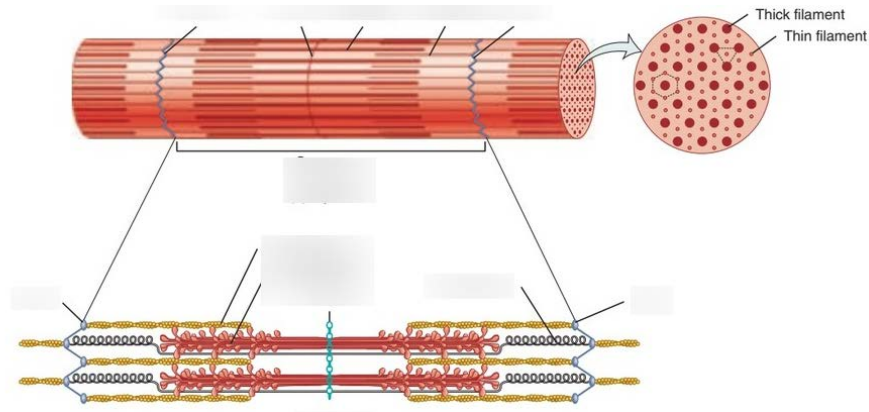




Исследование функциональных свойств тонкой нити сердечной мышцы методом молекулярной динамики

Наталия Алексеевна Кубасова

Институт механики, МГУ им. М.В. Ломоносова

natalia@imec.msu.ru



Dmitrii Levitsky

Alexander Matyushenko

Victoria Nefedova

Daria Yampolskaya

Sergey Kleymenov

Anastasiia Gonchar



Sergey Bershitsky

Galina Kopylova

Daniil Shchepkin

Anastasia Kochurova

Team:



Natalia Koubassova



Sackler Faculty of Medicine
Tel Aviv University

Andrey Tsaturyan



БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА

Ivan Katrukha

Natalia Ryabkova



Elena Zaklyazminskaya

Anna Shestak

Margarita Polyak



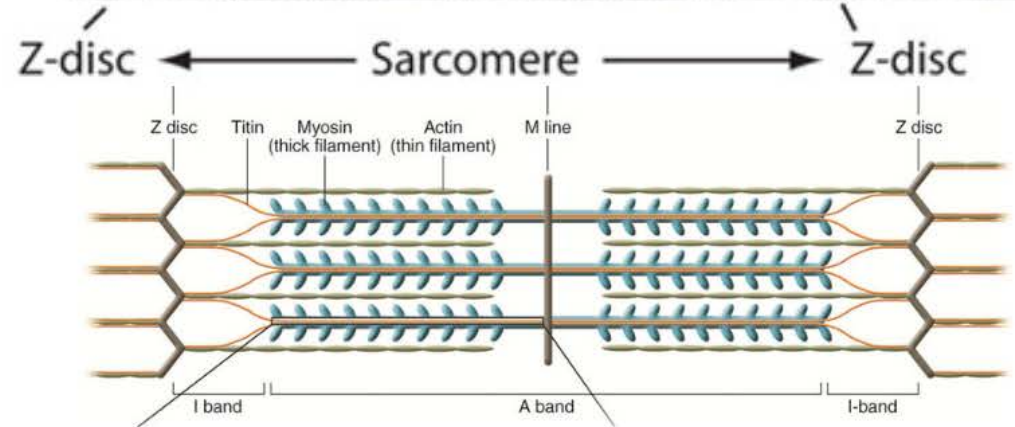
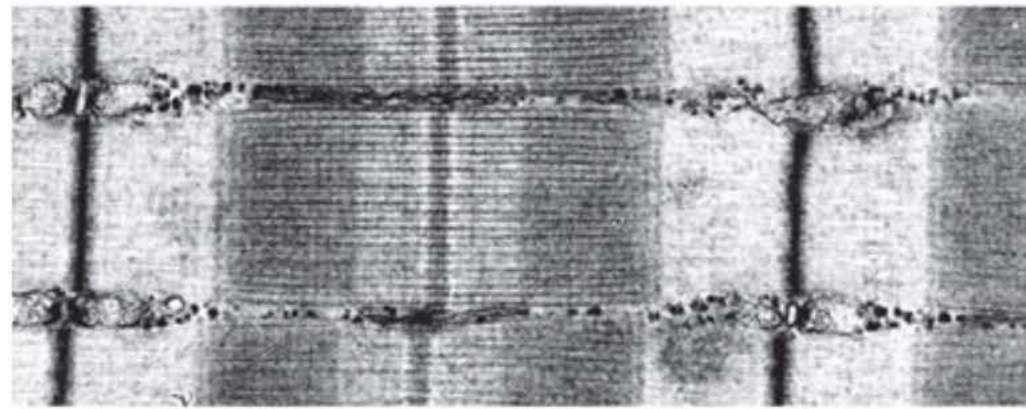
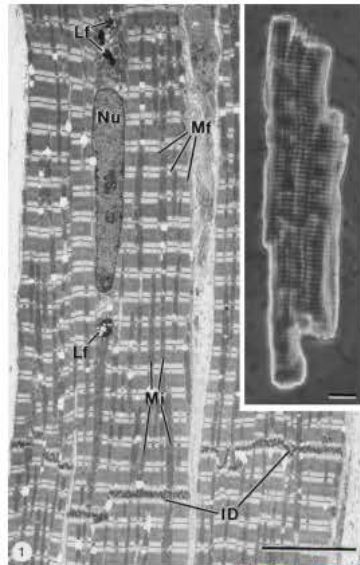
Natalia Kotlukova

Support:

