

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТИТИНА В ИЗМЕНЕНИИ ЖЕСТКОСТИ МИОКАРДА ПРИ КАРДИОМИОПАТИЯХ

© 2024 г. Г. З. Михайлова¹, И. М. Вихлянцев^{1, *}, В. Л. Лакомкин²

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,
Московская обл., Россия*

²*Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова
Минздрава РФ, Москва, Россия*

**E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

Поступила в редакцию 18.01.2024 г.

После доработки 09.02.2024 г.

Принята к публикации 18.02.2024 г.

В обзоре представлен краткий анализ современных знаний о такой посттрансляционной модификации титина как фосфорилирование, с акцентом на изменения, происходящие при развитии сердечных заболеваний. Исследования, проведенные с использованием животных моделей заболеваний сердца, а также с использованием биоматериала сердечной ткани пациентов с различными патологиями, показывают изменения уровня фосфорилирования титина. При развитии патологических изменений наблюдается, как правило, гиперфосфорилирование сайта S11878 и гипофосфорилирование сайта S12022 в PEVK-последовательности титина, а также изменения уровня фосфорилирования сайтов в N2B-последовательности этого белка. Функциональным суммарным эффектом этих изменений является увеличение жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом, в основе которой лежат вязкоупругие свойства титина, изменение которых, в свою очередь, наблюдается вследствие гипо- или гиперфосфорилирования определенных сайтов этого белка. В обзоре представлено описание ряда терапевтических воздействий, способствующих изменению уровня фосфорилирования титина, которые рассматриваются как способ изменения вязкоупругих свойств патологического миокарда с целью нормализации его сократительной способности.

Ключевые слова: сердечная мышца, титин, фосфорилирование, кардиомиопатии

DOI: 10.31857/S0869813924030042, **EDN:** CPYIMK

ВВЕДЕНИЕ

Исследования механизмов адаптации сердечной ткани и скорости изменений функционирования сердца в процессе индивидуального развития, при старении, а также при развитии дисфункций остаются актуальными и на сегодняшний день. В этой области науки многие нюансы остаются до конца не изученными. Например, сложны для изучения, особенно *in vivo*, механизмы сигнальных путей сердечной механотрансдукции, которые взаимосвязаны с процессами увеличения наполнения и давления желудочков [1]. Сигналы гемодинамической (механической) нагрузки, передаваемые через стенки сердца, воспринимаются миоцитами, которые реагируют изменениями сокра-

тительной способности и экспрессии генов. Нарушение хорошо сбалансированного механизма восприятия гемодинамической нагрузки вызывает нарушения регуляции, ремоделирование сердца и сердечную недостаточность. Узловые точки механочувствительности в кардиомиоцитах могут располагаться в областях Z-диска, I-зоны и M-линии саркомеров. Продольное соединение/объединение этих областей обеспечивается гигантским эластичным механочувствительным белком титином (в русскоязычной научной литературе используется также название тайтин) [2, 3] (рис. 1). Молекула титина вследствие гигантских размеров и расположения во всех зонах саркомера (рис. 1) становится уязвима при развитии сердечно-сосудистых заболеваний: сердечной недостаточности, диастолической дисфункции левого желудочка (в том числе вызванной сахарным диабетом), аортального стеноза, ишемического повреждения, а также наследственных кардиомиопатий с патогенными вариантами гена титина [4, 5]. Эластичные свойства молекул титина вносят вклад в модуляцию жесткости миокарда. Одним из важных молекулярных механизмов регулирования вязкоупругих свойств титина и вследствие этого жесткости саркомеров и мышцы в целом является изменение изоформного состава этого белка, что обеспечивает необходимый уровень пассивной жесткости его молекул в течение длительного периода. Известно, что изменения изоформного состава титина наблюдаются при патологических состояниях, например, при развитии терминальной стадии сердечной недостаточности у человека. Однако сердцу также необходим более быстрый и точный контроль над жесткостью молекул титина и мышцы в целом. Этого можно добиться за счет посттрансляционных модификаций титина, в частности, фосфорилирования определенных участков его молекулы. Цель нашего обзора – проанализировать, как свойства титина могут быть изменены посредством его фосфорилирования с акцентом на изменения вязкоупругих свойств молекул этого белка при развитии/лечении заболеваний сердца.

*История исследования фосфорилирования титина *in vitro* и *in vivo**

Исследования фосфорилирования последовательностей молекулы титина, расположенных в А-зоне и М-линии саркомера

В 1987 г. впервые было показано, что титин фосфорилируется *in vivo* [6]. Так, через трое суток после инъекции радиоактивного неорганического фосфата в дорсальные лимфатические мешки гладкой шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) очищенные препараты титина икроножной мышцы содержали от 0.92 до 1.7 моля радиоактивного фосфосерина на 1 моль титина. Авторы также показали, что очищенные препараты титина, выделенные из скелетных мышц лягушки, содержали от 5 до 6 молей связанного неорганического фосфата на 1 моль белка [6]. В 1988 г. были получены аналогичные данные для титина диафрагмальной мышцы мыши [7]. После пятичасовой инкубации диафрагмы мыши в растворе, содержащем радиоактивный неорганический фосфат, обнаружено, что 1 моль титина содержал 2 моля радиоактивного фосфосерина. При этом очищенные препараты титина диафрагмальной мышцы мыши содержали около 12 молей неорганического фосфата на 1 моль белка [7].

В 1992 г. была обнаружена способность бета-коннектина (протеолитического T2-фрагмента титина с м. м. ~ 2.2 МДа, взаимодействующего с миозиновыми нитями в А-зоне саркомера, см. рис. 1), выделенного из скелетной мышцы курицы, аутофосфорилироваться *in vitro* в присутствии [гамма- 32 P]-АТФ [8]. При этом такие киназы, как киназа легкой цепи миозина, цАМФ-зависимая протеинкиназа А (РКА) и протеинкиназа С (РКС), не фосфорилировали бета-коннектин *in vitro* в вышеуказанных условиях. Позднее Yamasaki и соавт. выявили способность титина к фосфорилированию после 24-часовой инкубации скинированных (лишенных мембраны) кардиомиоцитов крысы в растворе, содержащем [гамма- 32 P]-АТФ и протеинкиназу А [9]. Авторы подсчитали, что 1 моль титина содержал 0.85–0.89 моля неорганического радиоактивного фосфата.

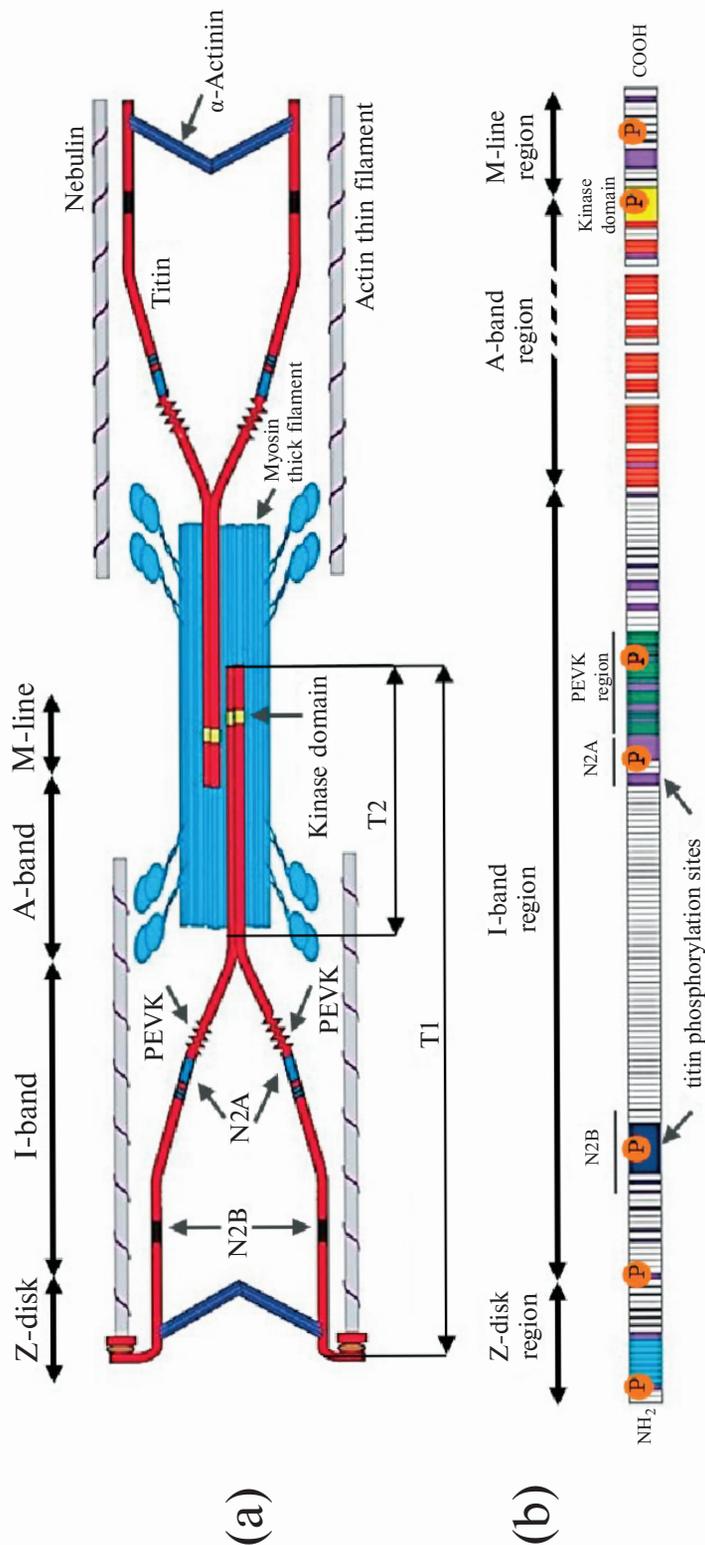


Рис. 1. Схема расположения титина в саркомере и его доменная структура.

(a) – схематическое изображение расположения молекул титина в саркомере. Полноразмерные молекулы титина, перекрывающие расстояние от M-линии до Z-диска в саркомерах поперечно-полосатых мышц позвоночных. Часть молекул титина, расположенная в A-зоне, получила название T2. На каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится, предположительно, по шесть полноразмерных молекул титина. Указаны домены титина (N2B, N2A, PEVK, Kinase domain), а также участки фосфорилирования молекул титина, расположенные в M-линии, I-зоне и Z-диске. Адаптировано из [3].

Таким образом, эти авторы впервые показали, что бета-адренергическая стимуляция посредством протеинкиназы А приводит к фосфорилированию титина в сердечной мышце млекопитающих [9].

