

О РОЛИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТАЙТИНА В РАЗВИТИИ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

© 2015 г. Н.Н. Салмов*, Ю.В. Грицына*, А.Д. Уланова* **,
И.М. Вихлянцев*, З.А. Подлубная* **

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, Институтская ул., 3;

**Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 3

E-mail: vikhlyantsev@iteb.ru

Поступила в редакцию 20.05.15 г.

На основании проведенных нами ранее экспериментов по изучению изменений содержания тайтина и уровня его фосфорилирования в скелетных мышцах, атрофированных в условиях космического полета, при зимней спячке, а также вследствие развития алкоголь-индуцируемых нарушений сделано предположение, что увеличение степени фосфорилирования тайтина приводит к повышению протеолитической деградации этого белка, что вносит вклад в развитие атрофии скелетных мышц.

Ключевые слова: скелетные мышцы, изоформы тайтина (титина/коннектина), фосфорилирование, Pro-Q Diamond.

Предположение, которое легло в основу данной публикации, было сделано на основании проведенных нами ранее экспериментов по изучению изменений содержания тайтина и уровня его фосфорилирования в скелетных мышцах, атрофированных в условиях космического полета [1], при зимней спячке [2], а также вследствие развития алкоголь-индуцируемых нарушений [3,4]. Полученные результаты позволили сделать предположение, что увеличение степени фосфорилирования тайтина приводит к повышению протеолитической деградации этого белка, что вносит вклад в развитие атрофии скелетных мышц. В работе представлено краткое описание литературных данных, а также результатов наших исследований, поддерживающих это предположение.

Тайтин (титин/коннектин) – гигантский белок саркомерного цитоскелета поперечно-полосатых мышц позвоночных (см. [5,6]). Молекулярные массы изоформ интактного тайтина-1 (T1) составляют 3000–3800 кДа [6]. Молекулы тайтина длиной более 1 мкм перекрывают половину саркомера от M-линии до Z-диска, формируя третью филаментную систему в миофибриллах. В A-зоне саркомера тайтин связан с толстыми (миозиновыми) нитями. Эта часть молекулы, получившая название T2 (м.м. ~2000 кДа), состоит из иммуноглобулин-подобных (IgC2) и фибронектин-подобных (FnIII) доме-

нов с β -складчатой структурой, а также содержит киназный домен (TK), расположенный вблизи M-линии саркомера [6]. В I-зоне саркомера молекула тайтина состоит из дистальной, центральной и проксимальной последовательностей иммуноглобулин-подобных (IgC2) доменов, а также содержит уникальные N2B-, N2A- и PEVK-последовательности [6]. Некоторые участки молекулы тайтина в этой зоне саркомера взаимодействуют с тонкими (актиновыми) нитями, однако большая часть его молекулы проходит свободно, формируя эластичное соединение между концами миозиновых нитей и Z-диском. На каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится шесть молекул тайтина [7], N-концы которых перекрываются в Z-диске, а C-концы – в M-линии саркомера.

Тайтин – полифункциональный белок, участвующий в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры [8], запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия [5,9]. Как сенсор растяжения и напряжения (механосенсор) тайтин, связываясь со многими белками в саркомере и объединяя их в единую сеть, играет важную роль в процессах внутриклеточной сигнализации [6]. Известна способность этого белка фосфорилироваться *in vivo* [10]. Открыты сайты фосфорилирования тайтина в M-линии, I-зоне и Z-диске саркомера [6,11] и обнаружено много потенциальных участков

для фосфорилирования его молекулы [6]. Получены данные о том, что циклин-зависимая PK-2 и ERK1/2 киназы фосфорилируют уникальные последовательности (XSPXR, KSP) молекулы тайтина, расположенные в Z-диске и M-линии саркомера [12–14], протеинкиназы A (PKA) [15–19], G (PKG) [19,20], C (PKC β) [21], киназа, регулируемая экстраклеточным сигналом, 2 (ERK2) [22] и Ca²⁺/кальмодулин-зависимая киназа (CaMKII δ) [23,24] фосфорилируют участки молекулы тайтина, расположенные в I-зоне саркомера. Показано, что фосфорилирование/дефосфорилирование PEVK- и N2B-последовательностей тайтина сердечной мышцы изменяют эластичность его молекул, что приводит к изменению обусловленной тайтином пассивной жесткости кардиомиоцитов и мышцы в целом (для ссылок см. [6]), что, в свою очередь, играет важную роль в регуляции сократительной активности миокарда. Известны данные о фосфорилировании PEVK-участка молекулы тайтина скелетных мышц [25], однако функциональная роль этих изменений неясна.