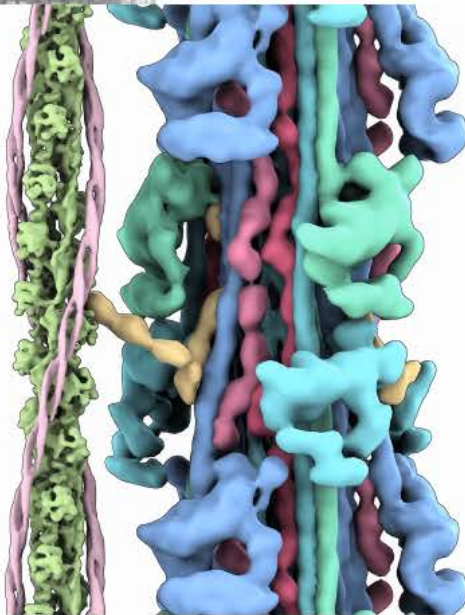


Cardiomyocyte

structure



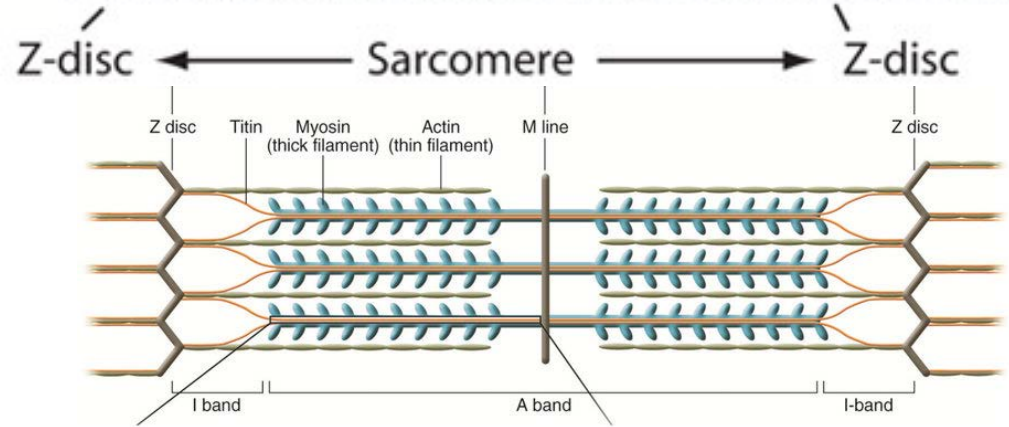
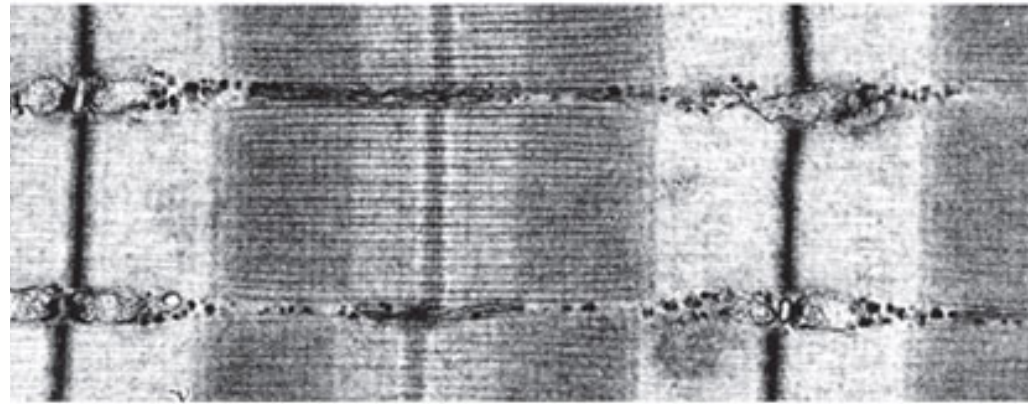
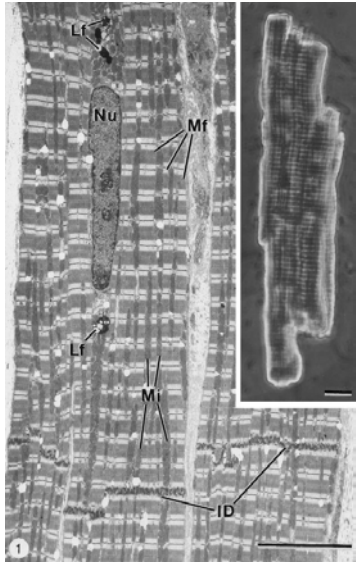
Thin