В 1992 г. Labeit и соавт. выделили кДНК, кодирующие эпитопы части молекулы титина, расположенной в А-зоне саркомера, а также определили 30 т. п. н. (1000 кДа) первичной структуры титина [10]. Первое, на что обратили внимание эти авторы, было наличие каталитического домена серин/треониновой протеинкиназы, расположенного вблизи С-конца молекулы титина в М-линии саркомера [10]. Функция киназного домена титина некоторое время была не ясна. Впоследствии было сделано предположение о роли киназного домена титина [11], а также способных к фосфорилированию KSP-последовательностей, расположенных в С-концевой части молекулы титина в М-зоне саркомера [12], в миофибриллогенезе. Результаты, полученные в 2006 г. Musa и соавт. [13], подтвердили правильность высказанного предположения. С использованием линии эмбриональных стволовых клеток мыши было показано, что делеция участка гена титина (*TTN*), кодирующего М-область его молекулы, включающую и киназный домен, предотвращает формирование саркомеров на ранних стадиях миофибриллогенеза [13]. Роль киназного домена титина в зрелых поперечнополосатых мышцах заключается в регуляции экспрессии мышечных генов и белкового обмена в саркомерах [14, 15], а также в регуляции сократительной функции мышцы [16]. В частности, в статье [16] авторы разработали нокаут, с помощью которого можно индуцировать экспрессию титина с дефицитом М-линии у взрослых мышей, и исследовали роль киназного домена титина в функционировании сердечной мышцы. Эксперименты на изолированном сердце показали, что у нокаутных мышей сократительный ответ на бета-адренергические агонисты и внеклеточный кальций снижается. В частности, было обнаружено снижение скорости поглощения кальция, что могло быть связано с уменьшением содержания кальмодулина, фосфоламбана и SERCA2. В конечном итоге у нокаутных мышей развивалась гипертрофия сердца и сердечная недостаточность, которая, по мнению авторов, была связана с активацией сигнального пути протеинкиназы С, но не митоген-активируемых протеинкиназ. Авторы заключили, что киназный домен титина выступает в качестве регулятора сократительной функции сердечной мышцы за счет изменения кальциевого гомеостаза и активности протеинкиназ.

Исследования фосфорилирования последовательностей N-концевой части молекулы титина, расположенной в Z-диске саркомера

Первые данные о последовательности N-концевой части молекулы титина были получены Sebestyén и соавт. в 1995 г. [17]. Авторы, используя тотальную мРНК, выделенную из сердечной мышцы кролика, получили кДНК с целью определения последовательности, кодирующей N-концевую часть молекулы титина. Для идентификации соответствующих клонов авторы использовали моноклональные антитела (Т12), связывающиеся с частью молекулы титина, расположенной вблизи Z-диска саркомера. Была получена последовательность размером 5,4 т. п. н. [17]. Кодированный полипептид проявлял способность к ERK1-зависимому фосфорилированию *in vitro*. Впоследствии в N-концевой части молекулы титина были идентифицированы сайты, богатые серином/пролином, которые фосфорилировались *in vitro* с помощью ERK-киназы и циклин-зависимой протеинкиназы-2 (CDC2) [18]. Анализ N-концевой последовательности титина выявил наличие «Z-повторов», содержащих 45 аминокислотных остатков. Поскольку количество «Z-повторов» титина варьирует в разных типах мышц, авторы [17] высказали предположение о роли фосфорилирования сайтов N-концевой части молекулы титина в сборке Z-дисков различной толщины и механической прочности.

Исследования фосфорилирования последовательностей молекулы титина, расположенных в I-диске саркомера

Растяжимая часть молекулы титина, расположенная в I-зоне саркомера, имеет молекулярную массу от ~0.8 до ~1.5 МДа в зависимости от изоформ титина и их изовариантов [19]. Эта часть молекулы титина состоит из растяжимых в разной степени эластичных последовательностей: проксимальной и дистальной областей иммуноглобулин-подобных доменов, а также уникальных последовательностей N2A, N2B и PEVK [20] (рис. 1). Альтернативный сплайсинг I-области титина, определяющий размеры PEVK-последовательности и последовательностей иммуноглобулин-подобных доменов, является основой разнообразия изоформ титина и их изовариантов. К настоящему времени известно, что в разных отделах сердца взрослых животных и человека экспрессируются две основные изоформы титина: короткая N2B-изоформа с молекулярной массой 2970 кДа и длинная N2BA-изоформа с молекулярными массами ее вариантов от 3200 до 3350 кДа [21, 22]. Более длинная (менее жесткая) N2BA-изоформа содержит N2A и N2B уникальные последовательности, тогда как более короткая (более жесткая) N2B-изоформа содержит соответственно только N2B-уникальную последовательность [21–24]. Изоварианты N2BA-изоформы титина имеют также более длинную PEVK-последовательность и большее количество растяжимых иммуноглобулин-подобных доменов [21, 22]. Функционирование описанных растяжимых элементов определяет титин как молекулярную пружину, развивающую вязкоупругое напряжение при растяжении саркомера («пассивное напряжение») [25–28] и развивающую «возвратную силу» при сокращении/сжатии саркомера [29]. Впоследствии было установлено, что содержание более эластичной N2BA- и более жесткой N2B-изоформ титина различается в разных отделах сердца у млекопитающих, включая человека [24, 30–34]. Постепенно складывалось представление о том, что неодинаковое содержание N2BA- и N2B-изоформ титина и вследствие этого их разное соотношение в миокарде – это важная молекулярная детерминанта, определяющая различия жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом.

Научная парадигма, сложившаяся в конце XX века и связывающая вязкоупругие свойства титиновых молекул с жесткостью сердечной мышцы, получила развитие в XXI веке. Было высказано предположение, что изменения вязкоупругих свойств молекул титина могут происходить вследствие фосфорилирования/дефосфорилирования этого белка, что, в свою очередь, будет иметь последствия для диастолического наполнения и последующей систолической функции сердца через механизм, известный как закон Франка – Старлинга [35]. В связи с этим последовал цикл работ, связанных с фосфорилированием титина и влиянием этой посттрансляционной модификации на жесткость сердечной ткани.

Как упоминалось выше, в 2002 г. Yamasaki и соавт. показали, что фосфорилирование титина в скинированных кардиомиоцитах крысы наблюдалось после бета-адренергической стимуляции, активирующей протеинкиназу A [9]. При этом авторы обнаружили фосфорилирование только интактных молекул титина-1 (T1), тогда как протеолитические T2-фрагменты титина не подвергались фосфорилированию. Значимость этой работы в то время была велика, поскольку методически было очень трудно оценить фосфорилирование титина вследствие его гигантских размеров, а также вследствие высокой деградации этого белка. Кроме того, авторами был получен еще один важный результат: опосредованное протеинкиназой A фосфорилирование титина значительно снижало пассивное напряжение, развиваемое изолированными кардиомиоцитами в ответ на их растяжение [9]. Эксперименты по фосфорилированию *in vitro* рекомбинантных фрагментов титина совместно с данными, полученными методом иммуноэлектронной микроскопии, позволили Yamasaki и соавт. сделать заключение, что протеинкиназа A фосфорилирует N2B-последовательность титина.

В 2005 г. Fukuda и соавт. [35] исследовали влияние опосредованного протеинкиназой А фосфорилирования титина на изменение уровня пассивного напряжения скинированных препаратов сердечной ткани разных животных, имеющих различное N2BA/N2B соотношение. Обнаружено, что увеличение уровня фосфорилирования титина сопровождалось уменьшением уровня пассивного напряжения. Это уменьшение было более выражено в сердечной ткани с повышенным содержанием более жесткой (короткой) N2B-изоформы титина [35]. Авторы предположили, что опосредованное протеинкиназой А фосфорилирование титина способствует увеличению эластичности молекул титина, что, в свою очередь, способствует наполнению желудочков сердца за счет снижения жесткости их стенок. Позднее эти результаты, полученные на сердечной мышце крысы и крупного рогатого скота [9, 35], подтвердились и на сердечной мышце человека [36]. Авторы [36] также предположили, что базальный уровень фосфорилирования титина в интактных мышцах, по-видимому, играет некую роль в определении уровня пассивного напряжения в норме [36]. Подобное предположение было высказано авторами на основании полученных ими данных, свидетельствующих о том, что если до обработки протеинкиназой А проводить дефосфорилирование миофиламентов протеинфосфатазой 1, то последующее фосфорилирование титина было более значительным.

Впоследствии были открыты сайты фосфорилирования в уникальной N2B-последовательности (N2Bus) титина. Так, S4185 является первым подтвержденным сайтом N2B-последовательности, фосфорилирование которого было опосредовано как протеинкиназой А, так и протеинкиназой G [37]. Было изучено влияние протеинкиназы G (PKG) на изменение уровня пассивного напряжения скинированных волокон донорских сердец и обнаружено значительное снижение этого уровня после обработки вышеуказанных мышечных образцов протеинфосфатазой 1. Данные *in vitro*, полученные на отдельных молекулах титина, показали, что фосфорилирование протеинкиназой G увеличивает изгибную жесткость N2B-последовательности, что согласуется с данными об уменьшении уровня пассивного напряжения скинированных волокон [37]. Таким образом, Krüger и соавт. показали, что опосредованное протеинкиназой G фосфорилирование титина сопровождается уменьшением жесткости скинированных волокон сердечной мышцы человека [37].

В 2013 г. Kötter и соавт. создали рекомбинантные конструкции N2B-последовательности титина человека, крысы и собаки и проанализировали их фосфорилирование протеинкиназами А и G [38]. Было идентифицировано семь сайтов фосфорилирования в N2B-последовательности титина человека и крысы [38]. При этом было показано, что часть сайтов (S4010, T4065, S4065) фосфорилируется только протеинкиназой А, сайт S4092/S4099 – только протеинкиназой G. Сайты S3744 и S4185 фосфорилируются обеими протеинкиназами [38]. Сайт S4010 подвергается фосфорилированию также и ERK2-киназой [39]. Было высказано предположение, что это фосфорилирование на основе ERK2 снижает уровень пассивного напряжения, развиваемого молекулами титина при их растяжении. При этом авторы показали, что киназа ERK2 может фосфорилировать и другие сайты в N2B-последовательности титина (S3873, S3915 и S3965). Известны также данные о фосфорилировании сайта S4062 кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II (CaMKII δ) [40]. Фосфорилирование всех вышеуказанных сайтов в N2B-последовательности молекул титина сопровождалось уменьшением уровня пассивного напряжения кардиомиоцитов при их растяжении [37, 41].

