

УДК 577.353.2

ИНГИБИРОВАНИЕ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ 4 И 5 УМЕНЬШАЕТ ПРОТЕОЛИЗ ТИТИНА И ПРЕДОТВРАЩАЕТ СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *TTN* ПРИ РАЗВИТИИ АТРОФИИ В *M. soleus* КРЫСЫ ПОСЛЕ СЕМИСУТОЧНОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2020 г. Ю. В. Грицына¹, А. Д. Уланова¹, С. С. Попова¹, А. Г. Бобылёв¹, В. К. Жалимов², Т. Л. Немировская³, Б. С. Шенкман³, И. М. Вихлянцев^{1,*}

Представлено академиком РАН О. И. Орловым

Поступило 22.07.2020 г.

После доработки 17.08.2020 г.

Принято к публикации 17.08.2020 г.

Исследовано влияние гистондеацетилаз 4 и 5 на развитие атрофии *m. soleus* крысы, а также на содержание в ней кальпаина-1, титина и уровень экспрессии его гена (*TTN*) при 7-суточной гравитационной разгрузке. Развитие индуцируемых гравитационной разгрузкой атрофических изменений в *m. soleus* крысы сопровождалось увеличением содержания кальпаина-1, повышением протеолиза титина и снижением содержания его мРНК. Ингибирование гистондеацетилаз 4 и 5 на фоне разгрузки не устраняло развитие атрофии, но в значительной мере предотвращало протеолиз и снижение экспрессии гена титина.

Ключевые слова: гравитационная разгрузка, скелетная мышца, титин, *TTN*

DOI: 10.31857/S2686738920060086

Известно, что пребывание в условиях гравитационной разгрузки приводит к атрофическим изменениям в антигравитационных мышцах, в частности, в *m. soleus* [1]. Развитие мышечной атрофии в этих условиях является следствием ингибирования белкового синтеза и повышения протеолиза [2, 3], в частности, гигантского белка титина (коннектина) [4]. Этот эластичный белок, образуя своеобразную молекулярную пружину, соединяющую концы миофибрилл с *Z*-диском саркомера, регулирует актин-миозиновое взаимодействие, участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и мышечной жесткости [5]. Повышенный протеолиз титина, сопровождающийся снижением его содержания, является следствием гиперактивации кальций-зависимых протеаз кальпаинов в усло-

виях гравитационной разгрузки [3, 6]. Показано, что значительное снижение содержания титина происходит только на седьмые сутки гравитационной разгрузки [4].

В последние годы обсуждается участие гистондеацетилаз (HDACs), в том числе HDAC 4 и HDAC 5, в развитии мышечной атрофии. У мышей с двойным нокаутом по HDAC4 и HDAC5 14-суточная денервация сопровождалась значительно меньшим снижением массы скелетных мышц голени, чем у контрольных мышей [7]. Применение ингибитора HDAC4 и HDAC5 трихостатина А снижало степень развития атрофических изменений в *m. soleus* крысы после 14-суточной гравитационной разгрузки [8]. Однако использование этого ингибитора на фоне 3-суточной гравитационной разгрузки не предотвращало развития атрофии *m. soleus* у крыс [9]. Таким образом, динамика воздействия HDACs 4/5 на мышечную атрофию при разгрузке остается непонятной.

В данной работе мы исследовали, как ингибирование HDAC4 и HDAC5 влияет на степень развития атрофии *m. soleus* и содержание титина после 7-суточной гравитационной разгрузки, когда протеолитические изменения в титине наиболее выражены.

Использовали самцов крыс Вистар (210 ± 10 г, виварий ИТЭБ РАН, Пушкино). Протокол № 24/2019

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пушкино Московской области, Россия

² Институт биофизики клетки Российской Академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ Российской академии наук, Пушкино Московской области, Россия

³ ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Таблица 1. Изменение массы животных, массы *m. soleus* и соотношения массы *m. soleus* и массы тела у крыс после 7-суточной гравитационной разгрузки ($n = 7$; $M \pm SD$)

Группа	Масса животного, г	Масса <i>m. soleus</i> , г	Масса <i>m. soleus</i> /масса тела, мг/г
1-я (контроль)	211.1 ± 8.8	0.082 ± 0.006	0.389 ± 0.020
2-я (вывешивание)	204.8 ± 6.9	0.060 ± 0.008**	0.293 ± 0.035**
3-я (вывешивание + ингибитор LMK235, 1 мг/кг)	201.1 ± 5.2	0.057 ± 0.013**	0.281 ± 0.062**