& thick filaments

Cardiomyocyte

structure



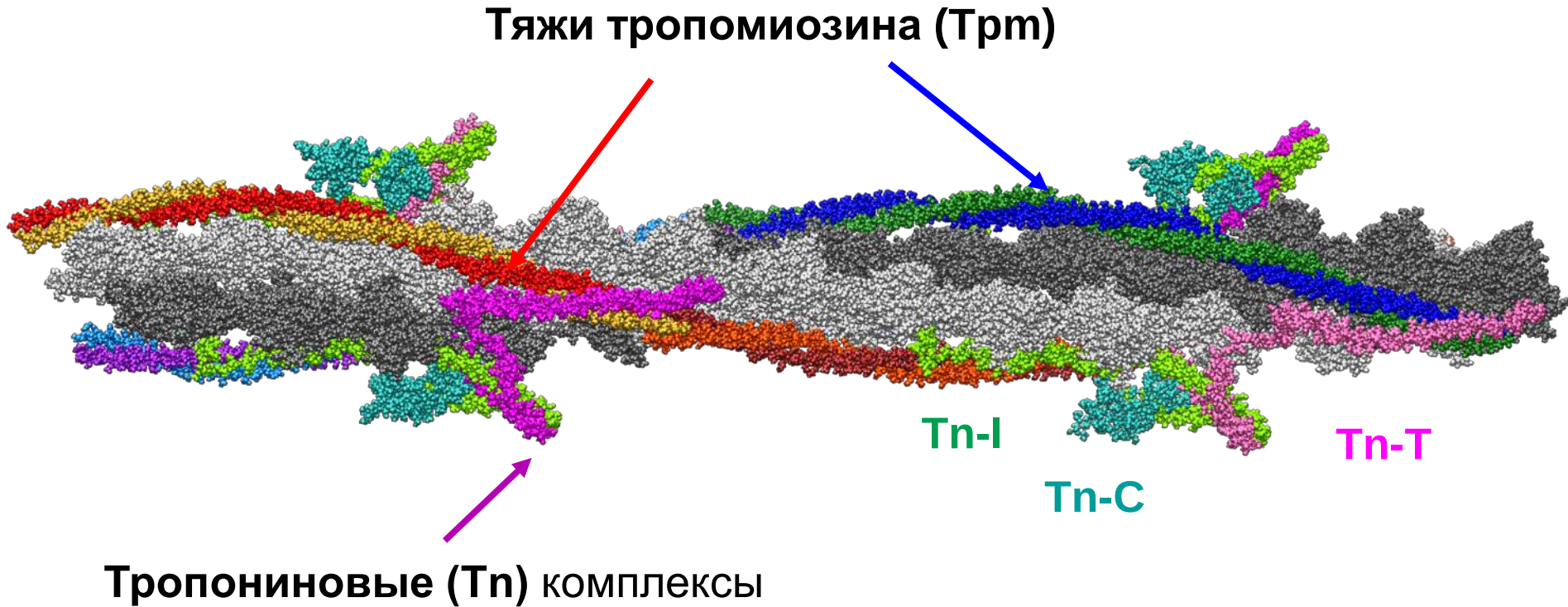
Thin

& thick filaments

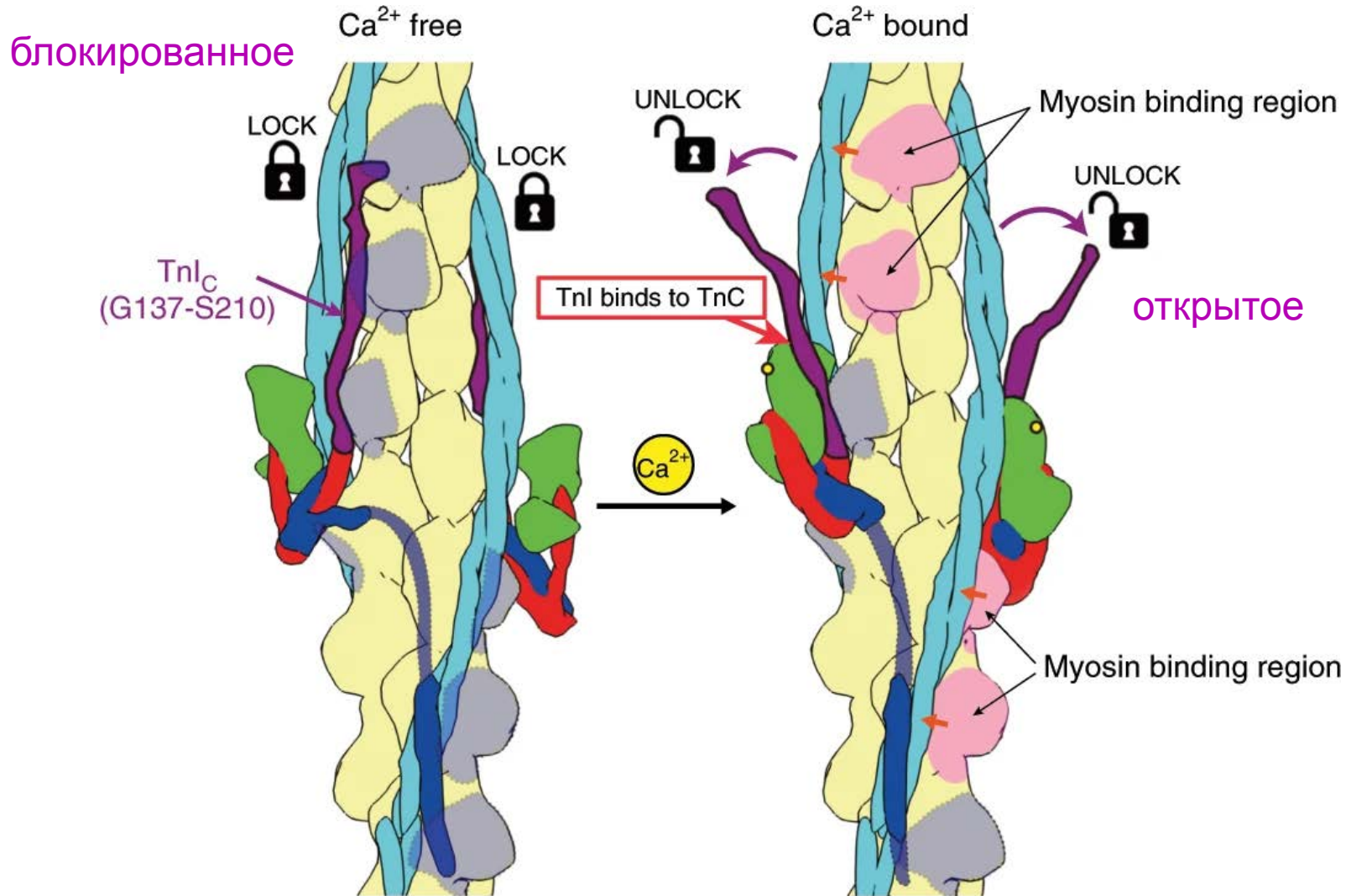


Структура тонкой нити

Основа: актиновая нить



Переключение тонкой нити



Белки миокарда в базе данных ClinVar

Gene	Protein	Patho- genic	Likely Pathogenic	Benigh	Likely benigh	Uncertain significance	Conflicting classification	Uncertain, %	Certain, %
MYH6	cMyoH-alpha	25	10	149	783	1394	117	61	7
MYH7	cMyoH_beta	173	320	236	1412	2479	432	58	8
MYL2	cMyoRLC	15	16	57	175	271	47	55	12
MYLE	cMyoELC	12	8	23	70	109	1	49	16
MYBPC3	cMyBP-C	742	357	171	973	1644	310	47	22
ACTC1	cAct	29	13	64	276	397	47	54	11
TNNT2	cTnT	114	102	71	78	451	173	63	19
TNNC1	cTnC	13	9	14	100	180	21	60	8
TNNI3	cTnI	53	43	49	223	365	68	54	13
TPM1	TPM1.1	21	42	83	291	409	76	53	11

- Лишь 7-22% генетических вариантов охарактеризованы как *патогенные (pathogenic)* или доброкачественные (*benigh*).
- Даже с учётом “likely pathogenic” и “likely benigh” вариантов, около 50% относятся к неопределённой или конфликтующей классификации.
- Новые генетические варианты появляются быстрее, чем они могут быть классифицированы.
- Что делать?

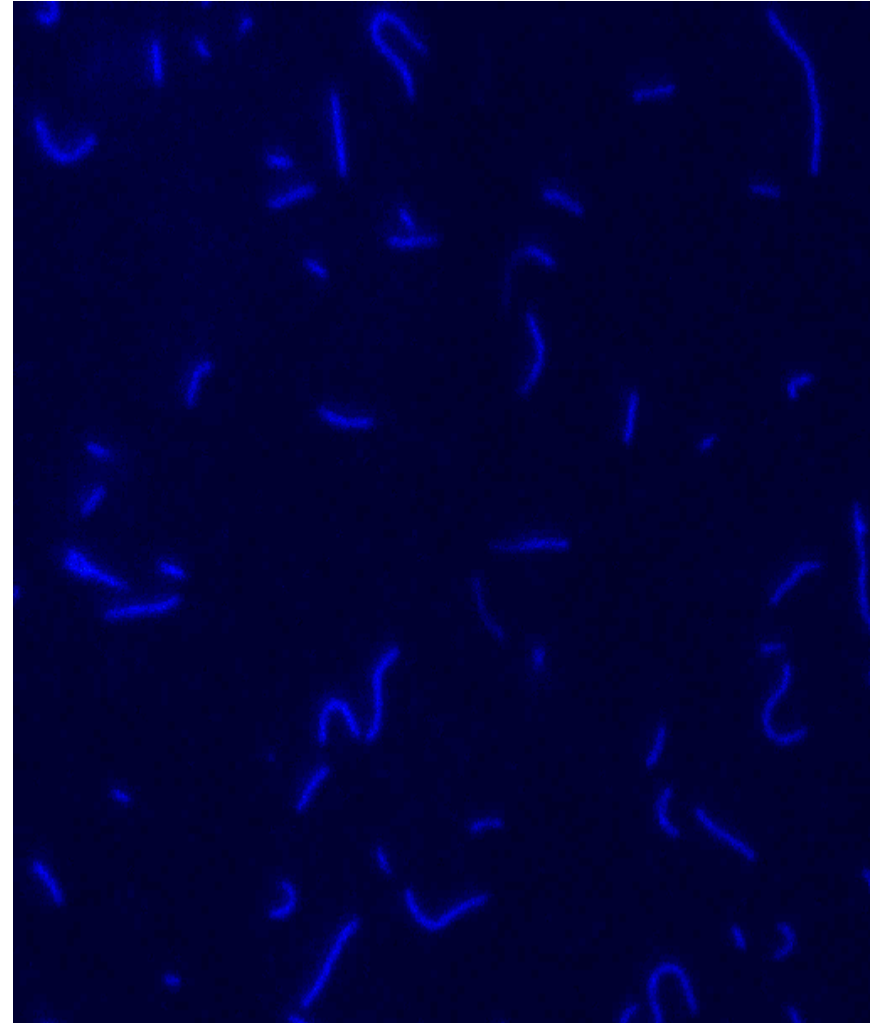
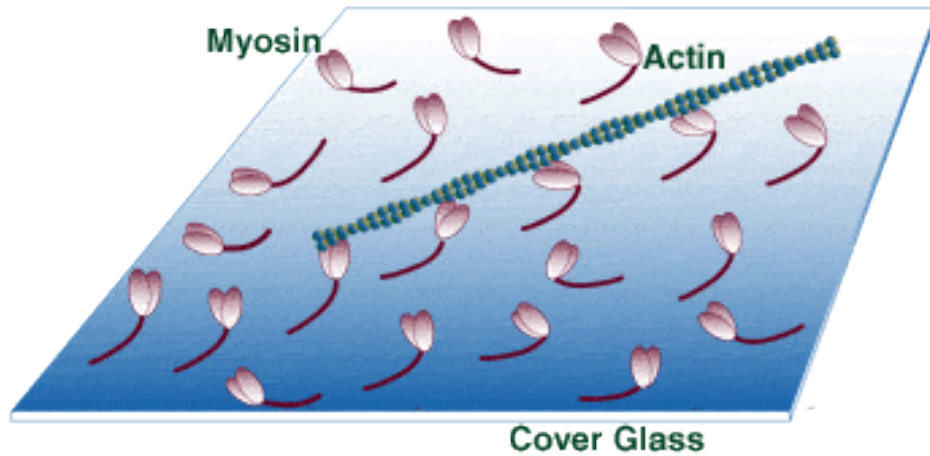
Проблема

Ограниченность клинических данных и трудности в изучении семейного анамнеза, особенно в отношении вариантов *de novo*, затрудняют оценку клинической значимости новых генетических вариантов.

Подход

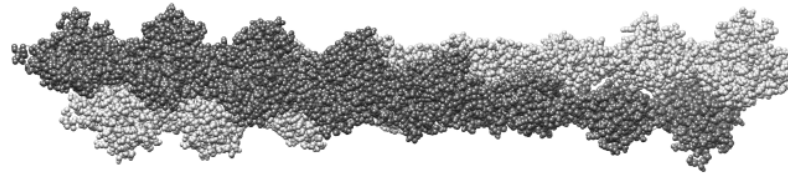
Экспрессия рекомбинантных белков с выявленными аминокислотными заменами. Исследование их структурных и функциональных свойств в экспериментах *in vitro* и *in silico*.

