

УДК 577.353

ПРОТЕОСТАЗ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP90 В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА В ПЕРИОД ГИБЕРНАЦИИ

© 2023 г. Ю.В. Грицына*, С.С. Попова*, Г.З. Михайлова*, Л.Г. Бобылёва*, С.Н. Удалыцов**, О.С. Моренков***, Н.М. Захарова***, И.М. Вихлянцев*, ****, #

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

** Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения — обособленное подразделение ФИЦ
«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 2, Пущино Московской области, 142290, Россия

*** Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский
научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

**** Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета,
ул. Карла Маркса, 76, Казань, 420012, Россия

E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2023 г.

После доработки 01.08.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Исследованы изменения содержания белка теплового шока 90 (HSP90) в *m. soleus* (содержит преимущественно волокна, экспрессирующие «медленную» изоформу I ТЦМ) и *m. gastrocnemius* (содержит преимущественно волокна, экспрессирующие «быстрые» изоформы II ТЦМ) истинного гибернанта длиннохвостого суслика (*Uroditellus undulatus*) в разные периоды годового цикла — летней активности (сезонный контроль), гипотермии/спячки, зимней (межбугорной) активности. Обнаружено, что несмотря на развитие атрофических изменений, более выраженных в «быстрой» *m. gastrocnemius*, содержание HSP90 в обеих мышцах не изменялось на протяжении всего периода гибернации. Обсуждается роль HSP90 в поддержании стабильности молекул гигантского саркомерного белка титина в периоды входа животного в состояние гипотермии и выхода из этого состояния, когда увеличивается активность кальпаиновых протеаз вследствие повышенного содержания Ca^{2+} в цитозоле мышечных клеток, а также в период гипотермии, когда активность кальпаинов, по всей вероятности, не ингибируется полностью. В период зимней/межбугорной активности, когда наблюдается повышенный оборот титина в поперечно-полосатых мышцах суслика, константное содержание HSP90, по-видимому, необходимо для правильного фолдинга заново синтезированных молекул титина и их встраивания в саркомеры, а также для удаления неправильно свернутых и отслуживших молекул/фрагментов титина и других белков. Таким образом, протеостаз HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика может вносить вклад в поддержание стабильного уровня титина и, возможно, других саркомерных белков в период гибернации, что, в свою очередь, будет способствовать поддержанию высокоупорядоченной саркомерной структуры и необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы цикла «спячка—бодрствование».

Ключевые слова: гибернация, длиннохвостый суслик *Uroditellus undulatus*, скелетные мышцы, белки теплового шока, HSP90.

DOI: 10.31857/S0006302923050241, EDN: NASQXV

Гибернация/зимняя спячка млекопитающих — это состояние гипотермии и сниженного метаболизма, в которое животное входит вследствие эволюционно закрепленной совокупности пове-

денческих, физиологических, клеточных и молекулярных стратегий, позволяющих млекопитающим выживать в суровых условиях окружающей среды [1]. Многочисленные исследования механизмов адаптации зимоспящих животных к условиям зимней спячки свидетельствуют о наличии у разных видов гибернантов общих молекулярно-

Сокращения: ТЦМ — тяжелые цепи миозина, HSP90 — белок теплового шока 90.

генетических и других стратегий выживания в условиях гибернации. Так, проведенные за последние годы исследования выявили дифференциально экспрессирующиеся гены в поперечно-полосатых мышцах, а также других органах зимоспящих, что свидетельствует о молекулярно-генетических механизмах, регулирующих сезонные изменения активности многих сигнальных путей [2–5]. В научной литературе появились новые термины: «гибернационный фенотип», «несущественные гены и процессы» (nonessential genes and processes), которые «выключаются», чтобы сохранить энергоресурсы, необходимые для выживания в условиях зимней спячки [6].