В 2013–2015 гг. в нашей лаборатории было проведено несколько независимых экспериментов, направленных на изучение изменений содержания тайтина и уровня его фосфорилирования в скелетных мышцах, атрофированных в условиях космического полета, зимней спячки, а также при моделировании алкогольной миопатии [1–4]. Было обнаружено, что развитие атрофических изменений в мышцах полетных мышей и хронически-алкоголизированных крыс сопровождалось уменьшением содержания тайтина, а также увеличением уровня фосфорилирования этого белка, что зарегистрировано с использованием флуоресцентного красителя Pro-Q Diamond на фосфатные группы белков в геле. В частности, 15%-ное снижение веса *m. gastrocnemius* полетных мышей сопровождалось уменьшением в 1,2 раза содержания T1 и увеличением в 1,3 и 3,3 раза степени фосфорилирования T1 и T2 соответственно [1]. В атрофированной (на 30%) *m. soleus* крыс после 6-месячной хронической алкоголизации также наблюдалось снижение содержания T1 (в 1,4 раза) и увеличение степени фосфорилирования T1 (в 1,2 раза) и T2 (в 2 раза) [3,4]. Более высокий уровень фосфорилирования T2 в сравнении с T1 можно объяснить увеличением количества фосфорилированных сайтов прежде всего в T2-участке интактной молекулы тайтина. Подобных изменений в содержании тайтина и степени его фосфорилирования не было обнаружено в скелетных мышцах бурого медведя (*Ursus arctos*) в период зимнего сна, в течение которого, как известно [26], наблюдаются ат-

рофические изменения в скелетной мускулатуре. В частности, в *m. gastrocnemius* спящего бурого медведя не наблюдалось снижения содержания T1 и увеличения уровня фосфорилирования этого белка [2]. Напротив, зарегистрировано даже незначительное снижение степени фосфорилирования как изоформ T1, так и T2-фрагментов в икроножной мышце спящего медведя [2]. Аналогичные результаты были получены нами и при исследовании сезонных изменений содержания и уровня фосфорилирования тайтина в *m. longissimus dorsi* зимне-спящих длиннохвостых сусликов *Spermophilus undulatus* (неопубликованные данные). Анализ полученных результатов позволяет нам предположить, что повышение степени фосфорилирования тайтина, в основном в T2-участке молекулы, увеличивает его чувствительность к протеолизу. Это приводит к уменьшению содержания интактного T1, что вносит вклад в развитие мышечной атрофии, сопровождающейся, например, при функциональной разгрузке такими негативными последствиями, как нарушение саркомерной структуры [27] и сократительной способности мышц [27,28]. Данное предположение не лишено оснований. Известно, что тайтин является субстратом кальций-зависимых протеаз кальпаинов [29]. Высказано предположение, что оборот мышечных белков в саркомере начинается с расщепления кальпаинами тайтина и других белков толстых и тонких нитей с последующей деградацией фрагментов по убиквитин-протеасомному пути [29]. Известно, что степень чувствительности белков к протеолизу кальпаинами зависит от уровня фосфорилирования белкового субстрата. Например, показано, что PKA-опосредованное фосфорилирование тропонина-I снижает его чувствительность к деградации μ -кальпаином, тогда как фосфорилирование тропонина-I протеинкиназой C наоборот повышает его чувствительность к протеолизу вышеуказанным ферментом [30]. Литературные данные об изменении чувствительности тайтина к протеолизу кальпаинами в зависимости от уровня его фосфорилирования отсутствуют. Однако известны результаты исследований, выполненных с использованием моноклональных антител к фосфосерину pS26, которые показали, что трехкратное увеличение степени фосфорилирования PEVK-участка тайтина в четырехглавой мышце бедра пациентов с синдромом Элерса–Данлоса сопровождалось снижением (на ~20%) содержания этого белка [31]. Результаты других исследований выявили изменения с противоположной направленностью. В частности, обнаружено, что снижение (на 20%) уровня фосфорилирования тайтина не

сопровождалось уменьшением его содержания в атрофированной (на 16%) *m. tibialis anterior* мышей в условиях реальной невесомости [1]. Сопоставление этих данных указывает на то, что повышение уровня фосфорилирования тайтина увеличивает его чувствительность к протеолизу. Описанные выше результаты наших исследований не противоречат данному предположению.