In vitro motility assay

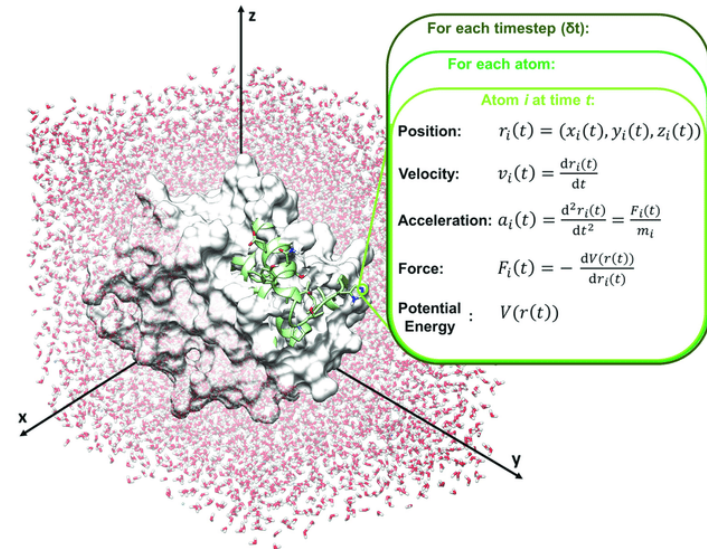
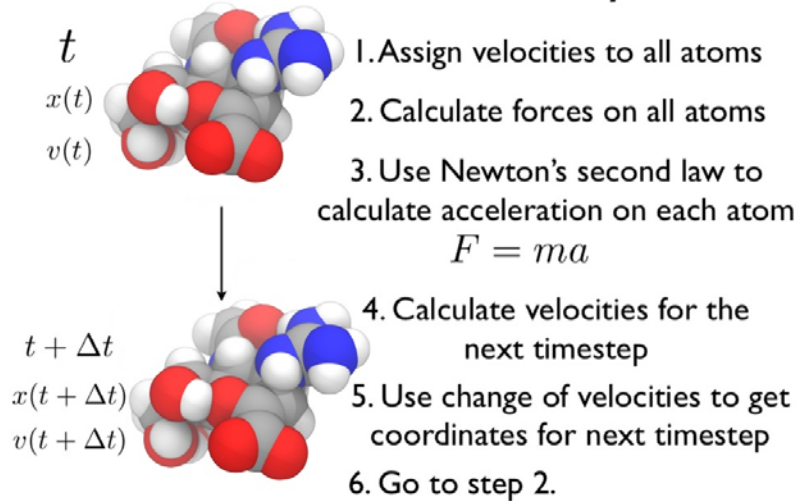


Molecular dynamics (MD)

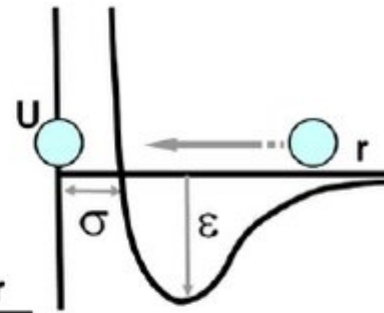
$V(r(t))$ - ? [force field]



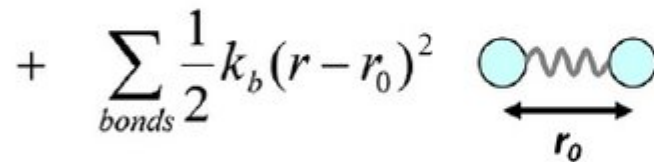
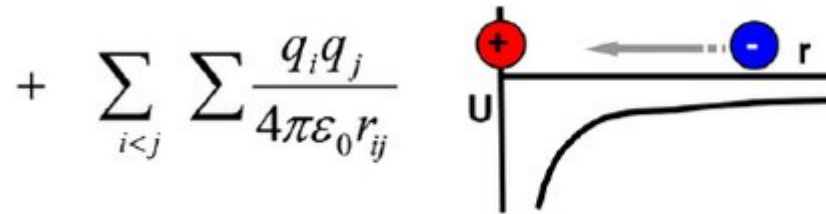
Molecular Dynamics



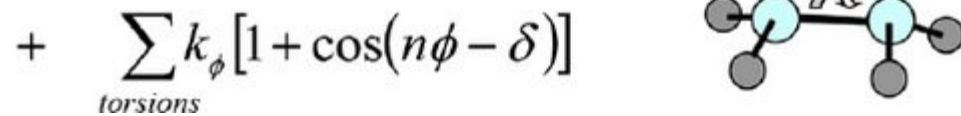
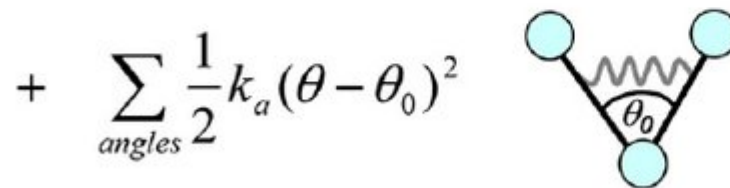
$$U = \sum_{i < j} \sum 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$



van der Waals interactions
Coulombic interactions



bond energy,
bond angle energy
torsional energy

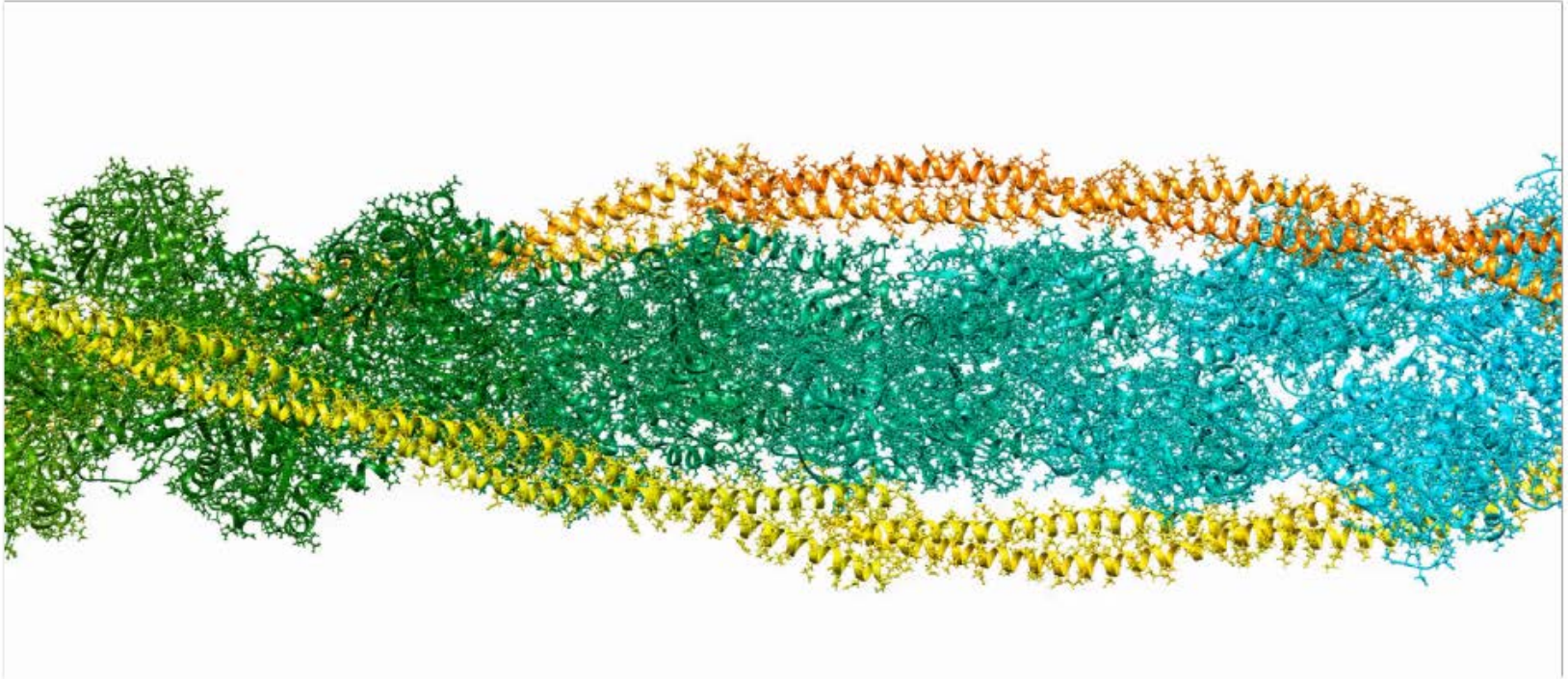


Молекулярная динамика (МД)