Однако важно отметить, что несмотря на наличие у разных зимоспящих животных (летучих мышей, сонь, сусликов, медведей и др.) общих особенностей их «гибернационного фенотипа» (например, «fast-to-slow» трансформации миозина и мышечных волокон [7,8]; переключения метаболизма с углеводного на липидный [9]), в период гибернации у этих животных наблюдаются неодинаковые и часто противоположные изменения на молекулярном уровне. Эти данные позволяют предположить, что у каждого вида зимоспящего животного существует свой уникальный подход к «погружению» в состояние гибернации, что, несомненно, является чрезвычайно интересным научным аспектом, хотя это значительно усложняет поиск уникальных белковых комплексов с целью использования молекулярно-клеточных стратегий гибернантов для лечения/предотвращения негативных изменений у человека или у негибернирующих животных. В связи с этим исследования особенностей «гибернационного фенотипа» длиннохвостого суслика (*Urocitellus undulatus*), являющегося наименее изученным среди других видов зимоспящих, имеют большую научную значимость.

Исследования, проведенные нами ранее, выявили уникальную молекулярную стратегию длиннохвостого суслика, заключающуюся в поддержании стабильного уровня гигантских миофибриллярных белков толстых и тонких нитей титина и небулина в поперечно-полосатых мышцах в течение всего гибернационного сезона [10–12]. Так, во время оцепенения/спячки в сердечной и ряде скелетных мышц сусликов наблюдалось незначительное уменьшение (в ~1,2 раза) содержания титина. Во время межбуготной/зимней активности наблюдался преимущественный синтез титина, что приводило к быстрому восстановлению нормального содержания этого белка в мышцах [12]. При этом не наблюдалось нарушений высокоупорядоченной структуры саркоме-

ров в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика в периоды зимней активности [12].

В данной работе в двух скелетных мышцах длиннохвостого суслика исследованы сезонные изменения содержания белка теплового шока 90 (HSP90), который, являясь шапероном и важным компонентом механизма внутриклеточного «контроля качества белка» (protein quality control, PQC), играет также важную роль в регуляции стабильности молекул гигантского саркомерного белка титина [13]. В научной литературе также обсуждается, что поддержание стабильного уровня или увеличение содержания белков теплового шока, в том числе и HSP90, в разных тканях и органах, включая мышцы, как у зимоспящих млекопитающих [14–18], так и у других животных (черепахи [19], лягушки [20]), впадающих в состояние оцепенения и гипотермии, может являться общей молекулярной стратегией, защищающей клетки и макромолекулы от повреждений в условиях стресса во время гипотермии и при выходе из этого состояния.

Принимая во внимание процитированные выше данные о белках теплового шока, данные о «fast-to-slow» изменениях в скелетных мышцах разных видов зимоспящих в период гибернации [7, 8], а также данные о преобладающем синтезе титина в мышцах длиннохвостого суслика в период зимней активности [12], мы ожидали получить следующие результаты: (1) обнаружить константный уровень HSP90 в «медленной» мышце *m. soleus* на фоне отсутствия или слабо выраженных атрофических изменений в период гипотермии/спячки; (2) выявить уменьшение содержания HSP90 в «быстрой» мышце *m. gastrocnemius* на фоне более выраженных атрофических изменений в период гипотермии/спячки; (3) обнаружить восстановление уровня HSP90 в *m. gastrocnemius* и возможное увеличение содержания этого белка в *m. soleus* длиннохвостого суслика в период зимней (межбуготной) активности.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на истинном гибернанте длиннохвостом суслике *Urocitellus undulatus* (прежнее название *Spermophilus undulatus*). Животные были отловлены в окрестностях города Якутска и доставлены в виварий ИБК РАН (Пушино, Московская область), где они содержались в индивидуальных клетках при естественном освещении, температуре воздуха 20–21°C и влажности 65–70%. Гнездовой материал и пища — *ad libitum*. В экспериментах использовали животных обоих полов массой 550–750 г. Животные были

разделены на три группы: «Летняя активность» (нормотермия, 38°C, июнь–июль, $n = 6$); «Гипотермия» (глубокое оцепенение/спячка, декабрь–март, температура сердечной мышцы 1.5–2.0°C, продолжительность периода гипотермии 5–11 суток, $n = 6$); «Зимняя активность» (нормотермия/межбугорчатая активность, 36–37°C, периодически повторяющиеся временные промежутки (не более суток) между периодами гипотермии, взятие материала через 5–14 ч эутермного состояния после пробуждения, $n = 6$). Перед сезоном спячки сусликов переносили в темное помещение с температурой 1–3°C и перед экспериментом размещали в деревянных боксах размером 20×20×25 см с гнездовым материалом. Для регистрации состояния животных в дно деревянного бокса были вмонтированы термодатчики. Температура «подстилки» у животного, пребывающего в состоянии гипотермии (спячки) была порядка 2–4°C, а при выходе животного из спячки температура дна ящика поднималась до 12–16°C.