Таким образом, мы полагаем, что повышенная протеолитическая деградация тайтина при развитии атрофии скелетных мышц является следствием гиперфосфорилирования этого белка, в основном T2-участка его молекулы. Снижение содержания тайтина приводит к дальнейшему развитию мышечной атрофии, сопровождающейся такими негативными последствиями, как нарушение саркомерной структуры и сократительной способности мышц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 13-04-00281, 14-04-00112, 14-04-32171, 14-04-32240, 14-04-92116).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Ulanova, Y. Gritsyna, I. Vikhlyantsev, et al., *Biomed. Res. Int.* **2015:104735**, doi: 10.1155/2015/104735 (2015).
2. Н. Н. Салмов, И. М. Вихлянец, А. Д. Уланова и др., *Биохимия* **80**, 412 (2015).
3. Ю. В. Грицына, Н. Н. Салмов, И. М. Вихлянец и др., *Молекуляр. биология* **47**, 996 (2013).
4. Н. Н. Салмов, Ю. В. Грицына, А. Д. Уланова и др., в сб. *Рецепция и внутриклеточная сигнализация*, под ред. В.П. Зинченко и А.В. Бережнова (2015), т. 1, с. 296.
5. И. М. Вихлянец и З. А. Подлубная, *Успехи биол. химии* **52**, 239 (2012).
6. W. A. Linke and N. Hamdani, *Circ. Res.* **114**, 1052 (2014).
7. A. D. Liversage, D. Holmes, P. J. Knight, et al., *J. Mol. Biol.* **305**, 401 (2001).
8. R. Horowitz, E. S. Kempner, M. E. Bisher, and R. J. Podolsky, *Nature* **323**, 160 (1986).
9. O. Cazorla, G. Vassort, D. Garnier, and J. Y. Le Guennec, *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**, 1215 (1999).
10. L. L. Somerville and K. Wang, *Arch. Biochem. Biophys.* **262**, 118 (1988).
11. C. C. Gregorio, H. Granzier, H. Sorimachi, and S. Labeit, *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 18 (1999).
12. M. Gautel, K. Leonard, and S. Labeit, *EMBO J.* **12**, 3827 (1993).
13. M. G. Sebestyen, J. A. Wolff, and M. L. Greaser, *J. Cell Sci.* **108** (Pt9), 3029 (1995).
14. M. Gautel, D. Goulding, B. Bullard, et al., *J. Cell Sci.*, **109** (Pt11), 2747 (1996).
15. R. Yamasaki, Y. Wu, M. McNabb, et al., *Circ. Res.*, **90**, 1181 (2002).
16. N. Fukuda, Y. Wu, P. Nair, and H. L. Granzier, *J. Gen. Physiol.* **125**, 257 (2005).
17. M. C. Leake, A. Grützner, M. Krüger, and W. A. Linke, *J. Struct. Biol.* **155**, 263 (2006).
18. M. Krüger and W. A. Linke, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 435 (2006).
19. S. Kötter, L. Gout, M. Von Frieling-Salewsky, et al., *Cardiovasc Res.* **99**, 648 (2013).
20. M. Krüger, S. Kötter, A. Grützner, et al., *Circ. Res.* **104**, 87 (2009).
21. C. Hidalgo, B. Hudson, J. Bogomolovas, et al., *Circ. Res.* **105**, 631 (2009).
22. A. Raskin, S. Lange, K. Banares, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 29273 (2012).
23. N. Hamdani, J. Krysiak, M. M. Kreusser, et al., *Circ. Res.* **112**, 664 (2013).
24. C. G. Hidalgo, C. S. Chung, C. Saripalli, et al., *J. Mol. Cell Cardiol.* **54**, 90 (2013).
25. A. E. Müller, M. Kreiner, S. Kötter, et al., *Front Physiol.* **5**, 449. doi: 10.3389/fphys.2014.00449 (2014).
26. D. B. Tinker, H. J. Harlow, and T. D. Beck, *Physiol. Zool.* **71**, 414 (1998).
27. J. Udaka, S. Ohmori, T. Terui, et al., *Gen. Physiol.*, **131**, 33 (2008). doi: 10.1085/jgp.200709888.
28. Б. С. Шенкман, З. А. Подлубная, И. М. Вихлянец и др., *Биофизика* **49**, 881 (2004).
29. D. E. Goll, G. Neti, S. W. Mares, and V. F. Thompson, *J. Anim. Sci.* **86** (14 Suppl), E19 (2008).
30. F. Di Lisa, R. De Tullio, F. Salamino, et al., *Biochem. J.* **308** (Pt 1), 57 (1995).
31. C. A. Ottenheijm, N. C. Voermans, B. D. Hudson, et al., *J. Appl. Physiol.* (1985), **112**, 1157 (2012), doi: 10.1152/jappphysiol.01166.2011.

On the Role of Titin Phosphorylation in Development of Muscular Atrophy

N.N. Salmov*, Yu.V. Gritsyna*, A.D. Ulanova* **,
I.M. Vikhlyantsev*, and Z.A. Podlubnaya* **

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino 142290, Russia*

***Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino 142290, Russia*

From our earlier experiments on the study of changes in titin content and the level of its phosphorylation in skeletal muscles, atrophied during space flight, hibernation, and also because of the development of alcohol-induced lesions it has been suggested that an increase in the degree of titin phosphorylation results in increased proteolytic degradation of this protein, that contributes to the development of skeletal muscle atrophy.

Key words: skeletal muscles, titin isoforms, phosphorylation, Pro-Q Diamond

Сдано в набор 21.04.2015	Подписано к печати 16.06.2015	Дата выхода в свет 16.07.2015	Формат 60x88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 26,0	Усл. кр.-отт. 3,5 тыс.	Уч.-изд. л. 26,0
	Тираж 135 экз.	Зак. 305	Цена свободная

Учредители:
Российская академия наук,
Институт биофизики клетки РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство «Наука»
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП «Типография «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6