Одной из важных киназ, участвующих в процессе фосфорилирования PEVK-последовательности титина, является PKC α – преобладающая изоформа протеинкиназы С, экспрессируемая в сердце животных и человека, играющая важную роль в функционировании миофиламентов, а также в развитии сократительной дисфункции и прогрессировании сердечной недостаточности [42]. Было показано, что фосфорилирование PEVK-последовательности титина протеинкиназой С сопровождается увеличением

уровня пассивного напряжения, развиваемого кардиомиоцитами при их растяжении [43]. Авторы, используя масс-спектрометрию в сочетании с сайт-направленным мутагенезом, выявили два сайта в области PEVK-последовательности сердечной N2B-изоформы, которые фосфорилируются РКСа (S11878 и S12022, или S26 и S170); при этом показано, что, когда эти два сайта мутируют на аланин, фосфорилирование эффективно прекращается [43]. Связь между РКСа, фосфорилированием PEVK-последовательности титина и пассивным напряжением была исследована и в работе других авторов [44]. Они показали, что РКСа-опосредованное фосфорилирование не влияло на уровень пассивного напряжения в кардиомиоцитах мышей, у которых были генетически удалены сайты PEVK-последовательности титина [44]. Таким образом, данные, полученные в работах [43, 44], указывают на то, что опосредованное протеинкиназой С фосфорилирование PEVK-последовательности титина приводит к увеличению жесткости молекул этого белка и вследствие этого к увеличению жесткости кардиомиоцитов.

В PEVK-последовательности титина обнаружены сайты, которые подвергаются фосфорилированию кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II (CaMKII δ), а также протеинкиназой D [45, 46]. И если вклад опосредованного протеинкиназой D фосфорилирования титина обсуждается в контексте уменьшения уровня пассивного напряжения, то роль фосфорилирования PEVK-последовательности титина кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II до конца не ясна. В 2013 г. Hidalgo и соавт. обнаружили, что в присутствии CaMKII δ , Ca²⁺/кальмодулина и [γ -³²P]-АТФ наблюдалось фосфорилирование титина в скинированных волокнах левого желудочка сердца мыши [45]. Было обнаружено, что эта киназа фосфорилирует как N2B-, так и PEVK-последовательности титина [40, 45]. Методом масс-спектрометрии [45] было выявлено пять сайтов фосфорилирования в PEVK-последовательности титина, распределенные более или менее равномерно по всей ее длине (S26, T70, T80, T117 и S170), из которых только S26 и S170 были высококонсервативны. Интересно, что мутация сайтов S26 и S170 одновременно устраняла ~75% включения неорганического фосфата. Именно эти два сайта с высокой степенью достоверности подвергаются фосфорилированию протеинкиназой РКСа [43] и кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II [40, 45]. Вполне вероятно, что и CaMKII δ , и РКСа могут фосфорилировать эти сайты титина. Теоретически совместное фосфорилирование обоих этих сайтов титина может не вызвать изменения уровня пассивного напряжения, поскольку механические эффекты способны нейтрализовать друг друга. Однако показано, что CaMKII-опосредованное фосфорилирование титина сопровождалось уменьшением уровня пассивного напряжения (в основе которого лежат вязкоупругие свойства титиновых молекул) при растяжении кардиомиоцитов [40, 41]. Кроме того, известны данные, что уровень пассивного напряжения был выше в кардиомиоцитах мышей с двойным нокаутом CaMKII δ / γ и ниже – в сердце у трансгенных мышей со сверхэкспрессией CaMKII δ по сравнению с кардиомиоцитами мышей дикого типа. Принимая во внимание вышесказанное, можно полагать, что CaMKII-опосредованное фосфорилирование N2B- и PEVK-последовательностей титина сопровождается уменьшением жесткости молекул этого белка и вносит вклад в уменьшение жесткости кардиомиоцитов и сердечной ткани в целом.

В связи с вышесказанным необходимо обратить внимание на следующее. Нельзя исключить, что сродство CaMKII δ может быть разным к N2B- и PEVK-последовательностям титина. Вполне вероятно, что в растянутом саркомере сайты N2B-последовательности могут быть более доступными для фосфорилирования CaMKII δ , чем, например, сайты PEVK-последовательности. В подтверждение этих слов можно привести следующие данные. Недавно показано, что CaMKII δ может фосфорилировать иммуноглобулин-подобные домены титина, расположенные в I-части его молекулы, при этом фосфорилируются они только после их разворачивания вследствие окисления [47]. Таким образом, подходит к интерпретации описанных выше результатов о роли

фосфорилирования титина в изменении вязкоупругих свойств его молекул необходимо с некой осторожностью. Необходимо также учитывать, что возможно существование достаточно большого количества еще не открытых потенциальных сайтов фосфорилирования титина, функциональное значение которых еще предстоит выяснить.

ИССЛЕДОВАНИЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ТИТИНА ПРИ СЕРДЕЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Фосфорилирование титина является наиболее изученной посттрансляционной модификацией титина, регулирующей не только жесткость его молекул, но и вследствие этого объем фракции сердечного выброса (изгнания) как при нормальной работе сердца, так и при сердечной патологии. Особенно это касается тех пациентов, у которых сохраняется систолическая функция и объем фракции выброса левого желудочка, но наблюдается диастолическая дисфункция, а именно: замедленное расслабление и повышенное диастолическое давление в левом желудочке. Установлено, что в основе этого явления лежит феномен эластической отдачи, который может быть объяснен наличием так называемой «возвратной силы», которая отодвигает концы миозиновых нитей от Z-линии. Титин и, в частности, наиболее вязкоупругая часть его молекулы – N2B-последовательность играют главную роль как в создании пассивного напряжения в покое (т. е. при низкой концентрации Ca^{2+}), так и в развитии «возвратной силы» в систоло-диастолическом переходе, что неоднократно было подтверждено в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на животных [29, 48, 49]. Впоследствии были обнаружены и клинические корреляции, подтверждающие, что изменения изоформного состава титина (соотношения N2BA- и N2B-изоформ) имеют отношение как к диастолической, так и к систолической дисфункции левого желудочка у пациентов с сердечной недостаточностью, возникшей в результате неишемической дилатационной кардиомиопатии [50].

Первые сведения об уровне пассивного напряжения и фосфорилировании титина протеинкиназой A в кардиомиоцитах пациентов с сердечной патологией

Надо отметить, что вплоть до 2002 г. исследователи получали противоречивые данные о жесткости патологического миокарда человека и животных. В частности, работы того времени на животных моделях дилатационной кардиомиопатии [51] и на моделях перегрузки давлением [31] демонстрировали увеличение жесткости миокарда. В то же время было выявлено снижение уровня пассивного напряжения в саркомерах сердечной мышцы пациентов с ишемической болезнью сердца с высоким конечно-диастолическим давлением левого желудочка [30]. Дело осложнялось еще разнообразием форм кардиомиопатий и отсутствием большого количества биоптатов. В 2004 г. Nagueh и соавт. впервые получили данные, свидетельствующие о корреляции между соотношением N2BA- и N2B-изоформ титина и параметрами наполнения камеры левого желудочка сердца пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности, возникшей в результате развития неишемической дилатационной кардиомиопатии [50]. В частности, авторы обнаружили прямую корреляцию между увеличением доли более эластичной N2BA-изоформы титина и уменьшением жесткости препаратов миокарда левого желудочка сердца пациентов. Эти изменения наблюдались на фоне увеличения конечного диастолического объема и уменьшения конечного систолического объема и фракции выброса сердечной мышцы пациентов. Авторы сделали заключение, что повышенная экспрессия N2BA-изоформы титина может отрицательно влиять на систолическую функцию, способствуя уменьшению конечного систолического объема и фракции выброса, но улучшать диастолическую функцию, способствуя увеличению эластичности миокарда.

Первые работы по исследованию взаимосвязи жесткости миокарда и ее коррекции с помощью изменения уровня фосфорилирования титина у пациентов с систолической и диастолической дисфункциями были проведены около 20 лет назад [51–53]. Van Heerebeek и соавт. пришли к выводу, что пассивное напряжение, обусловленное вязкоупругими свойствами молекул титина, в кардиомиоцитах пациентов с систолической дисфункцией значительно менее чувствительно к обработке протеинкиназой А, чем в кардиомиоцитах пациентов с сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса и диастолической дисфункцией [51]. В дальнейшем, в работе [52] из образцов эндомикардиальной биопсии двенадцати пациентов с сохраненной фракцией выброса ($71 \pm 11\%$) и диастолической дисфункцией были выделены одиночные кардиомиоциты. Кардиомиоциты, обработанные тритоном X-100 для удаления мембран, растягивали до длины саркомера 2.2 мкм и активировали растворами, содержащими различные концентрации ионов Ca^{2+} . По сравнению с кардиомиоцитами контрольной группы кардиомиоциты пациентов с диастолической дисфункцией развивали аналогичную общую изометрическую силу при максимальной концентрации Ca^{2+} , но их пассивное напряжение в отсутствие Ca^{2+} (пассивное напряжение покоя) было почти в два раза выше. Введение протеинкиназы А в кардиомиоциты пациентов снижало уровень пассивного напряжения/жесткости до контрольных значений. Таким образом, были впервые получены данные о возможности коррекции жесткости миокардиальной ткани путем воздействия на нее протеинкиназы А [52]. Borbely и соавт. [53, 54] окончательно установили, что жесткость кардиомиоцитов зависит не только от соотношения более эластичной N2BA- и более жесткой N2B-изоформ титина, но и от изменений уровня фосфорилирования этого белка. Так, у пациентов с сердечной недостаточностью впервые было обнаружено уменьшение уровня фосфорилирования N2B-изоформы титина на фоне повышенной жесткости кардиомиоцитов [53, 54].

Итак, приведенные исследования показали, что существуют два отдельных фенотипа сердечной недостаточности с разным ремоделированием левого желудочка: концентрическим – с нормальным размером полости левого желудочка, увеличенной толщиной стенки и повышенным соотношением массы и объема левого желудочка; и эксцентрическим – с дилатацией левого желудочка, нормальной или уменьшенной толщиной стенки и низкой фракцией выброса [52–55]. Эти работы позволили сделать предположение, что механизмы, ответственные за повышенную диастолическую жесткость сердца при диастолической дисфункции, могут различаться. В частности, важно было изучить, что является причиной болезни: ишемия, сопровождающаяся увеличением растяжимости миокарда, либо аортальный стеноз, гипертония и метаболические нарушения, требующие увеличения силы сокращений.

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при сердечной патологии, вызванной ишемией

Понимание механизмов, поддерживающих сердечную функцию на ранней стадии после ишемии и инфаркта миокарда, и выявление процессов, инициирующих переход к дезадаптивному ремоделированию левого желудочка, представляют большой клинический интерес. Инфаркт миокарда увеличивает напряжение стенки жизнеспособного миокарда и инициирует раннее адаптивное ремоделирование в левом желудочке для поддержания сердечного выброса. Более поздние процессы ремоделирования включают фиброзную реорганизацию, которая в конечном итоге приводит к сердечной недостаточности. В пионерской работе Neagoe и соавт., опубликованной в 2002 г. [30], было показано, что в левом желудочке пациентов с обширной ишемической болезнью сердца наблюдается увеличение доли более эластичной N2BA-изоформы титина и уменьшение доли более жесткой N2B-изоформы этого белка, что сопровождалось снижением обусловленной титином пассивной жесткости одиночных миофибрилл при их растяжении.