Актин - Trp комплекс

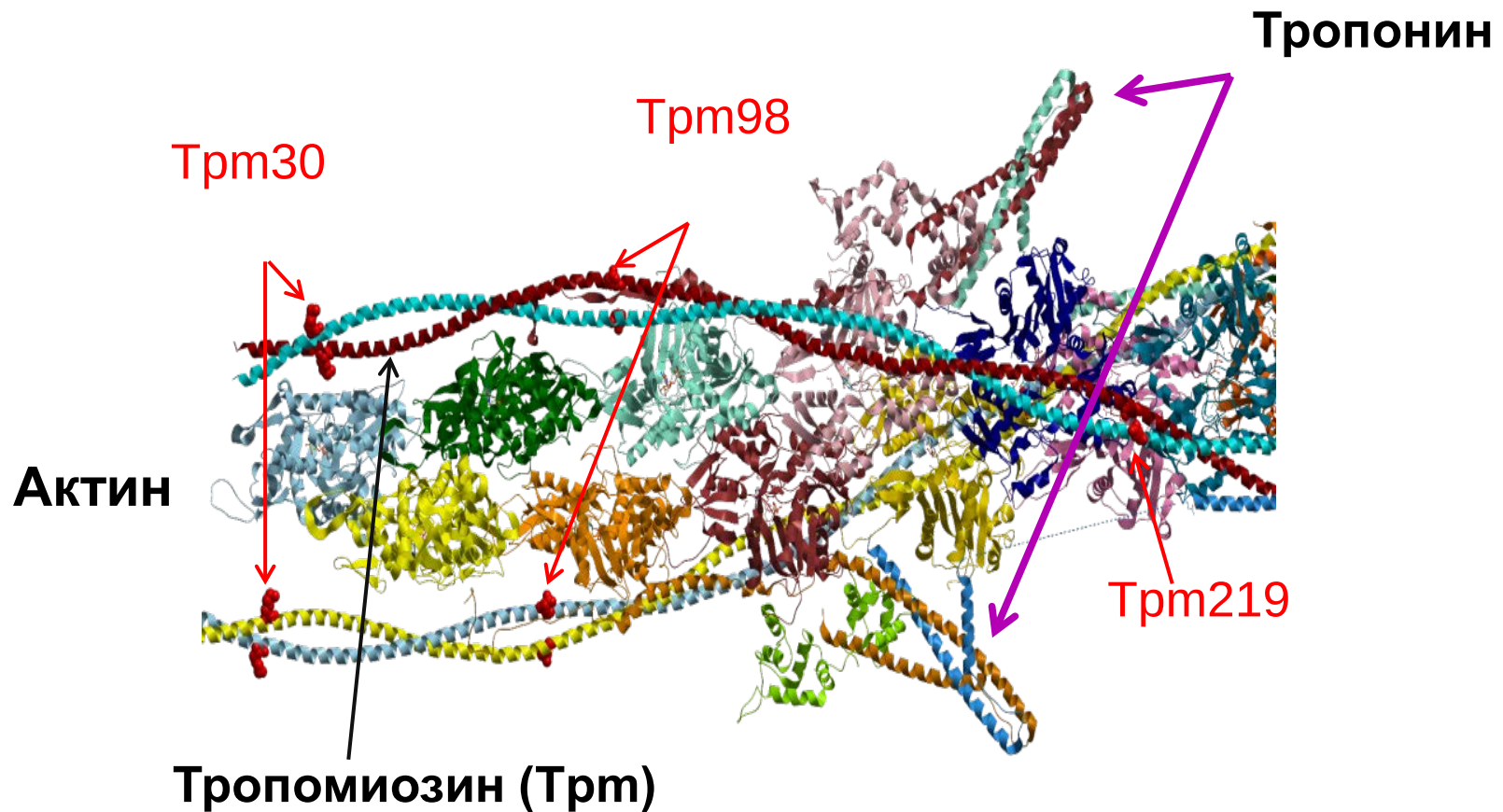
Molecular dynamics (MD)



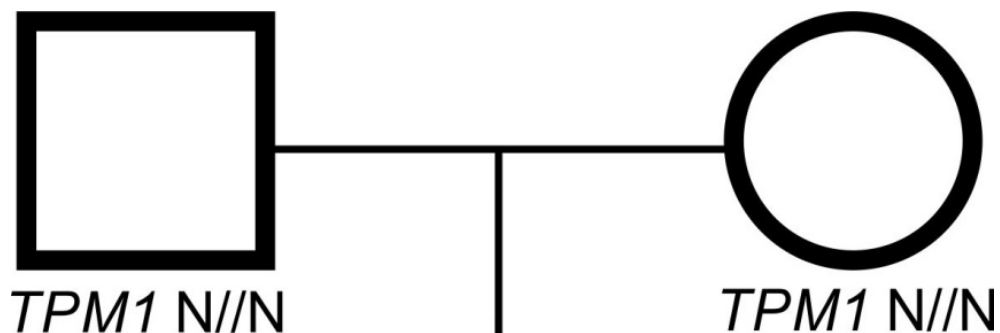
Actin - Tpm complex

Примеры

использования МД-подхода для оценки клинической значимости
точечных аминокислотных замен в тропомиозине (Trpm)
сердечной мышцы

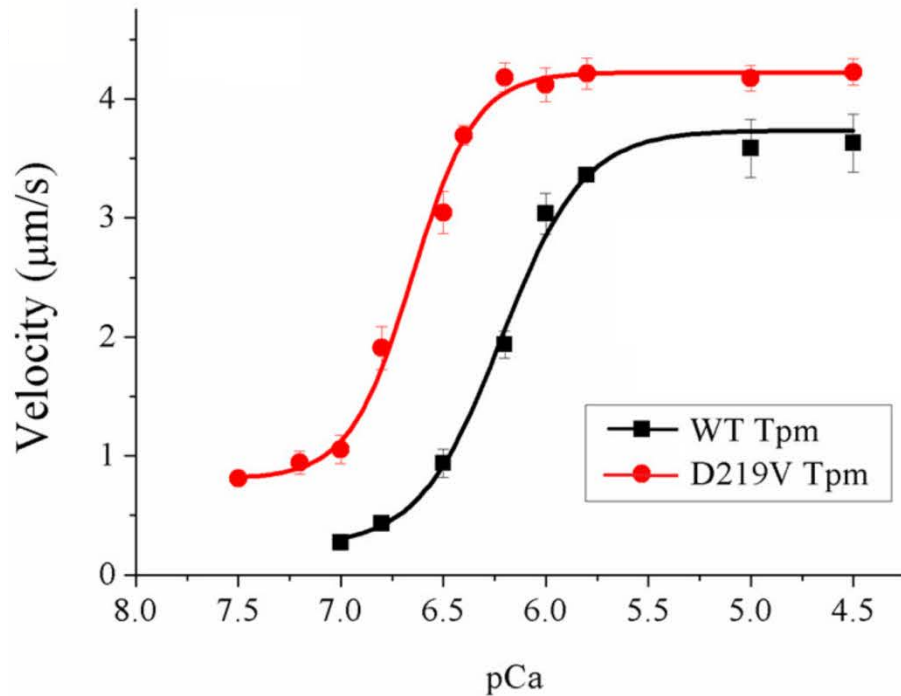


[1] замена Asp219Val



Гетерозиготная мутация *de novo* в гене *TPM1*, с565A>T (p.D219V), была выявлена у молодого (11 лет) пациента с **внезапной сердечной смертью (ВСС, SCD)**, родители которого не были носителями данного варианта.