Процедура мониторинга и отбора животных проводилась сотрудниками лаборатории механизмов природного и искусственного гипобиоза (ИБК РАН, рук. лаб. Н.М. Захарова) и подробно описана в работе [21]. Животных декапитировали с помощью гильотины, немедленно вскрывали грудную полость и измеряли температуру в области сердца температурным датчиком RET2 (Physitemp, США) с точностью до 0.1°C. Мышцы *m. soleus* («медленная») и *m. gastrocnemius medialis* («быстрая») вырезали, замораживали в жидком азоте и хранили при –75°C. Активные суслики подвергались анестезии Золетилом (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) (4 мг/кг, внутримышечно).

Для определения методом Вестерн-блоттинга сезонных изменений содержания белка HSP90 экстракцию белков из скелетных мышц сусликов проводили в лизирующем буфере, содержащем 12 мМ трис-HCl, 1.2% додецилсульфата натрия, 5 мМ ЭГТА, 10% глицерина, 2% β-меркаптоэтанола, 5 мкг/мл леупептина и ингибитора E64, pH 7.0. Экстракцию GAPDH (референсного белка) проводили в этом же лизирующем буфере. Белковые образцы нагревали при 95°C в течение трех-четырех минут. На дорожки в геле наносили одинаковые объемы белковых образцов, выравненных по концентрации общего белка, которую определяли методом Бредфорда по протоколу изготовителя (ЗАО «Силекс», Россия), используя бычий сывороточный альбумин как стандарт. ДСН-электрофорез проводили в 9.5–10% полиакриламидном геле по методу, описанному в работе [22]. Перенос белков с геля осуществляли на

PVDF-мембрану. Были использованы первичные антитела к HSP90α/β (1:2000, номер клона 6H1/F8, получены в лаборатории проблем клеточного стресса (ИБК РАН, рук. лаб. О.С. Моренков), более подробная информация об этих антителах представлена в работе [12]) и GAPDH (1:2000, ab37168, Abcam, Великобритания). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (1:3000, ab6722 и ab6790, Abcam, Великобритания). Для визуализации белковых полос на мембранах использовали раствор NBT/BCIP (Roche, Германия). Отмытые гели и блот-мембраны оцифровывали, а затем проводили денситометрический анализ с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11 (Newcastle Upon Tyne, Великобритания).

Для определения атрофических изменений мышечных волокон методом 3D-реконструкции были взяты фрагменты вышеуказанных двух скелетных мышц сусликов трех экспериментальных групп – «Летняя активность» ($n = 5$) (сезонный контроль), «Гипотермия» ($n = 5$), «Зимняя активность» ($n = 4$). Фрагменты мышц фиксировали в течение 16 ч при комнатной температуре, погружая в раствор, содержащий 4% параформальдегида, 2.5% глутарового альдегида и 50 мМ сахарозы в 0.1 М Na-какодилатном буфере (pH 7.4). Для постфиксации использовали 2%-й раствор четырехоксида осмия. После сушки в этаноле и ацетоне ткани заливали эпоксидной смолой EMBed и затем выдерживали в течение 48 ч при 60°C. Серийные срезы толщиной 9 мкм получали из блоков, залитых в эпоксидную смолу на пирамитоме (LKB 11800, Швеция). Визуализацию проводили на микроскопе NU-2E (Carl Zeiss, Германия, объектив E25× Planachromat). Панорамные изображения серийных срезов были выровнены относительно друг друга с помощью компьютерной программы IGL Align sEM Align. Ориентирами служили контуры внешнего периметрия. Контуры каждого мышечного волокна были построены путем ручной сегментации в программе IGL Trace (версия 1.20b). Для калибровки был принят во внимание коэффициент усадки мышечной ткани (10%), вызванный процедурами постфиксации. Трехмерные изображения мышечных волокон были сформированы с использованием программного обеспечения IGL Trace. Количественные параметры рассчитывали с помощью коммерческой программы Actify's 3D View. Объемы 120 и 150 мышечных волокон (из расчета 30 волокон для каждого мышечного образца) были рассчитаны для группы «Зимняя активность» и для