** $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

от 05 апреля 2019 г. комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН. Животные были распределены на три группы (по 7 крыс в каждой): 1-я – контрольная, 2-я – вывешивание в течение 7 суток; 3-я – вывешивание в течение 7 суток и внутривенное введение специфического ингибитора гистондеацетилаз 4 и 5 LMK235 (Sigma–Aldrich) [10] в концентрации 1 мг/кг в сутки. Ингибитор LMK235 растворяли в 2.5% ДМСО (Sigma–Aldrich) в физиологическом растворе и вводили в объеме 200 мкл. Животным 1-й и 2-й групп вводили идентичные объемы 2.5% ДМСО в физиологическом растворе. После эвтаназии крыс трибромэтанолом (240 мг/кг⁻¹ интраперитонеально, Sigma–Aldrich) камбаловидную мышцу (*m. soleus*) взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -75°C .

Обратную транскрипцию и ПЦР в режиме реального времени проводили по методу [11]. Использовали праймеры, специфичные к генам исследуемых белков (титину (*TTN*) и референсному гену *GAPDH*) [11], а также праймеры к гену кальпаина-1 (For: TGAGTGCTTATGAGATGAGG; Rev: GAGTAGCGGGTGATGATGAG). Экстракцию и ДСН-гель-электрофорез гигантского белка титина проводили по методу [4]. Экстракцию кальпаина-1 (основного фермента, протеолизующего титин) проводили по методу [12]. ДСН-гель-электрофорез кальпаина-1 и *GAPDH* (референсного белка) проводили в 10% разделяющем ПААГ, используя минисистему Bio-Rad Laboratories. Для проведения вестерн-блоттинга использовали следующие первичные антитела: к кальпаину-1 (1:1000, ab28258, Abcam) и *GAPDH* (1:1000, ab37168, Abcam). В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой (1:3000, ab6722, Abcam). Для визуализации белковых полос использовали раствор NBT/BCIP (Roche). Денситометрию проводили с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11 (Newcastle Upon Tyne). Статистический анализ проводили с помощью пакета SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc.). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD).

Проведенные ранее исследования показали, что гистондеацетилазы класса II (HDAC4 и HDAC5), активируясь в скелетных мышцах в ответ на денервацию, подавляют активность Dach2, который является негативным регулятором миогенина [7]. Миогенин, в свою очередь, активирует атрогин-1- и MuRF1 – E3 убиквитинлигазы, которые являются частью системы убиквитино-опосредованного распада белка в протеасомах. Активация этих ферментов наблюдается в скелетных мышцах при развитии атрофии не только в ответ на денервацию [7], но и в условиях гравитационной разгрузки [13]. При этом увеличивается содержание кальпаина-1 и наблюдается его гиперактивация [3, 6], что вносит существенный вклад в развитие мышечной атрофии за счет повышенного протеолиза белков саркомерного цитоскелета, в частности, титина.

Мы предположили, что ингибирование HDACs 4 и 5 в *m. soleus* крысы на фоне 7-суточной гравитационной разгрузки должно предотвратить увеличение содержания кальпаина-1, повышенный протеолиз титина и привести к уменьшению уровня развития атрофии. Поскольку HDACs рассматриваются как основные транскрипционные репрессоры, мы предположили, что их ингибирование должно привести к увеличению экспрессии гена *TTN*.

Различий в массе тела крыс трех групп мы не выявили (табл. 1). Снижение массы *m. soleus* (на 26.8% и 30.5%, $p < 0.01$) и индекса “масса *m. soleus*/масса тела животного” (на 24.7% и 27.8%, $p < 0.01$) мы обнаружили во второй и третьей группах, соответственно, относительно контроля (табл. 1).

Эти данные свидетельствуют об одинаковом уровне развития атрофических изменений в *m. soleus* крыс второй и третьей групп. Таким образом, наше предположение, что ингибирование HDACs 4 и 5 должно привести к уменьшению уровня развития атрофии *m. soleus* на 7 суток разгрузки, не подтвердилось. Однако нашли подтверждение другим нашим предположениям. В группе с ингибированием HDACs 4/5 содержание кальпаина-1 не отличалось от такового в контрольной группе, в то время как в *m. soleus* крыс, вывешенных без ингибитора, содержание этого фермента было су-