Исследования фосфорилирования титина при ишемии проводили, как правило, в условиях 20-минутной глобальной ишемии с последующей реперфузией, которая, как известно, активирует киназу CaMKII δ [45]. В исследовании Hidalgo и соавт. [45] на изолированном сердце мышей, подвергшихся протоколу ишемии-реперфузии, было обнаружено, что киназа CaMKII δ достигает пика своей активности в течение трех минут после начала реперфузии. При этом не было обнаружено каких-либо изменений уровня фосфорилирования сайтов S26 и S170 в PEVK-последовательности титина. Авторы предположили, что обнаруженное ими гиперфосфорилирование титина *in vivo* при ишемии может быть связано с увеличением уровня фосфорилирования N2B-последовательности этого белка. Позднее на модели инфаркта миокарда у мышей, вызванного ишемией с последующей реперфузией, были получены данные, указывающие на увеличение уровня фосфорилирования CaMKII δ -зависимого и PKC α -зависимого сайта S12022, расположенного в PEVK-последовательности титина [56]. Обнаруженную при этом повышенную жесткость кардиомиоцитов мышей авторы объяснили как следствием гиперфосфорилирования PEVK-последовательности титина, так и следствием гипофосфорилирования N2B-последовательности этого белка. Работы последующих лет показали, что ишемия и кардиомиопатии имеют общие патомеханизмы, такие как повышение эластичности титина, однако при ишемии не было обнаружено изменений уровня фосфорилирования сайта S4010 в N2B-последовательности титина [57, 58].

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при неишемической дилатационной кардиомиопатии

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является основной причиной неишемической сердечной недостаточности. Это заболевание характеризуется увеличением конечно-диастолического размера левого желудочка, снижением фракции выброса левого желудочка и наличием систолической дисфункции. ДКМП также может возникать вследствие сопутствующих заболеваний, таких как диабет, инфекции, токсины (алкоголь и химиотерапевтические препараты) и высокое кровяное давление. Примерно в половине случаев развитие ДКМП обусловлено мутациями в более чем 50 генах, в основном кодирующих саркомерные и цитоскелетные белки [59]. В работе Макаренко и соавт. был проанализирован изоформный состав титина в левом желудочке сердца здоровых доноров-людей и в сердце 9 тяжело больных пациентов с ДКМП неишемической природы [33]. Обнаружено увеличение доли N2BA-изоформы и уменьшение доли N2B-изоформы титина, а также уменьшение общего содержания этого белка в миокарде пациентов с ДКМП. Эти изменения сопровождалось снижением уровня пассивной жесткости пучков волокон сердечной мышцы у пациентов. Авторы заключили, что обнаруженные изменения в титине и, в частности, увеличение доли более эластичной N2BA-изоформы этого белка могут вносить вклад в улучшение диастолической функции миокарда пациентов с ДКМП, однако эти изменения, в свою очередь, могут способствовать ухудшению сократительной способности сердца во время систолы.

Исследования пациентов с терминальной стадией дилатационной кардиомиопатии выявили дефицит базального уровня фосфорилирования титина в сайтах, которые фосфорилируются протеинкиназами A и G [54, 60], по сравнению с донорскими сердцами, что может способствовать диастолической дисфункции при сердечной недостаточности. Важно отметить, что ни PKA-зависимое, ни PKG-зависимое фосфорилирование не помогало снизить до контрольных значений повышенный уровень пассивной жесткости кардиомиоцитов у пациентов [54]. Возможно, изменение PKC-зависимого уровня фосфорилирования сайтов в PEVK-последовательности титина способствовало поддержанию повышенного уровня пассивной жесткости кардиомиоцитов у пациентов с сердечной патологией.

Kötter и соавт. [38] в 2013 г. проанализировали влияние фосфорилирования сайтов в N2B- и PEVK-последовательностях титина на жесткость миокарда пациентов с дила-

тационной кардиомиопатией. В этой работе ценно то, что в исследуемых образцах не были выявлены изменения в N2BA/N2B соотношении изоформ титина, тогда как были обнаружены изменения уровня фосфорилирования N2B- и PEVK-последовательностей титина. В частности, на фоне повышенной жесткости препаратов миокарда у пациентов было выявлено гипофосфорилирование S4185, S4010 и S4099 сайтов в N2B-последовательности и гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности титина. Авторы сделали следующие выводы: во-первых, гипофосфорилирование N2B-последовательности и гиперфосфорилирование PEVK-последовательности титина увеличивают жесткость сердечной мышцы при развитии патологии; во-вторых, изменения уровня фосфорилирования доменов титина могут быть важны для точной настройки пассивной жесткости миокарда и диастолической функции сердца. Сходные результаты были получены в работе Vollen и соавт., которые продемонстрировали гипофосфорилирование PKA/ERK2-зависимого сайта S4010 у пациентов с ДКМП [57].

Исследования фосфорилирования титина в миокарде пациентов с ДКМП в целом согласуются с данными, полученными на животных моделях, в том смысле, что в сравнении с сердцами здоровых людей у пациентов наблюдается уменьшение уровня фосфорилирования как титина в целом, так и N2B-последовательности этого белка, тогда как по сайту S11878 в PEVK-последовательности титина наблюдается гиперфосфорилирование. В частности, сердечный титин был гипофосфорилирован по сайту S4010 в N2B-последовательности титина в образцах левого желудочка сердца пациентов с тяжелой формой дилатационной кардиомиопатии [57] и идиопатической кардиомиопатии [58]. Сайт S4185 в N2B-последовательности титина был гипофосфорилирован у тяжело больных пациентов с ДКМП и диастолической дисфункцией [61, 62]. В большинстве описанных случаев эти изменения связаны с повышением жесткости кардиомиоцитов. Lakomkin и соавт. в 2020 г. [63] на доксорубициновой модели кардиомиопатии показали, что при диастолической дисфункции происходит замедление расслабления, сочетающееся с повышением диастолического давления и мобилизацией анаэробного гликолиза. При этом выявлено увеличение общего уровня фосфорилирования титина, что коррелировало с почти двукратным увеличением доли более длинной N2BA-изоформы титина [63]. Сайт-специфическое гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности титина наблюдалось в образцах миокарда пациентов с тяжелой ДКМП и диастолической дисфункцией [40, 61, 64]. Эти изменения сопровождалось увеличением жесткости сердечной мышцы. Напротив, уровень фосфорилирования сайта S12022, также расположенного в PEVK-последовательности титина, не менялся при диастолической функции правого желудочка сердца у пациентов с легочной артериальной гипертензией [65].

Вышеуказанные относительно постоянные изменения уровня фосфорилирования титина на разных стадиях различных сердечно-сосудистых заболеваний могут казаться несколько неожиданными, однако можно предположить, что эти изменения являются показателем адаптации сердца к новым условиям при развитии патологии. При этом факторов, модулирующих пассивную жесткость миофибрилл, помимо изменения изоформного состава титина или уровня его фосфорилирования, может быть больше. В частности, недавно показано, что развитие дилатационной кардиомиопатии, детерминированной мутациями в гене титина, приводящими к экспрессии укороченных молекул этого белка, сопровождается уменьшением жесткости миофибрилл сердечной мышцы человека [66]. В целом титин у пациентов с ДКМП участвует в механизме Франка – Старлинга не столько как пассивный эластичный компонент, сколько как активный регулятор актин-миозинового взаимодействия. Возможно, что механизм Франка – Старлинга может быть одним из наиболее важных факторов патогенеза ДКМП, поскольку уменьшение жесткости сердечной мышцы (т. е. увеличение ее эластичности, способности к большему растяжению) приводит к нарушению активации сокращения в зависимости от длины растяжения саркомеров и мышцы в целом, т. е. приводит к нарушению вышеуказанного механизма.

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при гипертрофической кардиомиопатии

Гипертрофическая кардиомиопатия характеризуется сохранением фракции выброса левого желудочка, наличием диастолической дисфункции и обструкцией выходных путей. При этой патологии формируется жесткая неподатливая камера левого желудочка, которая препятствует диастолическому наполнению и повышает конечное диастолическое давление [67]. В конечном счете это заболевание может приводить к хронической ишемии миоцитов и их гибели и постепенному развитию систолической дисфункции. Вследствие гипертрофии миокарда, как известно, экспрессия протеинкиназ A и G снижена, тогда как экспрессия PKCa, ERK2- и CaMKII-киназ, как правило, повышена. Raskin и соавт. [39] в 2012 г. в экспериментах *in vitro*, используя рекомбинантную N2B-последовательность титина человека (с 3750 по 4019 аминокислотных остатков), обнаружили, что она является мишенью для ERK2-киназы. Авторы также заявили, что у человека мутация в *TTN*, кодирующем вышеуказанную область молекулы титина, сопровождается развитием гипертрофической кардиомиопатии, при которой наблюдается увеличение уровня фосфорилирования N2B-последовательности *in vitro* [39]. Известны данные [46] об увеличении жесткости сердечной мышцы пациентов с развитием гипертрофической кардиомиопатии. Повышенную жесткость сердечной мышцы пациентов авторы объясняют увеличением уровня фосфорилирования сайта S4062 N2B-последовательности и сайта S12022 PEVK-последовательности титина, что выявлено на фоне увеличения содержания и активности протеинкиназы CaMKII [46]. Авторы впервые продемонстрировали, что ключевой киназой, фосфорилирующей титин при гипертрофической кардиомиопатии, является протеинкиназа D (PKD) – серин-треониновая киназа, которая относится к семейству CaMKII-киназ [46]. В частности, авторы обнаружили гиперфосфорилирование PKD-зависимого сайта S916 титина в миокарде пациентов с гипертрофической кардиомиопатией. Авторы также получили веские доказательства того, что введение протеинкиназы D в кардиомиоциты мышей с нокаутом этой протеинкиназы приводило к снижению пассивной жесткости кардиомиоцитов, которая была выше у нокаутных животных [46]. Таким образом, авторы впервые выявили ранее неизвестную роль протеинкиназы D в регулировании вязкоупругих свойств титина и вследствие этого жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом.