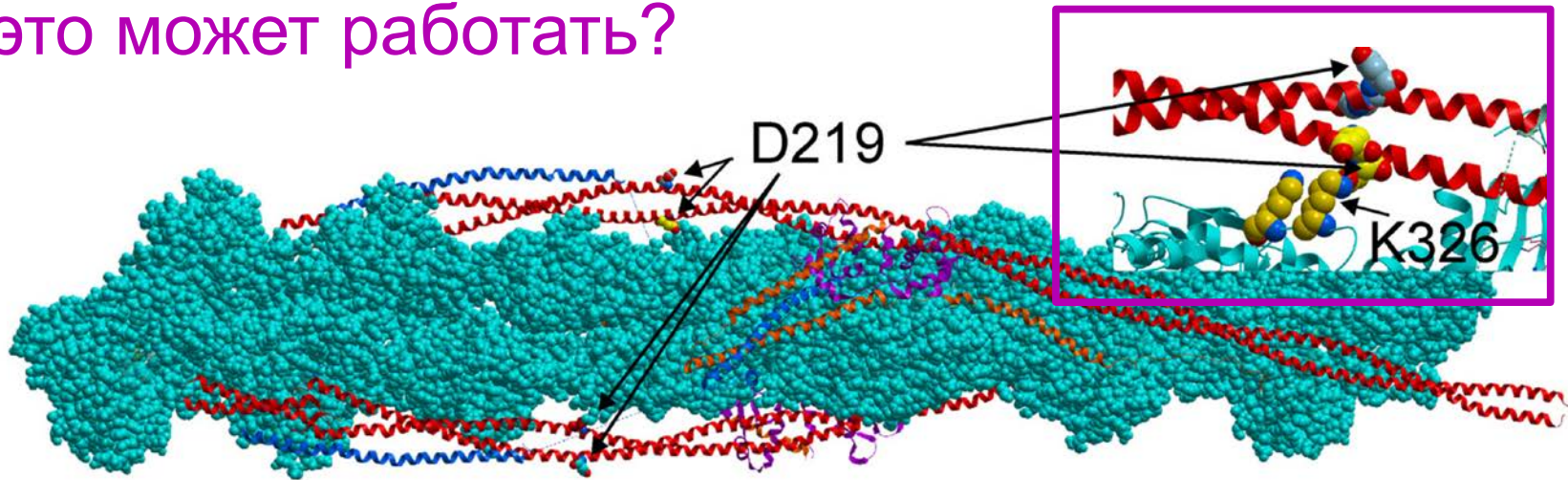
Замена Trp D219V изменяет взаимодействие актина и миозина и его регуляцию Ca^{2+} in vitro:



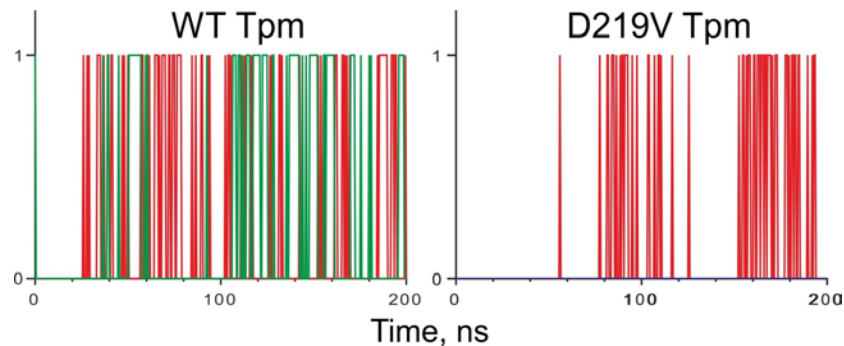
- нарушая расслабление, даже при очень низком уровне Ca^{2+} (*);
- увеличивая Ca^{2+} чувствительность;
- увеличивая максимальную скорость скольжения актин-Trp-Tn нитей.

* характеристика типичная для гипертрофической кардиомиопатии, ГКМП

Как это может работать?