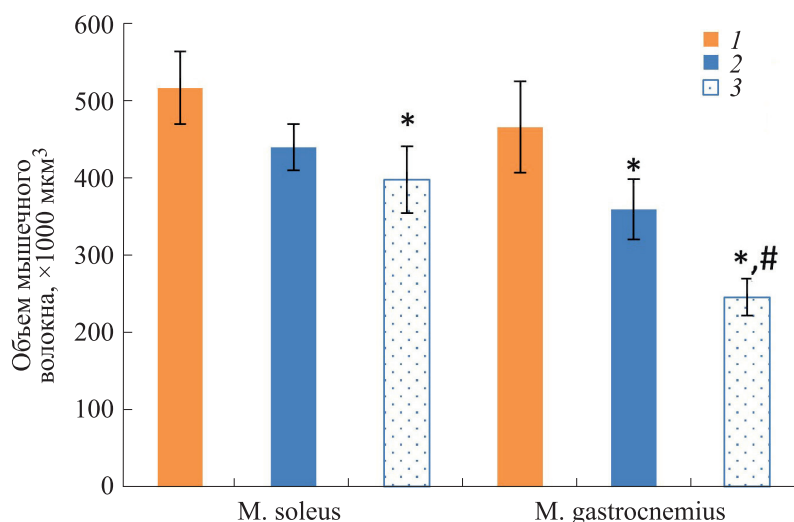


Рис. 1. Сезонные изменения объема мышечных волокон *m. soleus* и *m. gastrocnemius* длиннохвостого суслика: 1 – «Летняя активность» ($n = 5$), 2 – «Гипотермия» ($n = 5$), 3 – «Зимняя активность» ($n = 4$). Значения представлены как $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение; * – в сравнении с группой «Летняя активность», $p < 0.05$; # – в сравнении с группой «Гипотермия», $p < 0.05$.

групп «Летняя активность» и «Гипотермия» соответственно.

Статистическую обработку результатов исследования проводили при помощи пакета SigmaPlot 11.0 (Systat Software, США). В связи с тем, что распределение некоторых выборок данных не являлось нормальным (согласно критерию Шапиро–Уилка), для анализа достоверности наблюдаемых различий использовали непараметрический однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (односторонний дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса) с последующим парным сравнением по тесту Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены данные 3D-реконструкции объема мышечных волокон *m. soleus* и *m. gastrocnemius* сусликов трех экспериментальных групп. Результаты указывают на развитие атрофических изменений в двух скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период гибернационного сезона. В частности, обнаружено уменьшение на 23% ($p < 0.05$) объема мышечных волокон «быстрой» икроножной мышцы сусликов группы «Гипотермия» и на 48% ($p < 0.01$) группы «Зимняя активность» в сравнении с группой «Летняя активность». Объем мышечных волокон «медленной» *m. soleus* сусликов группы «Гипотермия» имел тенденцию к уменьшению на ~15%,

однако статистически значимых различий этого параметра в сравнении с группой «Летняя активность» не было. Статистически значимое уменьшение на 23% ($p < 0.05$) объема мышечных волокон *m. soleus* наблюдалось в группе «Зимняя активность». При этом статистически значимых различий в атрофии мышечных волокон *m. soleus* между группами «Гипотермия» и «Зимняя активность» не выявлено. Полученные результаты свидетельствуют о более выраженных атрофических изменениях в «быстрой» мышце *m. gastrocnemius* и менее выраженной атрофии в «медленной» мышце *m. soleus* у длиннохвостого суслика в период гибернации.