Исследования сайт-специфического фосфорилирования титина в миокарде человека и животных при диастолической дисфункции неишемической этиологии

В исследовании van Heerebeek и соавт. [55] на кардиомиоцитах пациентов с сахарным диабетом было показано, что механизмы, ответственные за повышенную диастолическую жесткость диабетического сердца, различаются при систолической и диастолической дисфункции: фиброз и возрастные изменения вносят вклад в развитие систолической дисфункции, тогда как повышенное пассивное напряжение кардиомиоцитов в покое вносит вклад в сохранение фракции выброса [55]. Эта работа впоследствии дала развитие исследованиям диастолической дисфункции неишемического происхождения. За последние 20 лет нарастает объем свидетельств, что этому заболеванию сопутствует высокая распространенность других заболеваний, таких как избыточный вес/ожирение, сахарный диабет, хроническая обструктивная болезнь легких и солечувствительная гипертензия. Были созданы многочисленные модели на животных (мышь, крыса, собака, свинья), которые имитируют заболевания сердца человека. Такие модели, как миокардит [68], легочная артериальная гипертензия, сужение аорты и сахарный диабет 2-го типа [69] позволили понять, в каком направлении происходят изменения изоформного состава титина и уровня фосфорилирования этого белка при патологических состояниях.

При моделировании стеноза аорты у мышей наблюдалось как уменьшение общего уровня фосфорилирования титина в сердце по сравнению со здоровыми контрольными группами [70], так и увеличение уровня фосфорилирования этого белка [71, 72]. Очевидно, противоречивые результаты относительно общего уровня фосфорилирования титина, наблюдаемые на животных моделях, могут быть связаны со стадией сердечной недостаточности, индуцированной в соответствующей модели. Например, тяжесть сердечной недостаточности может быть разной у мышей [71] и крыс [73], подвергшихся сужению аорты, в зависимости от уровня ее сужения. Сужение корня аорты или перевязывание аорты как модели для исследования диастолической дисфункции обычно приводит к эксцентрической гипертрофии левого желудочка из-за внутрисердечной объемной перегрузки с чрезмерным отеком легких [74]. При стенозе аорты значительно повышается конечно-диастолическая жесткость левого желудочка и давление в нем, однако фракция выброса левого желудочка не снижается. Показано, что продолжительный стеноз аорты у мышей усугублял систолическую дисфункцию, что в конечном итоге приводило к сердечной недостаточности с низкой фракцией выброса [74]. Важно отметить, что подобные изменения редко наблюдаются у людей, а результаты моделирования длительного стеноза аорты на мышах не соответствуют клиническим результатам. Следовательно, нужно быть осторожнее, интерпретируя результаты моделирования диастолической функции на примере стеноза аорты [75]. Несмотря на это, моделирование стеноза аорты выявило некоторые общие тенденции. Так, Borbely и соавт. [54] в 2009 г., используя биопсии левого желудочка сердца пациентов со стенозом аорты (без ишемической болезни сердца), обнаружили гипофосфорилирование N2B-последовательности титина, которое сопровождалось увеличением жесткости кардиомиоцитов при их растяжении в покое. При этом инкубация кардиомиоцитов в растворе, содержащем протеинкиназу А, восстанавливала уровень их пассивного напряжения. Последующие работы показали гипофосфорилирование PKG-зависимых сайтов N2B-последовательности титина: S4099 у собак с диастолической дисфункцией [76] и S4080 у крыс, подвергшихся стенозу аорты [73], а также PKA/ERK2-зависимых сайтов S4010 у собак с диастолической дисфункцией [76] и S991 у крыс со стенозом аорты [73]. В области PEVK-последовательности наблюдалось гиперфосфорилирование сайта S12884 у крыс со стенозом аорты [73]. Гипофосфорилирование сайтов S4099, S4185 и S4010 в N2B-последовательности титина и гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности этого белка было обнаружено также и в сердечной ткани пациентов с ДКМП и гипертрофической кардиомиопатией [38]. При этом пассивное напряжение, развиваемое скинированными волокнами миокарда пациентов, было выше, чем в контроле. Авторы пришли к заключению, что гипофосфорилирование сайтов N2B-последовательности и гиперфосфорилирование PEVK-последовательности титина могут действовать однонаправленно, повышая пассивное напряжение/жесткость сердечной мышцы человека при развитии патологических изменений [38]. Таким образом, ряд исследований указывают на то, что изменения уровня фосфорилирования в сайтах N2B- и PEVK-последовательностях титина сопровождаются увеличением жесткости кардиомиоцитов [38, 40, 73, 76, 77]. При этом инкубация *in vitro* выделенных кардиомиоцитов в растворе, содержащем протеинкиназу А, сопровождалась уменьшением вышеуказанной жесткости [77].

При моделировании стеноза аорты у мышей было показано, что сайты титина, фосфорилируемые протеинкиназой С, также могут играть важную роль в изменении вязкоупругих свойств сердечной мышцы [71]. Так, при измерении пассивного напряжения миокарда было показано, что увеличение жесткости сердечной мышцы у мышей с сердечной недостаточностью связано как с фиброзом, так и с изменением вязкоупругих свойств молекул титина. При этом авторы обнаружили противоречащее вышеуказанным данным увеличение содержания более растяжимой N2BA-изоформы титина и уменьшение содержания более жесткой N2B-изоформы этого белка [71]. Что-

бы выяснить вклад фосфорилирования титина в изменение вязкоупругих свойств его молекул, авторы провели вестерн-блоттинг с использованием антител, специфичных к некоторым фосфосайтам титина. В миокарде мышей с сердечной недостаточностью обнаружено гиперфосфорилирование сайтов титина, фосфорилируемых протеинкиназой A, а также сайта S11878 (S26) в PEVK-последовательности титина, фосфорилируемого протеинкиназой C. При этом сайт S12022 (S170) в PEVK-последовательности титина, также фосфорилируемый протеинкиназой C, был гипофосфорилирован [71]. Авторы сделали вывод, что диастолическая дисфункция, индуцированная стенозом аорты, приводит к увеличению пассивной жесткости миокарда мышей как вследствие фиброза, так и вследствие изменения вязкоупругих свойств молекул титина из-за гиперфосфорилирования сайта S11878 в PEVK-последовательности этого белка. При этом увеличение N2BA/N2B-соотношения изоформ титина не нормализовало пассивную жесткость кардиомиоцитов мышей. По мнению авторов, изменения вязкоупругих свойств молекул титина вследствие фосфорилирования являются основным фактором повышения пассивной жесткости миокарда у мышей с сердечной недостаточностью.

Диастолическая дисфункция у пациентов часто выявляется на фоне других заболеваний, таких как избыточный вес/ожирение, сахарный диабет, хроническая обструктивная болезнь легких и солечувствительная гипертензия. В частности, известно, что при стенозе аорты диастолическая дисфункция левого желудочка является чувствительным маркером дисфункции миокарда, вызванной сахарным диабетом II типа. Так, у пациентов с диастолической дисфункцией и повышенной жесткостью кардиомиоцитов на фоне сахарного диабета II типа обнаружено гипофосфорилирование сайта S4099 N2B-последовательности титина из-за снижения активности протеинкиназы G и гиперфосфорилирование сайта S11878 в PEVK-последовательности этого белка из-за повышенной активности протеинкиназы PKC α [64]. Однако важно подчеркнуть, что пациенты с диабетом принимали лекарства (инсулин, метформин, β -блокаторы), которые могли повлиять на изменения уровня фосфорилирования титина.

Гипертензия также сопутствует диастолической дисфункции. В работе [65] обнаружено, что у пациентов с легочной артериальной гипертензией нарушение диастолической функции правого желудочка вследствие повышенной жесткости кардиомиоцитов сопровождалось гипофосфорилированием следующих сайтов титина: PKA-зависимого сайта S469 в N2B-последовательности и PKC α -зависимого сайта S12022 (S170) в PEVK-последовательности. При этом не было выявлено изменений уровня фосфорилирования в PKC α -зависимом сайте S11878 (S26), расположенном в PEVK-последовательности титина [65]. В работе [78] показано, что у пациентов с легочной артериальной гипертензией развитие диастолической дисфункции правого желудочка развивалось на фоне уменьшения общего уровня фосфорилирования титина, но при отсутствии изменений в N2BA/N2B-соотношении изоформ этого белка.

В связи с тем, что диастолическая дисфункция у пациентов часто выявляется на фоне других заболеваний, указанных выше, адекватной моделью диастолической дисфункции можно считать модель гипертонической кардиомиопатии и гиперлипидемии у свиней [79]. С помощью этой модели авторы выявили развитие гипертрофии левого желудочка и дилатацию левого предсердия у свиней. Эти изменения сопровождались уменьшением общего уровня фосфорилирования титина и увеличением доли более жесткой N2B-изоформы этого белка, что может вносить вклад в увеличение жесткости миокарда.

Итак, жесткость миокарда, основанная на вязкоупругих свойствах молекул титина, определяется соотношением его изоформ, а также уровнем фосфорилирования сайтов в эластичной I-части молекулы этого белка. Проведенные исследования показывают, что в ситуациях, когда требуется мобилизация растяжения миокарда, соотношение жесткость/эластичность сдвигается в сторону увеличения эластичности, а когда требуется усиление сокращений сердечной мышцы, то увеличивается жесткость молекул титина. При этом изменения уровня фосфорилирования титина все чаще признаются важным

молекулярным инструментом, вносящим вклад в патофизиологию заболеваний сердца. Эти данные о титине открывают новые терапевтические возможности для нормализации сократительной функции миокарда у пациентов с сердечными заболеваниями.

Фосфорилирование титина как мишень для терапии

Титин благодаря изменению экспрессии его изоформ и/или уровня его фосфорилирования все чаще признается в качестве ключевого молекулярного инструмента в патофизиологии некоторых заболеваний сердца. В связи с этим титин является потенциальной мишенью для фармакологических манипуляций, составляя, таким образом, новую терапевтическую мишень. Терапевтические воздействия в этом направлении могут быть направлены как на изменение соотношения N2BA- и N2B-изоформ титина, так и на изменение уровня фосфорилирования этого белка.

Интересным и многообещающим подходом, предложенным недавно, является использование полимеров ламинина в изменении жесткости сердечной мышцы путем изменения экспрессии N2BA- и N2B-изоформ титина [80]. Ламинины – это белки внеклеточного матрикса базальной мембраны кардиомиоцитов. Авторы [80] показали, что внутримиокардиальная *ex vivo* инъекция полиламинина в сердце крысы вызывала увеличение в 1.9 раза экспрессии более эластичной N2BA-изоформы титина и уменьшение в 3.9 раза экспрессии более жесткой N2B-изоформы этого белка по прошествии 4 ч.

