

Wpływ mutacji w *TPM2* wywołujących miopatie na zależną od tropomiozyny regulację długości cienkiego filamentu

Znaczenie konserwacji długości filamentu cienkiego dla skurczu mięśnia

Zawiłe mechanizmy prowadzące do skurczu mięśni od dawna fascynowały naukowców i dzięki licznym badaniom dokonano wielu przełomowych odkryć. Jednak nie wszystkie aspekty regulacji skurczu mięśni są w pełni poznane. Skurcz sarkomeru, podstawowej jednostki kurczliwej komórek mięśniowych, jest napędzany cyklicznymi oddziaływaniami między główkami miozyny wystającymi z filamentów grubych a aktynowymi filamentami cienkimi. Jednym z głównych pytań, na które wciąż nie znamy odpowiedzi jest pytanie o to w jaki sposób utrzymywana jest odpowiednia długość filamentów, która bezpośrednio wpływa na liczbę główek miozyny oddziałujących z aktyną. Jest to istotne, gdyż im więcej główek miozyny związanych jest z aktyną, tym mięśnie kurczą się z większą siłą. Co ciekawe, podczas gdy długość grubych filamentów miozynowych jest taka sama, cienkie filamente w różnych typach włókien mięśniowych mają różną długość. Jaki zatem jest mechanizm utrzymujący długość cienkiego filamentu?

Tropomiozyna (Tpm) jest wydłużonym białkiem, które stabilizuje aktynę polimeryzując wzdłuż filamentu w formie długich łańcuchów. Tpm wiąże troponinę (Tn), białko które w sposób zależny od stężenia Ca^{2+} może przesuwac łańcuchy Tpm w poprzek filamentu. Tpm i Tn wspólnie kontrolują dostęp do aktyny innych ligandów, w tym kofiliny (Cof) i tropomoduliny (Tmod), dwóch białek odgrywających rolę w konserwacji długości filamentów cienkich. Tpm asystuje Tmod w wiązaniu do jednego z końców filamentu. Gdy Tmod silnie wiąże się na końcu, wówczas wydłużanie filamentu jest zahamowane. Z drugiej strony Tpm reguluje zdolność Cof do przecinania i skracania filamentów aktynowych. Oddziałując z tymi białkami Tpm może modulować skurcz poprzez utrzymywanie filamentów cienkich w odpowiedniej długości.

Mutacje w *TPM2*, genie kodującym Tpm2.2 – mięśniową izoformę Tpm, są odpowiedzialne za ciężkie zaburzenia mięśni znane jako wrodzone miopatie i artrogrypozy. Zaburzenia te wykazują zróżnicowane objawy, do których należą osłabienie mięśni lub nadmierna kurczliwość. Wciąż nie jest jasne czy mutacje w *TPM2* prowadzą do zmian w długości filamentów i czy zmiany te mają wpływ na rozwój patologicznych objawów.

Cel projektu

Poprzez zbadanie wpływu mutacji w *TPM2* na długość filamentu cienkiego zamierzam poznać molekularny mechanizm, który potencjalnie łączy zmienną długość cienkich filamentów z etiologią wrodzonych chorób mięśni. Planuję zgromadzić eksperymentalne dane, które wyjaśnią czy Tpm2.2 jest włączona w regulację długości filamentu oraz czy mutacje wywołujące choroby zakłócają te funkcje. W szczególności zbadam wpływ mutacji na stabilność filamentu cienkiego, wiązanie Tmod do aktyny i jej zdolność do hamowania procesu wydłużania filamentu, oraz regulację przecinania i skracania filamentu przez Cof.

Opis badań

Aby zbadać skutki mutacji w *TPM2*, oczyszczę aktynę, Tn i miozynę z mięśni kurczaka. Pozostałe białka będą to białka rekombinowane, co oznacza, że kodujące je geny zostaną wprowadzone do komórek bakteryjnych, po czym bakterie zostaną zaindukowane do produkcji dużych ilości tych białek. Do DNA kodującego Tpm2.2 zostały wprowadzone mutacje wykryte u pacjentów, u których zdiagnozowano miopatie. Oczyszczone białka mięśniowe i rekombinowane zostaną ze sobą połączone w celu zrekonstruowania cienkich filamentów. Testy przeprowadzone metodami biochemicznymi oraz z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej będą tak zaplanowane aby pozwoliły na sprawdzenie w jaki sposób mutacje wpływają na funkcje Tpm2.2 i regulację długości cienkiego filamentu przez Tmod i Cof.

Oczekiwane znaczące wyniki

Realizacja projektu pozwoli na odkrycie nowych mechanizmów związanych z rozwojem wrodzonych chorób mięśni oraz dostarczy informacji na temat mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój wrodzonych chorób mięśniowych. Badania zapewnią kompleksową analizę roli wzajemnych oddziaływań między aktyną, Tpm2.2, Tn, Cof i Tmod w regulacji długości cienkiego filamentu. Badania pomogą w zrozumieniu molekularnych podstaw rozwoju nieuleczalnych jak dotąd chorób mięśni.