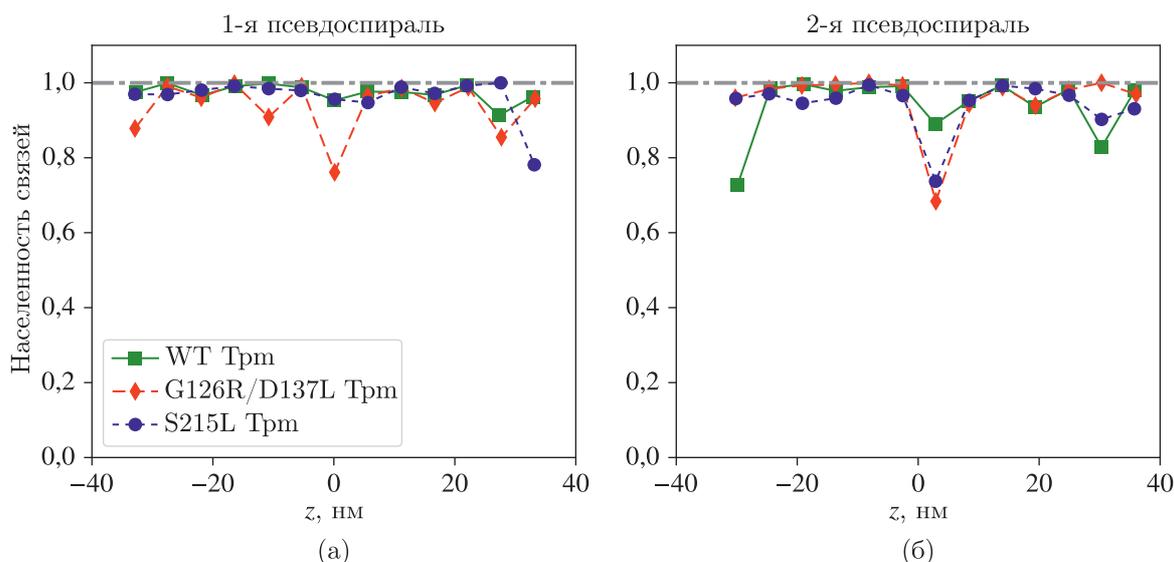


Рис. 4. Населенность водородных связей между остатками Lys326 и Lys328 актина и отрицательно заряженными остатками  $\text{Trm}$  для трех МД-расчетов

## Обсуждение

Создание структурной модели тонкой нити могло бы существенно упростить исследование влияния патогенных и условно патогенных мутаций в регуляторных белках на функциональные свойства тонкой нити, а поскольку исследования *in silico* несравнимо быстрее и проще, чем *in vitro*, то даже грубые оценки были бы полезны для выбора направлений более детальных исследований.

Несмотря на значительный прогресс в определении структуры тонкой нити сердечной мышцы, достигнутый в последние годы с помощью криоэлектронной микроскопии [Yamada, Namba, Fujii, 2020; Risi et al., 2021; Risi et al., 2022], имеющиеся в настоящее время структуры не очень хорошо описывают геометрические характеристики нитей, надежно определенные с помощью малоугловой рентгеновской дифракции, и поэтому требуют дополнительного уточнения. Ранее мы предприняли попытку построить уточненную модель, воспроизводящую геометрию спиралей актина и Trp [Koubassova, Tsaturyan, 2023]. Однако МД-расчеты с такой уточненной моделью показали локальную дестабилизацию Trp в окрестности стыка двух соседних молекул в тяже. Более того, жесткость тонких нитей, оцененная по МД-расчетам для этой модели, оказалась почти такой же, как ранее оцененная жесткость актиновых нитей [Кубасова, Цатурян, 2022], что не соответствует экспериментальным данным о том, что добавление Trp к актину существенно увеличивает жесткость нити [Isambert et al., 1995; Nabiev et al., 2015]. Поэтому мы провели дальнейшее уточнение модели с использованием новой структуры области перекрытия соседних молекул Trp (см. «Расчетная модель и методы»).