На рис. 2 представлены данные Вестерн-блот-анализа сезонных изменений содержания HSP90 в *m. gastrocnemius* и *m. soleus* длиннохвостого суслика. Несмотря на развитие атрофических изменений (рис. 1), статистически значимых различий в содержании HSP90 в исследуемых скелетных мышцах сусликов трех экспериментальных групп не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В целом наши предположения о поддержании константного уровня HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика в период гибернации подтвердились. В чем может заключаться физиологический смысл подобной молекулярной стратегии? Белки теплового шока, в том числе и HSP90, являются важными компонентами механизма внутриклеточного «контроля качества белка» [23]. Внутриклеточный «контроль качества

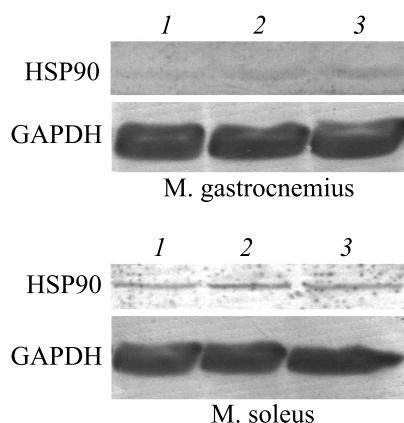


Рис. 2. Вестерн-блот анализ сезонных изменений содержания HSP90 в «быстрой» *m. gastrocnemius* ($n = 6$) и «медленной» *m. soleus* ($n = 6$) мышцах длиннохвостого суслика: 1 – «Летняя активность»; 2 – «Гипотермия»; 3 – «Зимняя активность»; GAPDH – референсный белок.

белка» необходим для поддержания баланса между деградацией белка и его синтезом. Поддержание такого баланса особенно важно в «долгоживущих», интенсивно работающих и испытывающих значительные механические нагрузки клетках поперечно-полосатых мышц. Большое количество белковых компонентов должно быть синтезировано, подвергнуто правильному фолдингу и встроено в саркомер, тогда как пропорциональная часть соответствующих белков должна быть подвергнута деградации [23, 24]. Дисбаланс белкового гомеостаза приводит к накоплению неправильно свернутых белков и их агрегатов в цитозоле, которые являются токсичными для клетки, что, в конечном итоге, ведет к развитию миопатии [24, 25]. Одним из «сложных» объектов для механизма внутриклеточного «контроля качества белка» является гигантский мышечный белок титин. На сегодняшний день точные механизмы «контроля качества» титина ни в норме, ни при патологии, ни при гибернации до конца неясны.

Шаперон HSP90 широко распространен во всех тканях живых организмов и принимает участие в фолдинге, поддержании структуры белков, их деградации, в предотвращении белковой агрегации, а также в процессах внутриклеточной сигнализации [26]. В саркомере HSP90 связывается с миозином, однако в комплексе с белками SET-семейства (содержат SET-домен, обладающий метилтрансферазной активностью) HSP90 способен связываться с N2A-доменом титина, защищая тем самым от протеолиза эту часть молекулы титина в I-зоне саркомера. Для взаимодействия с титином HSP90 должен быть метилирован с помощью SMYD2 [13]. После глутатионилирования или окисления SMYD2 этот комплекс диссоциирует и N2A-область титина оказывается доступной для расщепления кальпаином-1 – основным

протеолитическим ферментом титина. Эти данные свидетельствуют о положительной роли HSP90 в регуляции стабильности молекулы титина [13].