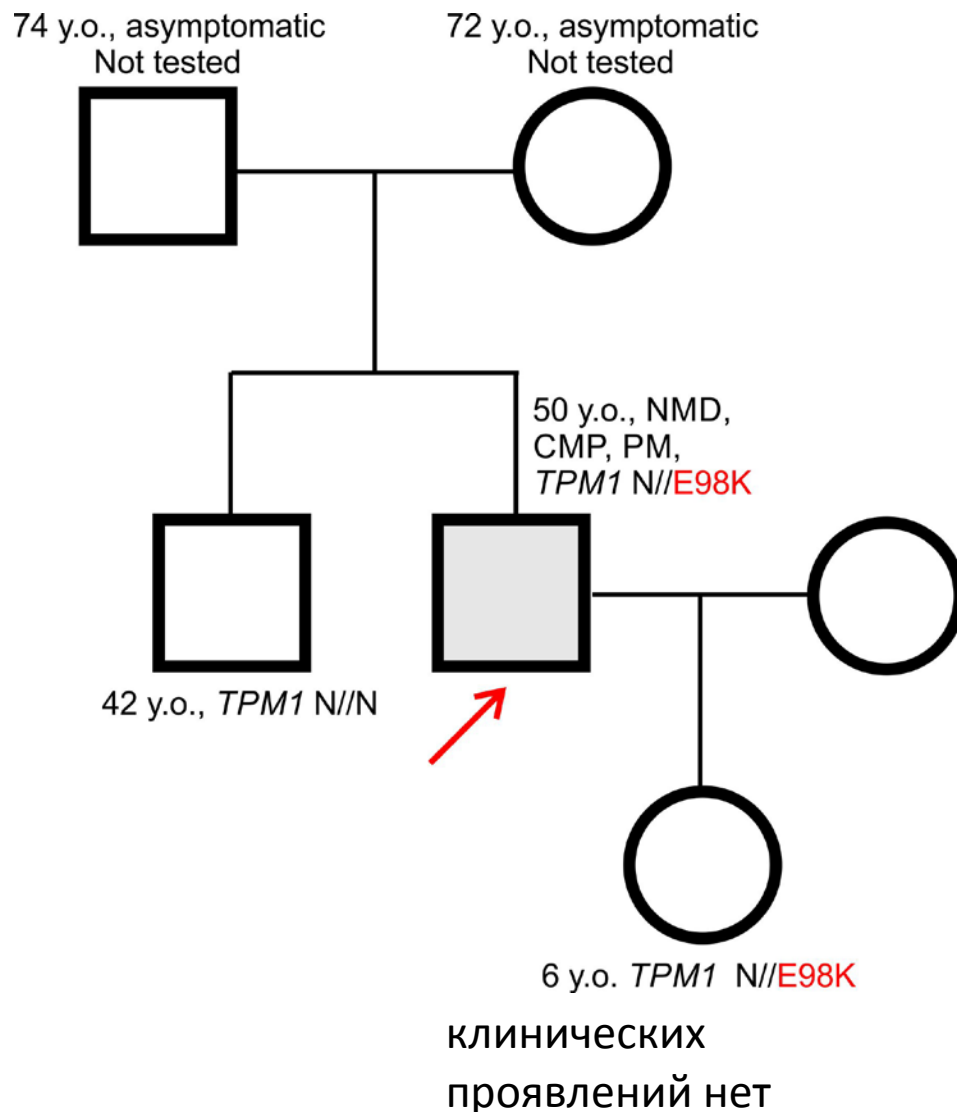


Населённость водородных связей Трм 219 :: актин 326



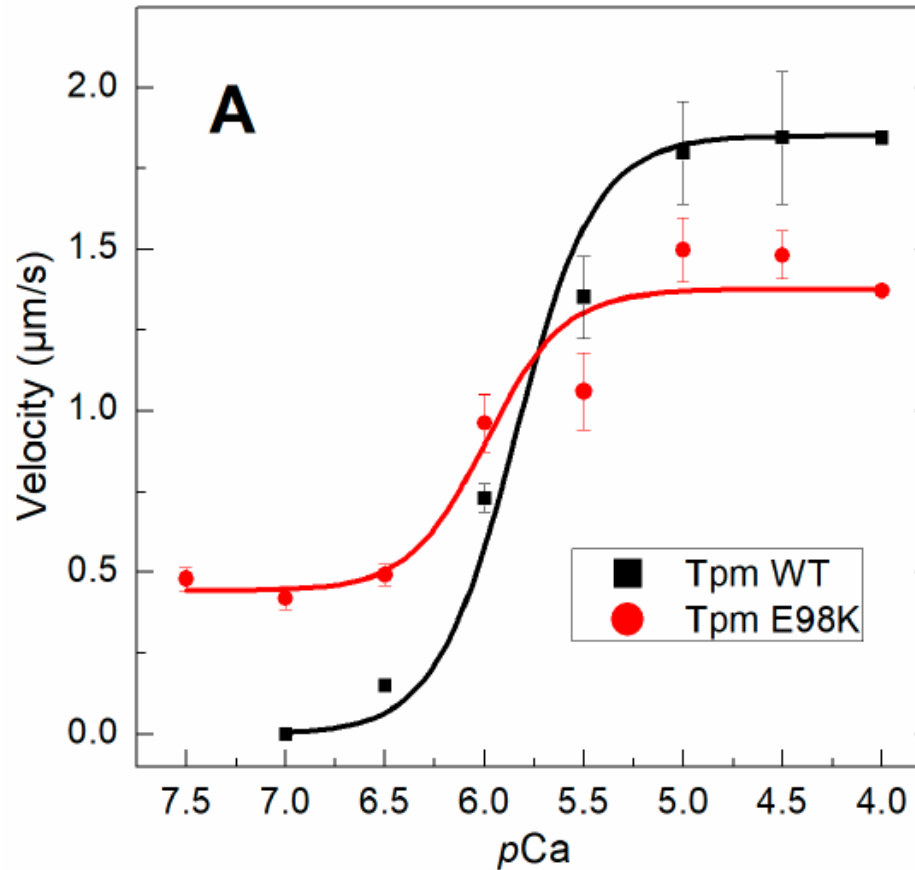
Ослабление актин-Трм взаимодействия дестабилизирует блокированное состояние системы при низком уровне Ca^{2+} и может привести к ГКМП.

[2] замена Glu98Lys



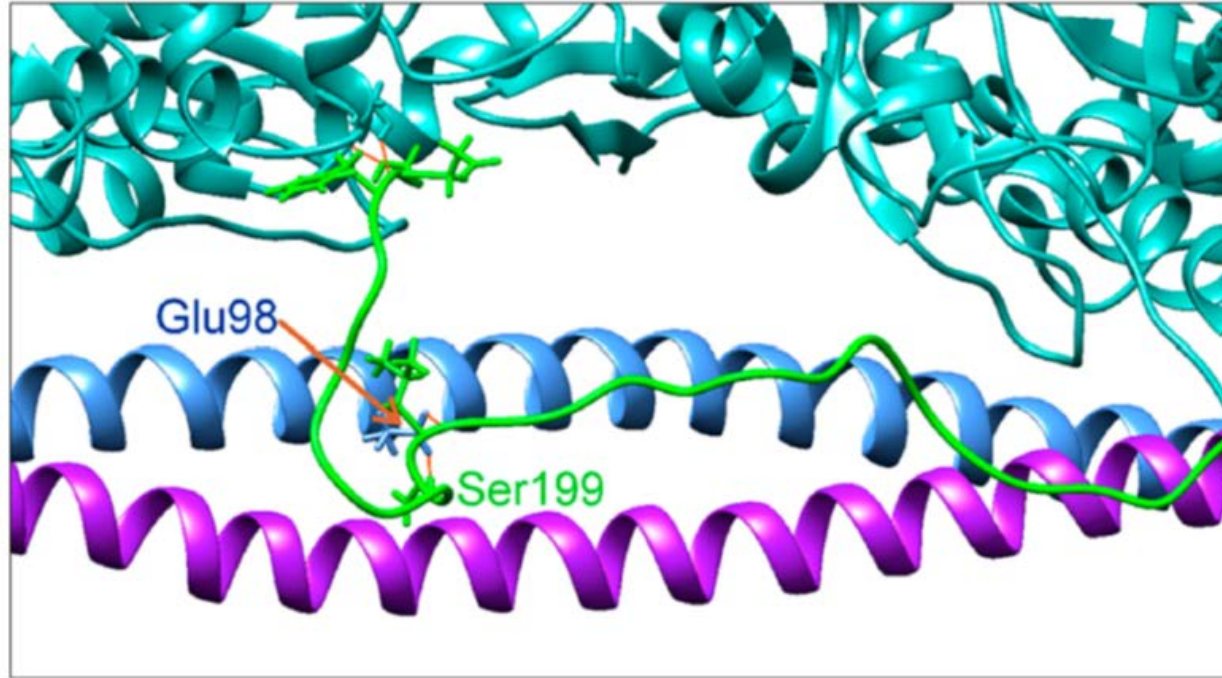
Редкая гетерозиготная мутация гена *TPM1* SNV с.292G > A, p.E98K была обнаружена у 44-летнего пробанда, первые клинические симптомы которого проявились в возрасте 38–39 лет. Диагноз: ГКМП с диастолической дисфункцией и некоторыми признаками рестриктивной кардиомиопатии (РКМП), слабостью скелетных мышц (нервно-мышечное заболевание, НМЗ, NMD) и нарушениями проводимости миокарда. В возрасте 40 лет ему имплантировали кардиостимулятор (ЭКС, РМ).

Замена E98K Тpm изменяет взаимодействие актина и миозина и его регуляцию Ca^{2+} in vitro:



- нарушение релаксации, даже при очень низкой концентрации Ca^{2+} (*);
- снижение скорости скольжения актин-Тpm-Тn нитей по миозину.
- (*) типично для ГКМП

Как это может работать?