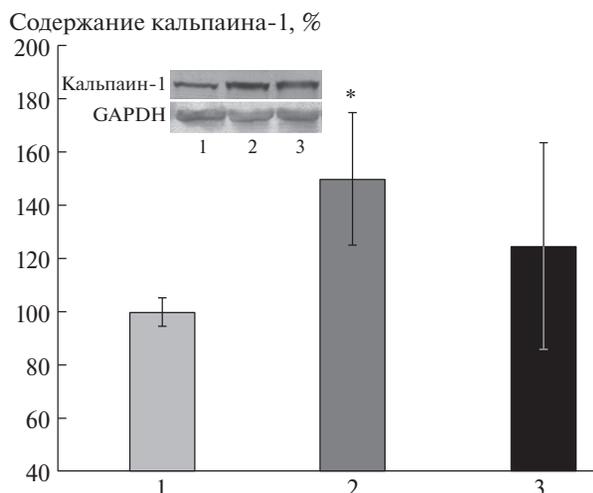


Рис. 1. Содержание кальпаина-1 в *m. soleus*. 1 – контроль, 2 – вывешивание 7 суток, 3 – вывешивание 7 суток + ингибитор LMK235 (1 мг/кг). * $p < 0.05$ по сравнению с группой 1. Статистически значимых различий в содержании мРНК кальпаина-1 в *m. soleus* трех исследуемых групп крыс не выявлено (данные не показаны).

щественно выше ($p < 0.05$, рис. 1). Кальций-активируемая протеаза кальпаин-1 является основным ферментом протеолизирующим титин [12]. Показано, что развитие мышечной атрофии в условиях гравитационной разгрузки сопровождается увеличением содержания кальпаина-1 [3], а также повышением активности этой протеазы уже в первые сутки разгрузки [6]. Таким образом, повышенный протеолиз титина кальпаином-1 можно назвать одним из молекулярных триггеров мышечной атрофии, индуцируемой гравитационной разгрузкой. Несомненно, что уменьшение содержания или активности этой протеазы будет способствовать снижению протеолиза титина и других саркомерных белков. Наши результаты согласуются с этим утверждением.

На рис. 2а,б представлены данные об изменении содержания титина в *m. soleus* вывешенных крыс. Снижение в 1.62 раза ($p < 0.01$) содержания интактных молекул титина (Т1) и увеличение в 2.1 раза ($p < 0.01$) содержания протеолитических