Что касается парадигмы лечения сердечных заболеваний путем изменения уровня фосфорилирования титина, то следует поговорить о диастолической дисфункции неишемического происхождения и ее сопутствующих заболеваниях, указанных выше, способных вызывать системное воспалительное состояние. Хроническое воспаление развивается при хронической обструктивной болезни легких, что является одновременно преморбидным признаком диастолической дисфункции [81] и фактором смертности от сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [82]. При висцеральном ожирении жировая ткань инфильтрируется макрофагами, которые вызывают системное воспалительное состояние из-за секреции провоспалительных цитокинов [83]. Недавно было показано, что сопутствующие заболевания сопровождаются более значительным ухудшением функции и структуры миокарда при диастолической дисфункции, чем при артериальной гипертензии [84]. Это подтверждает дополнительное ухудшение диастолической дисфункции за счет таких механизмов, как нейроэндокринная активация [85] и недостаток высокоэнергетических фосфатов [86]. Было также показано, что системное воспалительное состояние, вызванное этими сопутствующими заболеваниями, очевидно, проявляется в связи с высокими циркулирующими уровнями интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли α (TNF- α). Уровни этих же цитокинов были повышены и у пациентов с диастолической дисфункцией [87]. Такое обилие новых данных о структуре, функциях и передаче сигналов в миокарде позволяет создать новую парадигму лечения диастолической дисфункции с помощью фосфорилирования титина. В частности, есть работы, показавшие, что ингибирование рецептора интерлейкина-6 модулирует иммунную реакцию и восстанавливает уровень фосфорилирования титина при экспериментальном миокардите. Так, Nigota и соавт. [88] продемонстрировали, что одновременная сверхэкспрессия IL-6 и рецептора IL-6 у мышей вызывает концентрическую гипертрофию, типичную для гипертонической сердечной недостаточности. В другом исследовании [68] авторы применили антитела к рецептору IL-6 у мышей с целью улучшения сердечной дисфункции, развившейся на фоне миокардита, индуцированного вирусом Коксаки типа В. В миокарде пораженных мышей было выявлено уменьшение общего уровня фосфорилирования N2BA-изоформы титина, тогда как уровень фосфорилирования N2B-изоформы не изменялся [68]. Однократная инъекция антитела MR16-1/tocilizumab к рецептору IL-6 нормализовало функцию сердечной мышцы и общий уровень фосфорилирования титина.

В связи с накопившимся объемом данных о том, что диастолической дисфункции сопутствуют гипертония, гиперлипидемия, и, как следствие, системное провоспалительное состояние и снижение биодоступности оксида азота, становится очевидным, что падает содержание циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и снижается активность протеинкиназы G в кардиомиоцитах. В свою очередь, как известно, низкая активность протеинкиназы G способствует развитию гипертрофии и повышению жесткости кардиомиоцитов вследствие гипофосфорилирования титина. Нарушение регуляции пути цГМФ – протеинкиназа G тесно связано с ремоделированием сердца и развитием сердечной патологии. В настоящее время доступно множество веществ, которые стимулируют этот путь (см. недавний обзор о роли цГМФ в сердце [89]). Ингибиторы фосфодиэстеразы-5А (такие как силденафил) и натрийуретический пептид В-типа, которые повышают уровень цГМФ, показали себя многообещающими в качестве потенциальных средств лечения диастолической дисфункции в доклинических испытаниях. В частности, на модели диастолической дисфункции у собак было показано, что силденафил и натрийуретический пептид В-типа увеличивали уровень фосфорилирования титина, уменьшали жесткость кардиомиоцитов и повышали растяжимость левого желудочка [90].

Однако следует отметить, что несмотря на то, что вышеописанные методы лечения были многообещающими в лабораторных условиях, расхождения в дозировках и метаболические различия между животными и людьми часто являются причиной неудач клинических испытаний [89]. Подобная ситуация – только одно из многих препятствий на пути поиска новых эффективных методов лечения сердечной недостаточности. Кроме того, сложность путей, таких как цГМФ-протеинкиназа G, означает, что регуляция промежуточных этапов пути также может быть непреднамеренно изменена и противодействовать желаемому эффекту лечения. Вероятно, поэтому использование ингибиторов фосфодиэстеразы-5А в исследовании RELAX не выявило значительного улучшения диастолической функции у пациентов, получавших лечение [90, 91]. Аналогичные испытания проводились с ингибиторами фосфодиэстеразы-9А, целью которых также было повышение концентрации цГМФ в сердце и улучшение сердечной функции [92]. При моделировании диастолической дисфункции у мышей показано, что ингибирование фосфодиэстеразы-9А уменьшало диастолическую жесткость левого желудочка сердца [93].

Активаторы/стимуляторы растворимой гуанилатциклазы считаются также многообещающим средством лечения сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса, поскольку было обнаружено, что они повышают уровни цГМФ, что приводит к увеличению активности протеинкиназ A, G и ERK2, и одновременно снижают активность киназ PKC α и CaMKII δ [94, 95]. Однако эти результаты не были воспроизведены ни в клинических исследованиях VITALITY, ни в SOCRATES, так как не наблюдалось улучшения диастолической функции у пациентов с сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса, получавших vericiguat – новый пероральный стимулятор растворимой гуанилатциклазы [96, 97]. Тем не менее считается, что вышеуказанные методы лечения могут быть успешными для подгруппы пациентов с нарушением передачи сигналов пути цГМФ – протеинкиназа G.

В заключительной части этой главы следует остановиться на одном недавнем исследовании, посвященном изучению роли метформина в улучшении диастолической функции сердца мыши при моделировании сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [98]. В частности, авторы использовали операцию по поперечному сужению аорты с введением дезоксикортикостерона ацетата для увеличения диастолической жесткости сердечной мышцы у мышей, а также с целью достижения непереносимости этими животными физических нагрузок. У мышей, получавших метформин с питьевой водой, обнаружено уменьшение пассивной жесткости миокарда левого желудочка, а также увеличение устойчивости к физическим нагрузкам. Эти изменения

наблюдались на фоне гиперфосфорилирования РКА-зависимых сайтов в N2B-последовательности титина, что, как известно, сопровождается уменьшением жесткости молекул титина. Уровень фосфорилирования PEVK-последовательности титина в миокарде мышей, получавших метформин, не изменялся [98]. Принимая во внимание известные данные, что метформин улучшал диастолическую функцию у пациентов с диабетом, авторы сделали осторожное предположение о возможном терапевтическом использовании этого вещества в лечении диастолической дисфункции и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [98]. Другими перспективными терапевтическими средствами, способствующими уменьшению пассивной жесткости миокарда при развитии диабетической кардиомиопатии, считаются инсулин [64] и нейрегулин-1 (NRG-1) [99].

Таким образом, фосфорилирование титина, изменяющее вязкоупругие свойства миокарда, представляет собой потенциальную мишень для терапевтического вмешательства у пациентов с сердечными патологиями. Данные, приведенные в нашем обзоре, демонстрируют положительное влияние на жесткость кардиомиоцитов, в основе которой лежат изменения уровня фосфорилирования титина, таких препаратов, как силденафил, ингибитор фосфодиэстеразы 5A, натрийуретический пептид головного мозга (активатор гуанилатциклазы), метформин, инсулин и нейрегулин-1.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

В. И. М. и Л. В. Л. – идея, анализ литературы, вклад в написание обзора и редакторские правки. М. Г. З. – сбор литературы, написание текста, подготовка рисунка и редакторские правки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет гранта РФФ № 23-15-00275. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Münch J, Abdelilah-Seyfried S* (2021) Sensing and Responding of Cardiomyocytes to Changes of Tissue Stiffness in the Diseased Heart. *Front Cell Dev Biol* 9: 642840. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642840>
2. *Linke WA* (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res* 77(4): 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.029>. PMID: 17475230
3. *Chauveau C, Rowell J, Ferreira A* (2014) A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat* 35(9): 1046–1059. <https://doi.org/10.1002/humu.22611>
4. *Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, Conner L, DePalma SR, McDonough B, Sparks E, Teodorescu DL, Cirino AL, Banner NR, Pennell DJ, Graw S, Merlo M, Di Lenarda A, Sinagra G, Bos JM, Ackerman MJ, Mitchell RN, Murry CE, Lakdawala NK, Ho CY, Barton PJ, Cook SA, Mestroni L, Seidman JG, Seidman CE* (2012) Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 366(7): 619–628. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110186>
5. *Fomin A, Gärtner A, Cyganek L, Tiburcy M, Tuleta I, Wellers L, Folsche L, Hobbach AJ, von Frieling-Salewsky M, Unger A, Hucke A, Koser F, Kassner A, Sielemann K, Streckfuß-Bömeke K, Hasenfuss G, Goedel A, Laugwitz KL, Moretti A, Gummert JF, Dos Remedios CG, Reinecke H,*

- Knöll R, van Heesch S, Hubner N, Zimmermann WH, Milting H, Linke WA (2021) Truncated titin proteins and titin haploinsufficiency are targets for functional recovery in human cardiomyopathy due to TTN mutations. *Sci Transl Med* 13(618): eabd3079.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3079>
6. Somerville LL, Wang K (1987) In vivo phosphorylation of titin and nebulin in frog skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 147(3): 986–992.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(87\)80167-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(87)80167-5)
 7. Somerville LL, Wang K (1988) Sarcomere matrix of striated muscle: in vivo phosphorylation of titin and nebulin in mouse diaphragm muscle. *Arch Biochem Biophys* 262(1): 118–129.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90174-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90174-9)
 8. Takano-Ohmuro H, Nakauchi Y, Kimura S, Maruyama K (1992) Autophosphorylation of beta-connectin (titin 2) *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 183(1): 31–35.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)91604-o](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)91604-o)
 9. Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H (2002) Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 90(11): 1181–1188.
<https://doi.org/10.1161/01.res.0000021115.24712.99>
 10. Labeit S, Gautel M, Lakey A, Trinick J (1992) Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J* 11(5): 1711–1716.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05222.x>
 11. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, Wilmanns M, Gautel M (1999) Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395(6705): 863–869.
<https://doi.org/10.1038/27603>. Erratum in: *Nature* 1999 Feb 25;397(6712):719
 12. Gautel M, Leonard K, Labeit S (1993) Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J* 12(10): 3827–3834.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06061.x>
 13. Musa H, Meek S, Gautel M, Peddie D, Smith AJ, Peckham M (2006) Targeted homozygous deletion of M-band titin in cardiomyocytes prevents sarcomere formation. *J Cell Sci* 119(Pt 20): 4322–4331.
<https://doi.org/10.1242/jcs.03198>
 14. Lange S, Xiang F, Yakovenko A, Vihola A, Hackman P, Rostkova E, Kristensen J, Brandmeier B, Franzen G, Hedberg B, Gunnarsson LG, Hughes SM, Marchand S, Sejersen T, Richard I, Edström L, Ehler E, Udd B, Gautel M (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308(5728): 1599–1603.
<https://doi.org/10.1126/science.1110463>
 15. Bogomolovas J, Fleming JR, Franke B, Manso B, Simon B, Gasch A, Markovic M, Brunner T, Knöll R, Chen J, Labeit S, Scheffner M, Peter C, Mayans O (2021) Titin kinase ubiquitination aligns autophagy receptors with mechanical signals in the sarcomere. *EMBO Rep* 22(10): e48018.
<https://doi.org/10.15252/embr.201948018>
 16. Peng J, Raddatz K, Molkenin JD, Wu Y, Labeit S, Granzier H, Gotthardt M (2007) Cardiac hypertrophy and reduced contractility in hearts deficient in the titin kinase region. *Circulation* 115(6): 743–751.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.645499>
 17. Sebestyén MG, Wolff JA, Greaser ML (1995) Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J Cell Sci* 108(Pt 9): 3029–3037.
<https://doi.org/10.1242/jcs.108.9.3029>. PMID: 8537442
 18. Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K, Fürst DO (1996) The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci* 109 (Pt 11): 2747–2754.
<https://doi.org/10.1242/jcs.109.11.2747>
 19. Ottenheijm CA, Granzier H (2010) Role of titin in skeletal muscle function and disease. *Adv Exp Med Biol* 682: 105–122.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6366-6_6
 20. Labeit S, Kolmerer B (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270(5234): 293–296.
<https://doi.org/10.1126/science.270.5234.293>
 21. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2000) Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 86(11): 1114–1121.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.11.1114>