Параметры актиновой спирали в настоящей модели (осевой шаг, полярный угол и полный период) хорошо совпадают с измеренными в рентгено-дифракционных экспериментах. Для регуляции сокращения важную роль имеет кооперативность, то есть передача информации вдоль тропомиозинового тяжа о переходе тропонинового комплекса в Ca-связанное состояние и о присоединении миозиновых головок, что связано с изгибной жесткостью тропомиозиновой молекулы и ее азимутальными флуктуациями [Li, Lehman, Fischer, 2010]. Водородные связи, удерживающие определенные отрицательно заряженные участки Trp вблизи положительно заряженных остатков мономеров актина, обеспечивают блокированное состояние системы. Патогенные точечные мутации приводят к нарушению одного или нескольких механизмов, обеспечивающих нормальную регуляцию, и для изучения таких комплексного эффектов необходима модель, учитывающая все внутри- и межбелковые взаимодействия.

Жесткость нитей, содержащих WT Trp, рассчитанная по новой модели, была примерно вдвое больше, чем жесткость нити актина (табл. 2 [Кубасова, Цатурян, 2022]), что соответствует результатам экспериментальных измерений, проведенных различными методами [Isambert et al., 1995; Nabiev et al., 2015], с учетом того, что часть измерений была проведена в присутствии яда бледной поганки фаллоидина, включение которого в актиновую нить существенно увеличивает ее жесткость [Isambert et al., 1995]. Двойная замена G126R/D137L Trp существенно увеличивает температурную стабильность Trp и его комплекса с актином, чувствительность регулируемых тонких нитей к ионам  $Ca^{2+}$ , а также максимальную скорость их скольжения по поверхности, покрытой миозином *in vitro* [Matyushenko et al., 2014]. МД-расчеты показали, что такая двойная замена увеличивает жесткость тонкой нити (табл. 2), хотя полученное при моделировании увеличение жесткости было менее значительным, чем найденное экспериментально в присутствии Tn и фаллоидина [Nabiev et al., 2015].

Замена S215L в сердечном Trp вызывает гипертрофическую кардиомиопатию (HCM) и характеризуется увеличением температурной стабильности Trp, снижением его сродства к фибриллярному актину, повышением кооперативности такого связывания и увеличением  $Ca^{2+}$ -активированной АТФазы миозина в присутствии регулируемых тонких нитей по сравнению

с WT Trpm [Gupte et al., 2015]. Замена S215L в Trpm также приводила к существенному увеличению  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительности скорости скольжения тонких нитей *in vitro*, что характерно для гипертрофической кардиомиопатии [Halder et al., 2023]. МД-моделирование изолированных димеров Trpm показало, что замена S215L Trpm приводит к локальной перестройке молекулы с образованием более плотного гидрофобного ядра и увеличению гибкости суперспирали Trpm [Halder et al., 2023]. Наше МД-моделирование тонких нитей с WT Trpm и S215L Trpm показало, что эта замена уменьшает угловые флуктуации псевдоспиралей актина (рис. 2), приводит к двукратному уменьшению изгибной жесткости нити до величин, характерных для актиновой нити без регуляторных белков (табл. 2), при низкой амплитуде угловых колебаний относительно актиновой спирали (рис. 3), очень высокой населенности водородных связей между Trpm и мономерами актина, за исключением одного мономера в середине второй псевдоспиралей актина (рис. 4). В наших расчетах внесение замены S215L приводило к уменьшению персистентной длины, то есть увеличению гибкости, что наблюдалось и в экспериментах при других мутациях, вызывающих HCM [Li et al., 2012].

Хорошее качественное соответствие ответов модели на внесенные точечные замены результатам биохимических и других численных экспериментов позволит использовать предложенную модель для исследования других мутаций. Также ее можно будет использовать как основу для построения полной модели регулируемого фрагмента тонкой нити, включающего тропониновый комплекс.

## Заключение

Представлена новая уточненная атомная модель фрагмента тонкой нити сердечной мышцы, содержащая 26 мономеров актина и взаимодействующие с ними участки двух Trpm-тяжей, включая области контакта между двумя молекулами Trpm в каждой из тяжей. Эта модель была использована для МД-моделирования тонких нитей, включающих Trpm дикого типа или Trpm с аминокислотными заменами: двойной стабилизирующей заменой G126R/D137L и кардиомиопатической заменой S215L. Изгибная жесткость нитей с Trpm дикого типа, оцененная по результатам МД-моделирования, была примерно вдвое выше, чем ранее оцененная жесткость фибриллярного актина, и была близка к ее значениям, определенным экспериментально. Двойная замена G126R/D137L в Trpm приводила к увеличению жесткости нитей, что соответствует экспериментальным данным. Замена S215L в Trpm, наоборот, вызывала заметное снижение изгибной жесткости нитей, что коррелирует с результатами МД-расчетов изолированных молекул Trpm и «крупнозернистого» моделирования тонких нитей других авторов [Halder et al., 2023]. Результаты нашего полноатомного МД-моделирования в присутствии растворителя показывают, что новая уточненная модель тонкой нити позволяет исследовать влияние одиночных аминокислотных замен в Trpm на его регуляторные функции.