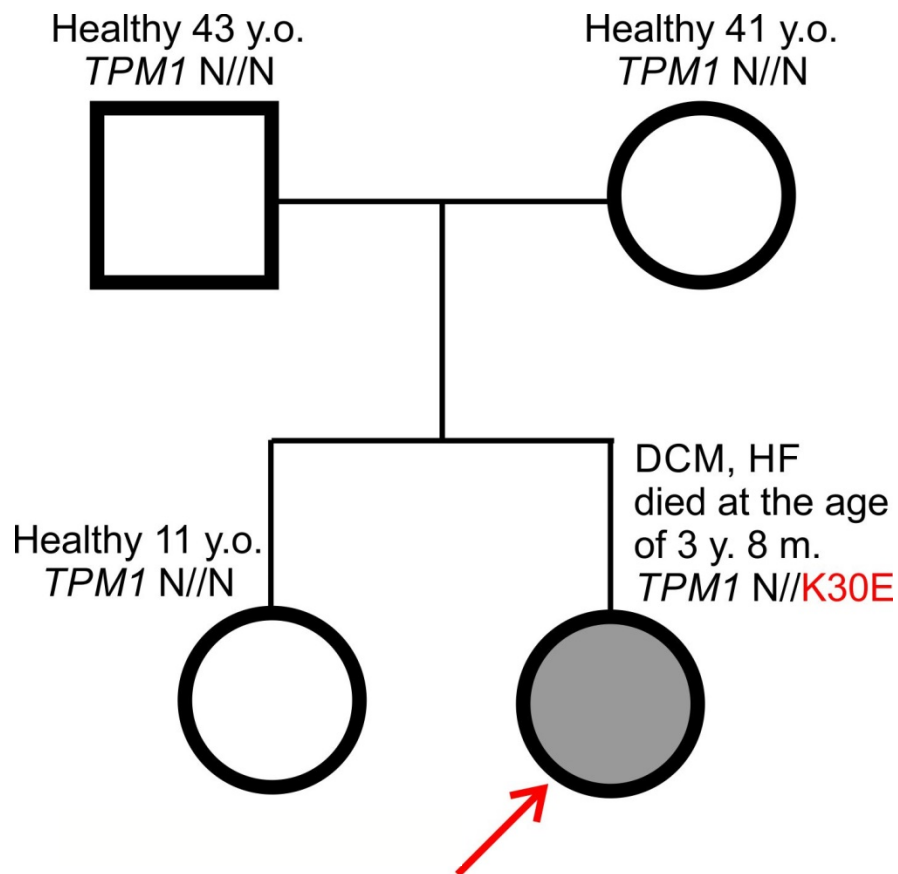
актин

Трп

тяж

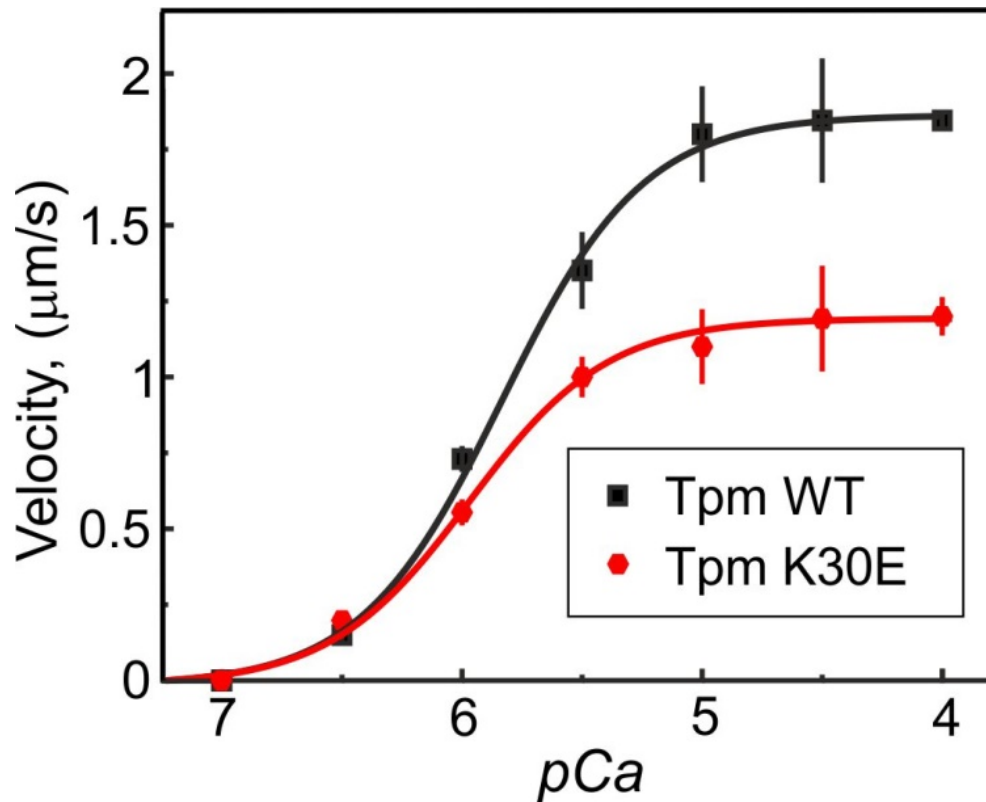
С-терминальный участок тропонина-I (TnI) тянется вдоль **Трп** **тяжа**, заякоривая его на **актине** в отсутствие ионов Ca^{2+} , удерживая Трп в положении, препятствующем связыванию миозина с актином. **Glu98 Трп** образует водородную связь с **Ser199 TnI**, помогая удерживать Трп в заблокированном состоянии. Замена **Glu98** на **Lys** разрывает связь, Это нарушает полную релаксацию и может быть причиной дисфункции.

[3] замена Lys30Glu



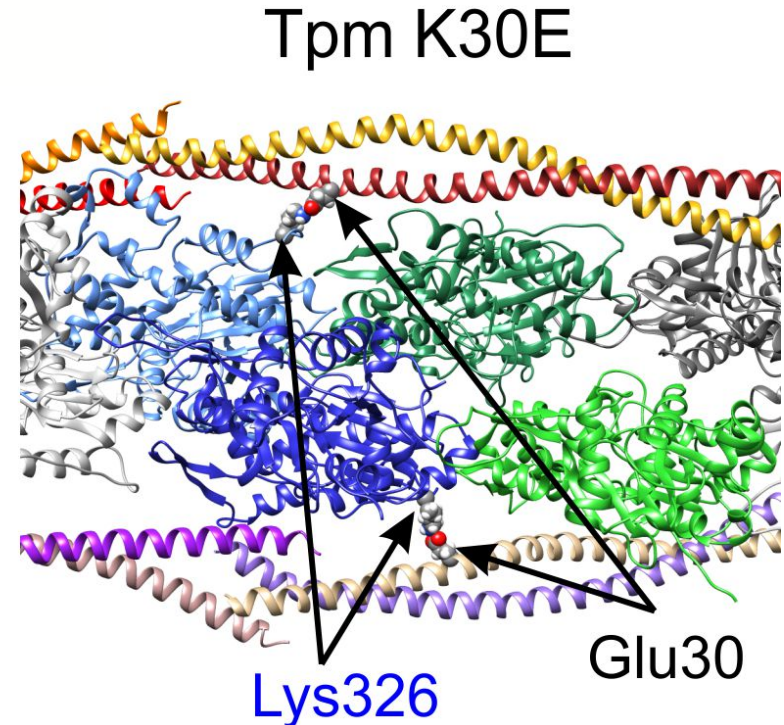
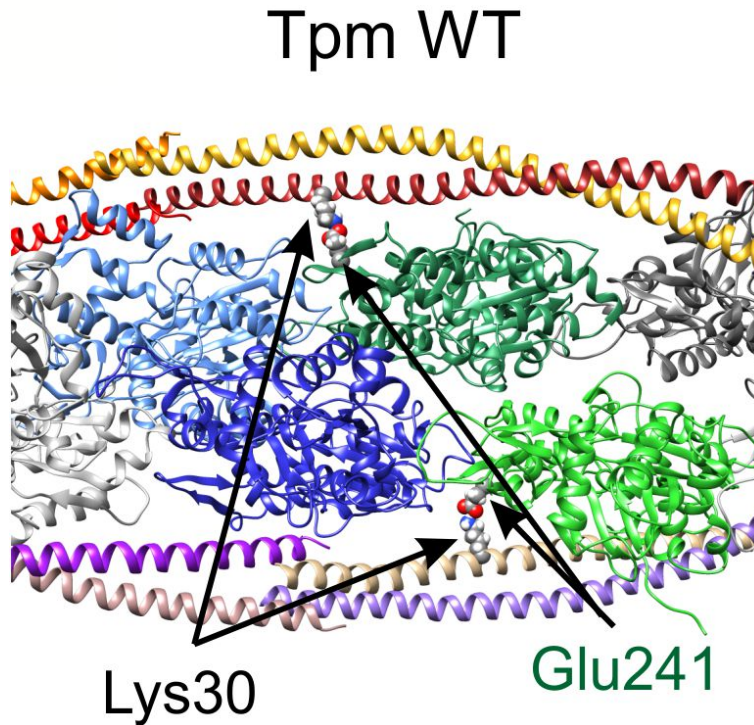
Гетерозиготная мутация *de novo* в гене *TPM1*, K30E, была выявлена у девочки, которая страдала дилатационной кардио-миопатией (ДКМП, **DCM**) и умерла в возрасте 3 лет 8 м. из-за прогрессирования сердечной недостаточности (СН, **HF**).

К30Е Тpm подавляет активацию Ca^{2+} взаимодействия актина с миозином in vitro



снижение скорости скольжения актин-Тpm-Тn нитей по поверхности, покрытой сердечным миозином, при высокой концентрации Ca^{2+}

Как это может работать?



Lys30 Trpm образует ионную и водородную связь с Glu241 соседнего мономера актина. Его замена на Glu30 разрушает эту связь. Вместо этого остаток Glu30 в Trpm связывается с Lys326 другого мономера актина. Эта перестройка взаимодействия Trpm с актиновым филаментом может препятствовать его переходу в открытое, полностью активированное состояние, снижая долю молекул миозина, генерирующих силу, и потенциально приводя к систолической дисфункции и ДКМП.

Выводы

- Лишь небольшая часть известных вариантов мутаций в генах, кодирующих сократительные белки, классифицируется определённо.
- Требуются новые подходы к классификации генетических вариантов.
- В сочетании с биохимическими экспериментами *in vitro* исследования точечных мутаций в белках *in silico* могут дать ключи к пониманию природы вызываемых дисфункций.