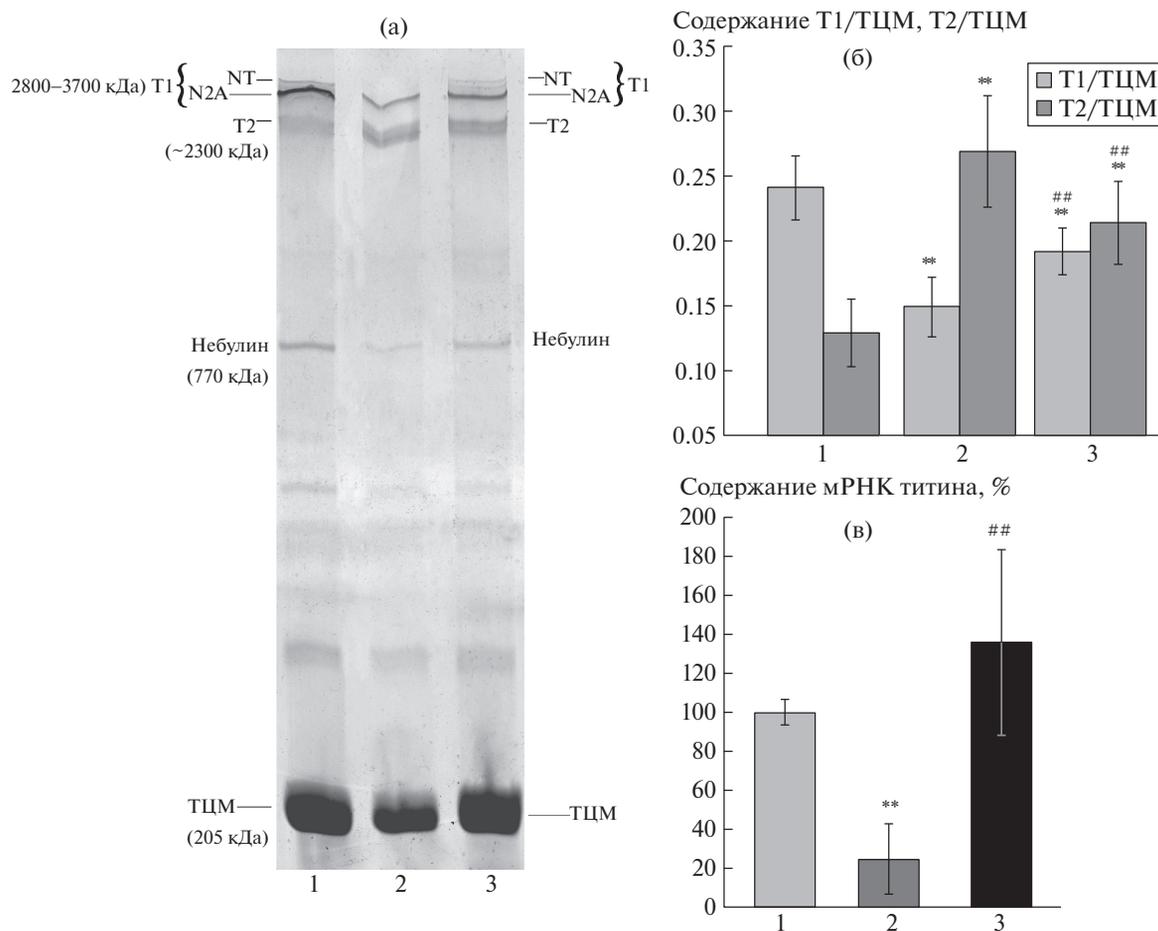


Рис. 2. Содержание титина (а,б) и экспрессия гена титина (в) в *m. soleus*. На электрофореграмме титина (а) указаны полосы тяжелых цепей миозина (ТЦМ), небулина, протеолитических Т2-фрагментов титина и изоформ Т1. Молекулярные массы мышечных белков указаны в соответствии с данными, полученными в работе [4]. 1 – контроль, 2 – вывешивание 7 суток, 3 – вывешивание 7 суток + ингибитор LMK235 (1 мг/кг). ** $p < 0.01$ по сравнению с группой 1; ## $p < 0.01$ по сравнению с группой 2.

T2-фрагментов наблюдалось в атрофированной камбаловидной мышце крыс второй группы (рис. 2а, 2б, в сравнении с контролем). В третьей группе животных мы обнаружили существенное снижение протеолиза T1. В частности, содержание интактного T1 было выше (в 1.29 раза, $p < 0.01$), а содержание T2-фрагментов было ниже (в 1.26 раза, $p < 0.01$) в *m. soleus* крыс третьей группы в сравнении с группой 2 (рис. 2а, 2б). Снижение протеолиза титина в третьей группе может быть связано с отсутствием статистически значимого увеличения содержания кальпаина-1 (рис. 1).

Свой вклад в снижение содержания T1 в *m. soleus* крыс второй группы могло внести и значительное уменьшение (в 4.0 раза, $p < 0.01$) экспрессии гена титина (рис. 2в). В то же время в группе 3 (с ингибированием HDACs4/5) такого снижения не было (рис. 2в).

ВЫВОД

Развитие атрофических изменений в *m. soleus* крысы после семисуточной гравитационной разгрузки сопровождалось увеличением содержания кальпаина-1, повышением протеолиза титина и снижением экспрессии гена TTN. Ингибирование гистондеацетилаз 4 и 5 на фоне разгрузки не устраняло развитие атрофии, но предотвращало увеличение содержания кальпаина-1, повышенный протеолиз титина и снижение содержания мРНК этого белка.

Учитывая данные о том, что ингибирование HDACs 4/5 предотвращало мышечную атрофию, вызванную 14-суточной гравитационной разгрузкой [8], но не предотвращало атрофию, вызванную 3-суточной [9] и 7-суточной (табл. 1) гравитационной разгрузкой, можно предположить, что эти ферменты вносят меньший вклад в развитие атрофии по сравнению с другими гистондеацетилазами, например, HDAC 1 [11].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 18-15-00062 с использованием оборудования регионального пушинского центра коллективного пользования “Структурно-функциональные исследования биосистем” Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mirzoev T.M., Shenkman B.S.* Regulation of Protein Synthesis in Inactivated Skeletal Muscle: Signal Inputs, Protein Kinase Cascades, and Ribosome Biogenesis // *Biochemistry (Mosc)*. 2018. V. 83. № 11. P. 1299–1317. <https://doi.org/10.1134/S0006297918110020>