## Список литературы (References)

- Кубасова Н. А., Цатурян А. К. Молекулярно-динамическая оценка механических свойств фибриллярного актина // Компьютерные исследования и моделирование. — 2022. — Т. 14. — С. 1081–1092.
- Koubassova N. A., Tsaturyan A. K. Molekulyarno-dinamicheskaya ocenka mekhanicheskikh svoystv fibrillyarnogo actina [Molecular dynamics assessment of the mechanical properties of fibrillar actin] // Computer Research and Modeling. — 2022. — Vol. 14. — P. 1081–1092 (in Russian).
- Матюшенко А. М., Левицкий Д. И. Молекулярные механизмы развития патологических состояний скелетной и сердечной мышечной ткани, вызванные точечными мутациями в генах тропомиозина // Успехи биологической химии. — 2020. — Т. 60. — С. 43–74.
- Matyushenko A. M., Levitsky D. I. Molecular mechanisms of pathologies of skeletal and cardiac muscles caused by point mutations in the tropomyosin genes // Biochemistry (Mosc.). — 2020. — Vol. 85. — P. S20–S33. (Original Russian

- paper: *Matyushenko A. M., Levitskii D. I.* Molekulyarnye mehanizmy razvitiya patologicheskikh sostoyanij skeletnoj i serdechnoj myshechnoj tkani, vyzvannye tochechnymi mutაციями v genah tropomiozina // *Uspekhi biologicheskoi khimii.* — 2020. — Vol. 60. — P. 43–74.)
- Невзоров И. А., Левицкий Д. И.* Тропомиозин: двойная спираль из мира белков // *Успехи биологической химии.* — 2011. — Т. 51. — С. 283–334.
- Nevzorov I. A., Levitsky D. I.* Tropomyosin: double helix from the protein world // *Biochemistry (Mosc.).* — 2011. — Vol. 76. — P. 1507–1527. (Original Russian paper: *Nevzorov I. A., Levitskii D. I.* Tropomiozin: dvojnaya spiral iz mira belkov // *Uspekhi biologicheskoi khimii.* — 2011. — Vol. 51. — P. 283–334.)
- Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX.* — 2015. — Vol. 1–2. — P. 19–25.
- Flory P. J.* Statistical mechanics of chain molecules. — New York: Interscience Publishers, 1969. — 432 p.
- Geeves M. A., Lehrer S. S., Lehman W.* The mechanism of thin filament regulation: Models in conflict? // *J. Gen. Physiol.* — 2019. — Vol. 151. — P. 1265–1271.
- Gupte T. M., Haque F., Gangadharan B., Sunitha M. S., Mukherjee S., Anandhan S., Rani D. S., Mukundan N., Jambekar A., Thangaraj K., Sowdhamini R., Sommese R. F., Nag S., Spudich J. A., Mercer J. A.* Mechanistic heterogeneity in contractile properties of  $\alpha$ -tropomyosin (TPM1) mutants associated with inherited cardiomyopathies // *The Journal of biological chemistry.* — 2015. — Vol. 290. — P. 7003–7015.
- Halder S. S., Rynkiewicz M. J., Creso J. G., Sewanan L. R., Howland L., Moore J. R., Lehman W., Campbell S. G.* Mechanisms of pathogenicity in the hypertrophic cardiomyopathy-associated TPM1 variant S215L // *PNAS nexus.* — 2023. — Vol. 2. — P. pgad011.
- Huang J., MacKerell Jr. A. D.* CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data // *J. Comput. Chem.* — 2013. — Vol. 34. — P. 2135–2145.
- Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B. L., Grubmüller H., MacKerell A. D.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins // *Nature methods.* — 2017. — Vol. 14. — P. 71–73.
- Isambert H., Venier P., Maggs A. C., Fattoum A., Kassab R., Pantaloni D., Carlier M. F.* Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins // *J. Biol. Chem.* — 1995. — Vol. 270. — P. 11437–11444.
- Kopylova G. V., Matyushenko A. M., Koubassova N. A., Shchepkin D. V., Bershitsky S. Y., Levitsky D. I., Tsaturyan A. K.* Functional outcomes of structural peculiarities of striated muscle tropomyosin // *J. Muscle Res. Cell Motil.* — 2019. — Vol. 41. — P. 55–70.
- Koubassova N. A., Tsaturyan A. K.* Molecular dynamics assessment of mechanical properties of the thin filaments in cardiac muscle // *Int. J. Mol. Sci.* — 2023. — Vol. 24. — P. 4792.
- Lehman W., Moore J. R., Campbell S. G., Rynkiewicz M. J.* The effect of tropomyosin mutations on actin-tropomyosin binding: in search of lost time // *Biophys. J.* — 2019. — Vol. 116. — P. 2275–2284.
- Li X. E., Lehman W., Fischer S.* The relationship between curvature, flexibility and persistence length in the tropomyosin coiled-coil // *J. Struct. Biol.* — 2010. — Vol. 170. — P. 313–318.
- Li X. E., Suphamungmee W., Janco M., Geeves M. A., Marston S. B., Fischer S., Lehman W.* The flexibility of two tropomyosin mutants, D175N and E180G, that cause hypertrophic cardiomyopathy // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2012. — Vol. 424. — P. 493–496.
- Matyushenko A. M., Artemova N. V., Shchepkin D. V., Kopylova G. V., Bershitsky S. Y., Tsaturyan A. K., Sluchanko N. N., Levitsky D. I.* Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of  $\alpha$ -tropomyosin molecule // *The FEBS journal.* — 2014. — Vol. 281. — P. 2004–2016.