Результаты, полученные в нашем исследовании, свидетельствуют о константном содержании HSP90 в течение всего гибернационного периода как в «быстрой», так и в «медленной» скелетных мышцах длиннохвостого суслика, несмотря на развитие в них атрофических изменений. Аналогичные результаты, свидетельствующие о поддержании константного уровня HSP90 в течение всего сезона спячки в двух других поперечно-полосатых мышцах (миокарде и *m. longissimus dorsi*) длиннохвостого суслика, получены нами ранее [12]. Подобный протеостаз HSP90 несомненно будет играть положительную роль в поддержании стабильности молекул титина как в периоды входа животного в состояние гипотермии и выхода из этого состояния, когда увеличивается активность кальпаиновых протеаз вследствие повышенного содержания Ca^{2+} в цитозоле мышечных клеток (см. для ссылок работу [12]), так и в период гипотермии, когда активность кальпаинов, судя по нашим данным, не ингибируется полностью [12, 27]. В период зимней/межбугутной активности, когда наблюдается повышенный оборот (turnover) титина в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика [12], константное содержание HSP90 будет необходимо для правильного фолдинга заново синтезированных молекул титина и их встраивания в саркомеры, а также для удаления неправильно свернутых и «старых» молекул/фрагментов титина и других белков. Таким образом, протеостаз HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика может вносить вклад в поддержание стабильного уровня титина и других саркомерных белков в период гибернации, что, в свою очередь, будет способствовать поддержа-

нию высокоупорядоченной саркомерной структуры и необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы цикла «спячка-бодрствование»: вход в спячку, оцепенение, выход из спячки, межбаутная активность.

Наши данные согласуются с результатами других исследований, тоже свидетельствующими о константом содержании разных белков теплового шока в миокарде тринадцатиполосного суслика (*Ictidomys tridecemlineatus*) в период гибернации [18]. Авторами сделан вывод о цитопротекторной роли белков теплового шока, способствующих повышению устойчивости миокарда к стрессовым воздействиям в это время. Другие исследователи показали увеличение содержания HSP70 (в 1.7 раза) в грудной мышце и двуглавой мышце плеча у летучей мыши *Murina leucogaster* во время спячки [15]. Был сделан вывод о важной роли повышенного содержания HSP70 в предотвращении атрофии и поддержании нормальной сократительной способности скелетных мышц после их продолжительного (в течение трех месяцев) неиспользования.

Мы полагаем, что поддержание константного уровня HSP90 в скелетных мышцах длиннохвостого суслика вносит вклад в уменьшение протеолиза титина в период оцепенения, а также способствует быстрому обновлению и восстановлению нормального содержания титина в период межбаутных пробуждений. В совокупности полученные нами ранее данные [10–12] и результаты этой работы свидетельствуют о протеостазе титина и HSP90 в поперечно-полосатых мышцах длиннохвостого суслика. Подобная молекулярная стратегия направлена на сохранение высокоупорядоченной саркомерной структуры и поддержание необходимого уровня сократительной активности мышц в разные фазы цикла «спячка-бодрствование».