22. *Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S* (2001) The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 89(11): 1065–1072.
<https://doi.org/10.1161/hh2301.100981>
23. *Helmes M, Trombitás K, Centner T, Kellermayer M, Labeit S, Linke WA, Granzier H* (1999) Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res* 84(11): 1339–1352.
<https://doi.org/10.1161/01.res.84.11.1339>
24. *Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitás K, Labeit S, Granzier H* (2000) Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* 86(1): 59–67.
<https://doi.org/10.1161/01.res.86.1.59>
25. *Granzier HL, Irving TC* (1995) Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J* 68(3): 1027–1044.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80278-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80278-X)
26. *Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Rüegg JC, Labeit S* (1996) Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol* 261(1): 62–71.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0441>
27. *Granzier H, Kellermayer M, Helmes M, Trombitás K* (1997) Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction. *Biophys J* 73(4): 2043–2053.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78234-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78234-1)
28. *Trombitás K, Redkar A, Centner T, Wu Y, Labeit S, Granzier H* (2000) Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. *Biophys J* 79(6): 3226–3234.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76555-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76555-6)
29. *Helmes M, Trombitás K, Granzier H* (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 79(3): 619–626.
<https://doi.org/10.1161/01.res.79.3.619>
30. *Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA* (2002) Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 106(11): 1333–1341.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029803.93022.93>
31. *Warren CM, Jordan MC, Roos KP, Krzesinski PR, Greaser ML* (2003) Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium. *Cardiovasc Res* 59(1): 86–94.
[https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00328-6](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00328-6)
32. *Warren CM, Krzesinski PR, Greaser ML* (2003) Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 24(11): 1695–1702.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305392>
33. *Makarenko I, Opitz CA, Leake MC, Neagoe C, Kulke M, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ, Linke WA* (2004) Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts. *Circ Res* 95(7): 708–716.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000143901.37063.2f>
34. *Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA* (2012) New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc)* 77(13): 1515–1535.
<https://doi.org/10.1134/S0006297912130093>
35. *Fukuda N, Wu Y, Nair P, Granzier HL* (2005) Phosphorylation of titin modulates passive stiffness of cardiac muscle in a titin isoform-dependent manner. *J Gen Physiol* 125(3): 257–271.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200409177>
36. *Krüger M, Linke WA* (2006) Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension. *J Muscle Res Cell Motil* 27(5-7): 435–444.
<https://doi.org/10.1007/s10974-006-9090-5>
37. *Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA* (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 104(1): 87–94.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184408>
38. *Köttler S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M* (2013) Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofibrillar stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 99(4): 648–656.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt144>
39. *Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, Yamazaki KG, Granzier HL, Gregorio CC, McCulloch AD, Omens JH, Sheikh F* (2012) A novel mechanism involving four-and-a-

- half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem* 287(35): 29273–29284.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.372839>
40. *Hamdani N, Krysiak J, Kreuzer MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA* (2013) Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 112(4): 664–674.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300105>
 41. *Perkin J, Slater R, Del Favero G, Lanzicher T, Hidalgo C, Anderson B, Smith JE 3rd, Sbaizero O, Labeit S, Granzier H* (2015) Phosphorylating Titin's Cardiac N2B Element by ERK2 or CaMKII δ Lowers the Single Molecule and Cardiac Muscle Force. *Biophys J* 109(12): 2592–2601.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.002>
 42. *Murphy S, Frishman WH* (2005) Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. *Cardiol Rev* 13(1): 3–12.
<https://doi.org/10.1097/01.crd.0000124914.59755.8d>
 43. *Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H* (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 105(7): 631–638.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198465>
 44. *Anderson BR, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H* (2010) The effects of PKC α phosphorylation on the extensibility of titin's PEVK element. *J Struct Biol* 170(2): 270–277.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.02.00>
 45. *Hidalgo CG, Chung CS, Saripalli C, Methawasin M, Hutchinson KR, Tsapralis G, Labeit S, Mattiuzzi A, Granzier HL* (2013) The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements. *J Mol Cell Cardiol* 54: 90–97.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.012>
 46. *Herwig M, Koliijn D, Lódi M, Hölper S, Kovács Á, Papp Z, Jaquet K, Haldenwang P, Dos Remedios C, Reusch PH, Mügge A, Krüger M, Fielitz J, Linke WA, Hamdani N* (2020) Modulation of Titin-Based Stiffness in Hypertrophic Cardiomyopathy via Protein Kinase D. *Front Physiol* 11: 240.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00240>
 47. *Loescher CM, Breitreuz M, Li Y, Nickel A, Unger A, Diel A, Schmidt A, Mohamed BA, Kötter S, Schmitt JP, Krüger M, Krüger M, Toischer K, Maack C, Leichert LI, Hamdani N, Linke WA* (2020) Regulation of titin-based cardiac stiffness by unfolded domain oxidation (UnDOx). *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(39): 24545–24556.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2004900117>
 48. *Fukuda N, Wu Y, Farman G, Irving TC, Granzier H* (2005) Titin-based modulation of active tension and interfilament lattice spacing in skinned rat cardiac muscle. *Pflügers Arch* 449(5): 449–457.
<https://doi.org/10.1007/s00424-004-1354-6>
 49. *Preetha N, Yiming W, Helmes M, Norio F, Siegfried L, Granzier H* (2005) Restoring force development by titin/connectin and assessment of Ig domain unfolding. *J Muscle Res Cell Motil* 26(6-8): 307–317.
<https://doi.org/10.1007/s10974-005-9037-2>. PMID: 16470334
 50. *Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL* (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110(2): 155–162.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF>
 51. *Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, Granzier H* (2002) Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation* 106(11): 1384–1389.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.0000029804.61510.02>
 52. *Van Heerebeek L, Borbély A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Linke WA, Laarman GJ, Paulus WJ* (2006) Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 113(16): 1966–1973.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.587519>
 53. *Borbély A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, Paulus WJ* (2005) Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111(6): 774–781.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155257.33485.6D>
 54. *Borbély A, Falcao-Pires I, van Heerebeek L, Hamdani N, Edes I, Gavina C, Leite-Moreira AF, Bronzwaer JG, Papp Z, van der Velden J, Stienen GJ, Paulus WJ* (2009) Hypophosphorylation

- of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. *Circ Res* 104(6): 780–786.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193326>
55. Van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ (2008) Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 117(1): 43–51.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728550>
56. Kötter S, Kazmierowska M, Andresen C, Bottermann K, Grandoch M, Gorressen S, Heinen A, Moll JM, Scheller J, Gödecke A, Fischer JW, Schmitt JP, Krüger M (2016) Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res* 119(9): 1017–1029.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309685>
57. Bollen IAE, Ehler E, Fleischanderl K, Bouwman F, Kempers L, Ricke-Hoch M, Hilfiker-Kleiner D, Dos Remedios CG, Krüger M, Vink A, Asselbergs FW, van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto YM, Kuster DWD, van der Velden J (2017) Myofilament Remodeling and Function Is More Impaired in Peripartum Cardiomyopathy Compared with Dilated Cardiomyopathy and Ischemic Heart Disease. *Am J Pathol* 187(12): 2645–2658.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.022>
58. Bollen IAE, Schuldt M, Harakalova M, Vink A, Asselbergs FW, Pinto JR, Krüger M, Kuster DWD, van der Velden J (2017) Genotype-specific pathogenic effects in human dilated cardiomyopathy. *J Physiol* 595(14): 4677–4693.
<https://doi.org/10.1113/JP274145>
59. Burke MA, Cook SA, Seidman JG, Seidman CE (2016) Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 68(25): 2871–2886.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>
60. Krüger M, Linke WA (2009) Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 46(4): 490–498.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.01.004>
61. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, Slater R, Palmer BM, Van Buren P, Meyer M, Redfield MM, Bull DA, Granzier HL, LeWinter MM (2015) Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation* 131(14): 1247–1259.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215>
62. Gotsman I, Keren A, Zwas DR, Lotan C, Admon D (2018) Clinical Impact of ABO and Rhesus D Blood Type Groups in Patients With Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol* 122(3): 413–419.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2018.04.018>
63. Lakomkin VL, Abramov AA, Studneva IM, Ulanova AD, Vikhlyantsev IM, Prosvirnin AV, Lukoshkova EV, Kapelko VI (2020) Early changes of energy metabolism, isoformic content and level of titin phosphorylation at diastolic dysfunction. *Kardiologiya* 60(2): 4–9.
<https://doi.org/10.18087/cardio.2020.3.n531>. PMID: 32345192
64. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M (2018) Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res* 123(3): 342–355.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312166>
65. Rain S, Bos Dda S, Handoko ML, Westerhof N, Stienen G, Ottenheijm C, Goebel M, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, Bogaard HJ, Remedios CD, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS (2014) Protein changes contributing to right ventricular cardiomyocyte diastolic dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *J Am Heart Assoc* 3(3): e000716.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000716>
66. Vikhorev PG, Vikhoreva NN, Yeung W, Li A, Lal S, Dos Remedios CG, Blair CA, Guglin M, Campbell KS, Yacoub MH, de Tombe P, Marston SB (2022) Titin-truncating mutations associated with dilated cardiomyopathy alter length-dependent activation and its modulation via phosphorylation. *Cardiovasc Res* 118(1): 241–253.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa316>
67. Burke MA, Cook SA, Seidman JG, Seidman CE (2016) Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 68(25): 2871–2886.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.08.079>
68. Savvatis K, Müller I, Fröhlich M, Pappritz K, Zietsch C, Hamdani N, Grote K, Schieffler B, Klingel K, Van Linthout S, Linke WA, Schultheiss HP, Tschöpe C (2014) Interleukin-6 receptor inhibi-