- McKillop D. F., Geeves M. A.* Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament // *Biophys. J.* — 1993. — Vol. 65. — P. 693–701.
- Metalnikova N. A., Tsaturyan A. K.* A mechanistic model of Ca regulation of thin filaments in cardiac muscle // *Biophys. J.* — 2013. — Vol. 20. — P. 941–950.
- Nabiev S. R., Ovsyannikov D. A., Kopylova G. V., Shchepkin D. V., Matyushenko A. M., Koubassova N. A., Levitsky D. I., Tsaturyan A. K., Bershitsky S. Y.* Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament // *Biophys. J.* — 2015. — Vol. 109. — P. 373–379.
- Pavadaï E., Lehman W., Rynkiewicz M. J.* Protein-protein docking reveals dynamic interactions of tropomyosin on actin filaments // *Biophys. J.* — 2020. — Vol. 119. — P. 75–86.
- Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., et al.* UCSF Chimera — Visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* — 2004. — Vol. 25. — P. 1605–1612.
- Risi C. M., Belknap B., White H. D., Dryden K., Pinto J. R., Chase P. B., Galkin V. E.* High-resolution cryo-EM structure of the junction region of the native cardiac thin filament in relaxed state // *PNAS Nexus.* — 2020. — Vol. 2. — P. pgad016.
- Risi C. M., Pepper I., Belknap B., Landim-Vieira M., White H. D., Dryden K., Pinto J. R., Chase P. B., Galkin V. E.* The structure of the native cardiac thin filament at systolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2021. — Vol. 118.
- Shapovalov M. V., Dunbrack R. L. Jr.* A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions // *Structure.* — 2011. — Vol. 19. — P. 844–858.
- Smith D. A., Maytum R., Geeves M. A.* Cooperative regulation of myosin-actin interactions by a continuous flexible chain I: actin-tropomyosin systems // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 84. — P. 3155–3167.
- Yamada Y., Namba K., Fujii T.* Cardiac muscle thin filament structures reveal calcium regulatory mechanism // *Nat. Commun.* — 2020. — Vol. 11. — P. 153.
- Zheng W., Hitchcock-DeGregori S. E., Barua B.* Investigating the effects of tropomyosin mutations on its flexibility and interactions with filamentous actin using molecular dynamics simulation // *J. Muscle Res. Cell Motil.* — 2016. — Vol. 37. — P. 131–147.
- Zheng W., Wen H.* Molecular dynamics simulation of tropomyosin bound to actins/myosin in the closed and open states // *Proteins.* — 2019. — Vol. 87. — P. 805–814.