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (<https://www.pbcras.ru/services/tskp>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 075-01025-23-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по биоэтике ИБК РАН и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive (86/609/ЕЕС)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. M. Mohr, S. N. Bagriantsev, and E. O. Gracheva, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **36**, 315 (2020).
2. K. L. Vermillion, K. J. Anderson, M. Hampton, and M. T. Andrews, *Physiol. Genomics*, **47** (3), 58 (2015).
3. D. A. Mugahid, T. G. Sengul, X. You, et al., *Sci. Rep.*, **9** (1), 19976 (2019).
4. A. V. Goropashnaya, B. M. Barnes, and V. B. Fedorov, *Sci. Rep.*, **10** (1):9010 (2020).
5. E. Tseng, J. G. Underwood, B. D. Evans Hutzenbiler, et al., *Genes, Genomes, Genetics*, **12** (3), jkab422 (2022).
6. W. A. Ingelsson-Filpula and K. B. Storey, *Epigenomes*, 2021 **5**(4):28 (2021).
7. C. J. Cotton, *J. Exp. Biol.*, 219 (Pt 2), 226 (2016).
8. M. V. Lazareva, K. O. Trapeznikova, I. M. Vikhlyantsev, et al., *Biofizika*, **57** (6), 982 (2012).
9. A. G. Hindle, A. Karimpour-Fard, L. E. Epperson, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **301** (5), 1440 (2011).
10. I. M. Vikhlyantsev, E. V. Karaduleva, and Z. A. Podlubnaya, *Biophysics*, **53**, 598 (2008).
11. I. M. Vikhlyantsev and Z. A. Podlubnaya, *Biochemistry (Moscow)*, **77** (13), 1515 (2012).
12. S. Popova, A. Ulanova, Y. Gritsyna, et al., *Sci. Rep.*, **10** (1), 15185 (2020).
13. L. T. Donlin, C. Andresen, S. Just, et al., *Genes Dev.*, **26** (2), 114 (2012).
14. S. F. Eddy, J. D. McNally, and K. B. Storey, *Arch. Biochem. Biophys.*, **435** (1), 103 (2005).
15. K. Lee, J. Y. Park, W. Yoo, et al., *J. Cell Biochem.*, **104** (2):642 (2008).
16. C. W. Wu, K. K. Biggar, J. Zhang, et al., *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **13** (2), 119 (2015).
17. B. E. Luu, S. Wijenayake, J. Zhang, et al., *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, **224**, 26 (2018).
18. C. L. Childers, S. N. Tessier, and K. B. Storey, *Peer J.*, **7**, e7587 (2019).
19. A. Krivoruchko and K. B. Storey, *J. Comp. Physiol. B*, **180** (3), 403 (2010).
20. H. M. Rabeae, S. S. Mahfouz, A. K. M. Abdel Latif, et al., *J. Therm. Biol.*, **114**, 103490 (2023).
21. Н.М. Захарова, *Фундаментальные исследования*, **6**, 1401 (2014).
22. U. K. Laemmli, *Nature*, **227** (5259), 680 (1970).
23. S. Kötter and M. Krüger, *Front. Physiol.*, **13**, 914296 (2022).
24. K. Hnia, T. Clausen, and C. Moog-Lutz, *Trends Mol. Med.*, **25** (9), 760 (2019).
25. Z. V. Wang and J. A. Hill, *Cell Metab.*, **21**(2), 215 (2015).

26. P. Csermely, T. Schnaider, C. Soti, et al., *Pharmacol. Ther.*, **79** (2), 129 (1998). 27. S. S. Popova, I. M. Vikhlyantsev, N. M. Zakharova, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.* **472** (1), 56 (2017).

Proteostasis of Heat Shock Protein 90 in Skeletal Muscles of the Long-Tailed Ground Squirrel during Hibernation

Yu.V. Gritsyna*, S.S. Popova*, G.Z. Mikhailova*, L.G. Bobyleva*, S.N. Udaltsov**, O.S. Morenkov***, N.M. Zakharova***, and I.M. Vikhlyantsev*, ****

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

***Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*****Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, ul. Karla Marksa 76, Kazan, 420012 Russia*

We investigated changes in the content of heat shock protein 90 in m. soleus (comprised of mainly fibers expressing the MyHC slow isoform I) and m. gastrocnemius (composed of mainly fibers expressing the MyHC fast isoforms II) of the long-tailed ground squirrel *Urocyon undulatus* in different periods of the annual cycle: summer activity (seasonal control), hypothermia/torpor, winter (interbout) activity. The content of the protein in both muscles was found not to change throughout the entire hibernation period despite the development of atrophic changes, more pronounced in fast m. gastrocnemius. The role of HSP90 in maintaining the stability of giant sarcomeric titin protein molecules is discussed with reference to animal's entry into and exit from hypothermia, when the activity of calpain proteases increases due to the increased content of Ca^{2+} in the cytosol of muscle cells; and with respect to the torpor, when the activity of calpains is, most likely, not inhibited completely. During the interbout activity with an observed increased titin turnover in squirrel's striated muscles, a constant content of HSP90 appears to be required for the correct folding of newly synthesized titin molecules and their integration into sarcomeres, as well as for the removal of misfolded titin molecules and other proteins. Thus, HSP90 proteostasis in skeletal muscles of the long-tailed ground squirrel can contribute to maintaining a steady-state level of titin and, possibly, other sarcomeric proteins during hibernation, which, in turn, will contribute to maintaining a highly ordered sarcomeric structure and the necessary level of muscle contractile activity in different phases of the torpor–arousal cycle.

Keywords: hibernation, long-tailed ground squirrel Urocyon undulatus, skeletal muscles, heat shock proteins, HSP90