2. *Bodine S.C.* Disuse-induced muscle wasting // *Int. J. Biochem Cell Biol*. 2013. V. 45. № 10. P. 2200–2208. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.011>
3. *Shenkman B.S., Belova S.P., Lomonosova Yu.N., et al.* Calpain-dependent Regulation of the Skeletal Muscle Atrophy Following Unloading // *Arch Biochem. Biophys*. 2015. V. 584. P. 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.011>
4. *Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A.* New Titin (Connectin) Isoforms and Their Functional Role in Striated Muscles of Mammals: Facts and Suppositions // *Biochemistry (Mosc)*. 2012. V. 77. № 13. P. 1515–1535. <https://doi.org/10.1134/S0006297912130093>
5. *Mijailovich S.M., Stojanovic B., Nedic D., et al.* Nebulin and Titin Modulate Cross-Bridge Cycling and Length-Dependent Calcium Sensitivity // *J. Gen. Physiol*. 2019. V. 151. № 5. P. 680–704. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812165>
6. *Enns D.L., Raastad T., Ugelstad I., et al.* Calpain/calpastatin Activities and Substrate Depletion Patterns During Hindlimb Unweighting and Reweighting in Skeletal Muscle // *Eur. J. Appl. Physiol*. 2007. V. 100. № 4. P. 445–455. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0445-4>
7. *Moresi V., Williams A.H., Meadows E., et al.* Myogenin and Class II HDACs Control Neurogenic Muscle Atrophy by Inducing E3 Ubiquitin Ligases // *Cell*. 2010. V. 143. № 1. P. 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.004>
8. *Dupré-Aucouturier S., Castells J., Freyssen D., et al.* Trichostatin A, a Histone Deacetylase Inhibitor, Modulates Unloaded-Induced Skeletal Muscle Atrophy // *J. Appl Physiol* (1985). 2015. V. 119. № 4. P. 342–351. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01031.2014>
9. *Belova S.P., Mochalova E.P., Nemirovskaya T.L.* The Role of Class IIa HDACs in the Expression of E3 Ligases ATROGIN-1/MAFbx and MuRF1 under Muscle Unloading // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2020. V. 14. № 1. P. 74–80.
10. *Marek L., Hamacher A., Hansen F.K., et al.* Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors With a Novel Connecting Unit Linker Region Reveal a Selectivity Profile for HDAC4 and HDAC5 With Improved Activity Against Chemoresistant Cancer Cells // *J. Med. Chem*. 2013. V. 56. № 2. P. 427–436. <https://doi.org/10.1021/jm301254q>
11. *Уланова А.Д., Грицына Ю.В., Бобылёв А.Г., и др.* Ингибирование гистондеацетилазы-1 предотвращает снижение содержания титина (коннектина) и развитие атрофии в *m. soleus* крысы после трехсуточной гравитационной разгрузки // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020. Т. 169. № 4. С. 431–438.
12. *Murphy R.M., Snow R.J., Lamb G.D.* mu-Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2006. V. 290. № 1. P. C116–C122.
13. *Belova S.P., Shenkman B.S., Kostrominova T.Y., et al.* Paradoxical Effect of IKKβ Inhibition on the Expression of E3 Ubiquitin Ligases and Unloading-Induced Skeletal Muscle Atrophy // *Physiol. Rep*. 2017. V. 5 (16): e13291. <https://doi.org/10.14814/phy2.13291>

**INHIBITION OF HISTONE DEACETYLASE 4 AND 5 REDUCES TITIN
PROTEOLYSIS AND PREVENTS REDUCTION OF *TTN* GENE EXPRESSION
IN ATROPHIED RAT *Soleus muscle* AFTER SEVEN-DAY
HINDLIMB UNLOADING**

**Yu. V. Gritsyna^a, A. D. Ulanova^a, S. S. Popova^a, A. G. Bobylev^a, V. K. Zhalimov^b,
T. L. Nemirovskaya^c, B. S. Shenkman^c, and I.M. Vikhlyantsev^{a,#}**

^a *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

^b *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

^c *Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

Presented by academician of the RAS O. I. Orlov

The effect of HDACs 4 and 5 on the level of atrophy, calpain-1 and titin content and *TTN* gene expression in rat soleus after 7-day gravitational unloading (hindlimb suspension model) was studied. The development of atrophic changes induced by gravitational unloading in rat soleus was accompanied by an increase in calpain-1 content, an increase in titin proteolysis and a decrease in mRNA content of the protein. Inhibition of HDACs 4 and 5 did not eliminate the development of unloading-induced atrophy, but significantly prevented proteolysis of titin and decrease in *TTN* gene expression.

Keywords: gravitational unloading, skeletal muscle, titin, *TTN*