- tion modulates the immune reaction and restores titin phosphorylation in experimental myocarditis. *Basic Res Cardiol* 109(6): 449.
<https://doi.org/10.1007/s00395-014-0449-2>
69. *Hamdani N, Hervent AS, Vandekerckhove L, Matheeußen V, Demolder M, Baerts L, De Meester I, Linke WA, Paulus WJ, De Keulenaer GW* (2014) Left ventricular diastolic dysfunction and myocardial stiffness in diabetic mice is attenuated by inhibition of dipeptidyl peptidase 4. *Cardiovasc Res* 104(3): 423–431.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvu223>
 70. *Mohamed BA, Schnelle M, Khadjeh S, Lbik D, Herwig M, Linke WA, Hasenfuss G, Toischer K* (2016) Molecular and structural transition mechanisms in long-term volume overload. *Eur J Heart Fail* 18(4): 362–371.
<https://doi.org/10.1002/ehjhf.465>
 71. *Hudson B, Hidalgo C, Saripalli C, Granzier H* (2011) Hyperphosphorylation of mouse cardiac titin contributes to transverse aortic constriction-induced diastolic dysfunction. *Circ Res* 109(8): 858–866.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246819>
 72. *Hidalgo C, Granzier H* (2013) Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med* 23(5): 165–171.
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.10.005>
 73. *Røe ÅT, Aronsen JM, Skårdal K, Hamdani N, Linke WA, Danielsen HE, Sejersted OM, Sjaastad I, Louch WE* (2017) Increased passive stiffness promotes diastolic dysfunction despite improved Ca²⁺ handling during left ventricular concentric hypertrophy. *Cardiovasc Res* 113(10): 1161–1172.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx087>
 74. *Mohammed SF, Storlie JR, Oehler EA, Bowen LA, Korinek J, Lam CS, Simari RD, Burnett JC Jr, Redfield MM* (2012) Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. *Cardiovasc Pathol* 21(3): 188–198.
<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.05.002>
 75. *Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, Falk V, González-Juanathey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GM, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P* (2016) Authors/Task Force Members; Document Reviewers. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18(8): 891–975.
<https://doi.org/10.1002/ehjhf.592>. Epub 2016 May 20. PMID: 27207191
 76. *Hamdani N, Bishu KG, von Frieling-Salewsky M, Redfield MM, Linke WA* (2013) Deranged myofibrilment phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Res* 97(3): 464–471.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs353>
 77. *Falcão-Pires I, Hamdani N, Borbély A, Gavina C, Schalkwijk CG, van der Velden J, van Heerebeek L, Stienen GJ, Niessen HW, Leite-Moreira AF, Paulus WJ* (2011) Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation* 124(10): 1151–1159.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025270>
 78. *Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, Paulus WJ, Ottenheijm CA, Marcus JT, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, Macdonald P, Dos Remedios C, Postmus PE, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J, de Man FS* (2013) Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 128(18): 2016–2025.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001873>
 79. *Schwarzl M, Hamdani N, Seiler S, Alogna A, Manninger M, Reilly S, Zirngast B, Kirsch A, Steendijk P, Verderber J, Zweiker D, Eller P, Höfler G, Schauer S, Eller K, Maechler H, Pieske BM, Linke WA, Casadei B, Post H* (2015) A porcine model of hypertensive cardiomyopathy: implications for heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(9): H1407–H1418.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00542.2015>
 80. *Hochman-Mendez C, Curty E, Taylor DA* (2020) Change the Laminin, Change the Cardiomyocyte: Improve Untreatable Heart Failure. *Int J Mol Sci* 21(17): 6013.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176013>
 81. *Lam CS, Lyass A, Kraigher-Krainer E, Massaro JM, Lee DS, Ho JE, Levy D, Redfield MM, Pieske BM, Benjamin EJ, Vasan RS* (2011) Cardiac dysfunction and noncardiac dysfunction as

- precursors of heart failure with reduced and preserved ejection fraction in the community. *Circulation* 124(1): 24–30.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.979203>. Erratum in: *Circulation*. 2011 Oct 25;124(17):e458
82. *Ather S, Chan W, Bozkurt B, Aguilar D, Ramasubbu K, Zachariah AA, Wehrens XH, Deswal A* (2012) Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol* 59(11): 998–1005.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.11.040>
83. *Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J* (2012) Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(11): H2148–H2165.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00907.2011>
84. *Mohammed SF, Borlaug BA, Roger VL, Mirzoyev SA, Rodeheffer RJ, Chirinos JA, Redfield MM* (2012) Comorbidity and ventricular and vascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: a community-based study. *Circ Heart Fail* 5(6): 710–719.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.968594>
85. *Bishu K, Deswal A, Chen HH, LeWinter MM, Lewis GD, Semigran MJ, Borlaug BA, McNulty S, Hernandez AF, Braunwald E, Redfield MM* (2012) Biomarkers in acutely decompensated heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Am Heart J* 164(5): 763–770.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.08.014>
86. *Phan TT, Abozguia K, Nallur Shivu G, Mahadevan G, Ahmed I, Williams L, Dwivedi G, Patel K, Steendijk P, Ashrafian H, Henning A, Frenneaux M* (2009) Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. *J Am Coll Cardiol* 54(5): 402–409.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.012>
87. *Collier P, Watson CJ, Voon V, Phelan D, Jan A, Mak G, Martos R, Baugh JA, Ledwidge MT, McDonald KM* (2011) Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure? *Eur J Heart Fail* 13(10): 1087–1095.
<https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfr079>
88. *Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T* (1995) Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 4862–4866.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4862>
89. *Blanton RM* (2020) cGMP Signaling and Modulation in Heart Failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 75(5): 385–398.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000749>
90. *Bishu K, Hamdani N, Mohammed SF, Kruger M, Ohtani T, Ogut O, Brozovich FV, Burnett JC Jr, Linke WA, Redfield MM* (2011) Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility *in vivo*. *Circulation* 124(25): 2882–2891.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.048520>
91. *Redfield MM* (2012) Strategies to screen for stage B as a heart failure prevention intervention. *Heart Fail Clin* 8(2): 285–296.
<https://doi.org/10.1016/j.hfc.2011.12.001>
92. *Lee DI, Zhu G, Sasaki T, Cho GS, Hamdani N, Holewinski R, Jo SH, Danner T, Zhang M, Rainer PP, Bedja D, Kirk JA, Ranek MJ, Dostmann WR, Kwon C, Margulies KB, Van Eyk JE, Paulus WJ, Takimoto E, Kass DA* (2015) Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* 519(7544): 472–476.
<https://doi.org/10.1038/nature14332>
93. *Methawasin M, Strom J, Borkowski T, Hourani Z, Runyan R, Smith JE 3rd, Granzier H* (2020) Phosphodiesterase 9a Inhibition in Mouse Models of Diastolic Dysfunction. *Circ Heart Fail* 13(5): e006609.
<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006609>
94. *Alogna A, Schwarzl M, Manning M, Hamdani N, Zirngast B, Kloth B, Steendijk P, Verderber J, Zweiker D, Westermann D, Blankenberg S, Maechler H, Tschöpe C, Linke WA, Marsche G, Pieske BM, Post H* (2018) Acute stimulation of the soluble guanylate cyclase does not impact on left ventricular capacitance in normal and hypertrophied porcine hearts *in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315(3): H669–H680.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00510.2017>
95. *Kolijn D, Kovács Á, Herwig M, Lódi M, Sieme M, Alhaj A, Sandner P, Papp Z, Reusch PH, Haldenwang P, Falcão-Pires I, Linke WA, Jaquet K, Van Linthout S, Mügge A, Tschöpe C, Hamdani N* (2020) Enhanced Cardiomyocyte Function in Hypertensive Rats With Diastolic Dysfunction

and Human Heart Failure Patients After Acute Treatment With Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Activator. *Front Physiol* 11: 345.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00345>

96. *Armstrong PW, Roessig L, Patel MJ, Anstrom KJ, Butler J, Voors AA, Lam CSP, Ponikowski P, Temple T, Pieske B, Ezekowitz J, Hernandez AF, Koglin J, O'Connor CM* (2018) A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Efficacy and Safety of the Oral Soluble Guanylate Cyclase Stimulator: The VICTORIA Trial. *JACC Heart Fail* 6(2): 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.08.013>
97. *Armstrong PW, Lam CSP, Anstrom KJ, Ezekowitz J, Hernandez AF, O'Connor CM, Pieske B, Ponikowski P, Shah SJ, Solomon SD, Voors AA, She L, Vlainic V, Carvalho F, Bamber L, Blaustein RO, Roessig L, Butler J; VITALITY-HFpEF Study Group* (2020) Effect of Vericiguat vs Placebo on Quality of Life in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: The VITALITY-HFpEF Randomized Clinical Trial. *JAMA* 324(15): 1512–1521. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15922>. Erratum in: *JAMA*. 2021 Feb 2;325(5):494
98. *Slater RE, Strom JG, Methawasin M, Liss M, Gotthardt M, Sweitzer N, Granzier HL* (2019) Metformin improves diastolic function in an HFpEF-like mouse model by increasing titin compliance. *J Gen Physiol* 151(1): 42–52. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812259>
99. *Li B, Zheng Z, Wei Y, Wang M, Peng J, Kang T, Huang X, Xiao J, Li Y, Li Z* (2011) Therapeutic effects of neuregulin-1 in diabetic cardiomyopathy rats. *Cardiovasc Diabetol* 10: 69. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-69>

The Role of Titin Phosphorylation in Changes in Myocardial Stiffness in Cardiomyopathies

G. Z. Mikhailova^a, I. M. Vikhlyantsev^{a*}, and V. L. Lakomkin^b

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, Russia*

^b*National Cardiology Research Center, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com*

The review provides a brief analysis of current knowledge about such post-translational modification of titin as phosphorylation, with an emphasis on the changes that occur during the development of heart diseases. Studies conducted using animal models of heart disease, as well as using biomaterial from cardiac tissue from patients with various pathologies, show changes in the level of titin phosphorylation in comparison with healthy controls. As a rule, hyperphosphorylation of the S11878 site and hypophosphorylation of the S12022 site in the PEVK sequence of titin are observed, as well as changes in the level of phosphorylation of sites in the N2B sequence of this protein during the development of pathological changes. The functional effect of these changes is an increase in the stiffness of cardiomyocytes and cardiac muscle as a whole, which is based on the viscoelastic properties of titin, changes in which, in turn, are observed due to hypo- or hyperphosphorylation of certain sites of this protein. The review also provides a description of a number of therapeutic interventions aimed at changing the level of titin phosphorylation, which are considered as a way to change the viscoelastic properties of pathological myocardium in order to normalize its contractility.

Keywords: cardiac muscle, titin, phosphorylation, heart diseases