

УДК 577.353.2

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ мРНК ТИТИНА В *M. SOLEUS* КРЫСЫ ПОСЛЕ СЕМИСУТОЧНОЙ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2021 г. А. М. Ермаков¹, Ю. В. Грицына¹, С. П. Белова²,
Т. Л. Немировская², Б. С. Шенкман², И. М. Вихлянцев^{1,3, *}

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

²ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия

³ФГБЩУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт,
Московская обл., Пущино, Россия

*E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 08.02.2021 г.

После доработки 09.03.2021 г.

Принята к публикации 23.03.2021 г.

Методами ПЦР длинных фрагментов и нанопорового секвенирования исследованы изменения альтернативного сплайсинга мРНК титина в *m. soleus* крысы после семисуточной гравитационной разгрузки (модель вывешивания задних конечностей). Обнаружено увеличение доли более коротких транскриптов титина в *m. soleus* вывешенных крыс, что может приводить к трансляции более коротких вариантов N2A-изоформы этого белка. В ядерной фракции *m. soleus* контрольных и вывешенных крыс не выявлено достоверных различий в содержании Rbm20 – РНК-связывающего белка, участвующего, как показано ранее, в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК титина в сердечной мышце млекопитающих. Можно предположить, что Rbm20 не участвует в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК титина в скелетной мышце *m. soleus* у крысы.

Ключевые слова: гравитационная разгрузка, *m. soleus*, титин, альтернативный сплайсинг, секвенирование.

DOI: 10.31857/S0131164621040020

Титин (тайтин/коннектин) – самый большой из известных на сегодняшний день белков. Он относится к эластичным белкам саркомерного цитоскелета поперечнополосатых мышц позвоночных животных и человека. В саркомерах сердечной и скелетных мышц млекопитающих титин является третьим по количеству (после актина и миозина) белком. Его молекулы диаметром 3–4 нм и длиной более 1 мкм [1] перекрывают половину саркомера от *M*-линии до *Z*-диска, формируя третий тип нитей [2, 3], получивших название эластичных. В *A*-зоне саркомера титин взаимодействует с миозиновыми нитями [4]. В *I*-диске саркомера некоторые части молекулы титина взаимодействуют с актиновыми нитями [5], однако большая часть его молекулы в этой зоне проходит свободно, соединяя концы миозиновых нитей с *Z*-диском. Главные функции титина заключаются в стабилизации саркомерной структуры, регуляции актин-миозинового взаимодействия, а также придании мышце упруго-эластичных свойств, необходимых ей для нормального функционирования: сокращения и растяжения [3, 6].

У млекопитающих титин кодируется одним геном, который содержит 364 экзона, из которых 363 являются кодирующими [7–9]. Ген титина (*TTN*) способен потенциально кодировать белок с молекулярной массой 4.2 МДа в состав которого могут входить: 152 иммуноглобулин-подобных домена (Ig), 132 фибронектин III-подобных домена (FnIII), протеинкиназный домен, 31 домен PEVK и 7 *Z*-повторов (UniProtKB – Q8WZ42, TITIN_HUMAN). Альтернативный сплайсинг мРНК титина является основой разнообразия изоформ этого белка. В частности, растяжимая часть молекулы титина в *I*-зоне саркомера у разных изоформ имеет массу от ~0.8 до ~1.5 МДа в зависимости от количества присутствующих в ней доменов [10]. Ген *TTN* генерирует различные транскрипты, кодирующие разные по длине и, соответственно, молекулярной массе изоформы титина: так называемые полноразмерные изоформы с м.м. ~3.0–3.9 МДа (N2B и N2BA в сердце, N2A в скелетных мышцах), молекулы которых протягиваются от *M*-линии до *Z*-диска в саркомерах, а также укороченную изоформу с м.м. ~0.7 МДа (Novex-3) [7, 11].

N-конец этой короткой изоформы титина расположен в *Z*-диске, а *C*-конец, предположительно, связывается в *I*-зоне саркомера с обскурином — другим гигантским эластичным белком поперечнополосатых мышц млекопитающих [7, 12]. Недавно обнаружена еще одна укороченная изоформа титина, получившая название *Stopos* (м.м. ~2.2 МДа) [13, 14]. Эта изоформа возникает в результате альтернативного сайта старта транскрипции >150 т. п. н., расположенного дальше от канонического промотора в интроне 239 *TTN*. Предполагается, что *Stopos* состоит из доменов дистальной *I*-зоны, *A*-зоны и *M*-линии молекулы титина [15].

Проведенные за последние 20 лет исследования показали, что титин является интересным объектом для изучения при различных адаптационных и патологических состояниях, в том числе, при гравитационной разгрузке. Исследования в этом направлении выявили, что развитие мышечной атрофии в условиях гравитационной разгрузки сопровождается повышенным протеолизом титина и снижением его содержания как в мышцах человека [16], так и животных [17–21]. При этом обнаружены изменения изоформного состава тяжелых цепей миозина (ТЦМ): увеличение доли “быстрых” изоформ II ТЦМ и уменьшение доли “медленной” I изоформы ТЦМ [22, 23]. Изменения изоформного состава титина, индуцируемые гравитационной разгрузкой, не выявлены. Тем не менее, они вполне вероятны. Это предположение основывается на следующих данных. Показано, что в скелетной мышце *m. soleus*, состоящей преимущественно из волокон, содержащих “медленную” изоформу I ТЦМ, экспрессируется вариант N2A-изоформы с молекулярной массой 3.7 МДа [7, 11, 24, 25]. В других скелетных мышцах, состоящих преимущественно из волокон, содержащих “быстрые” изоформы II ТЦМ, экспрессируются варианты N2A-изоформы с м.м. ~3.3–3.6 МДа, которые имеют более короткую последовательность из Ig-доменов в *I*-зоне саркомера [7, 11, 24, 25]. Учитывая эти данные, а также вышеупомянутые “*slow-to-fast*” изменения изоформного состава ТЦМ [22, 23], можно предположить, что в *m. soleus* крысы в условиях гравитационной разгрузки должно наблюдаться увеличение доли или появление транскриптов, кодирующих более короткие варианты основной (с м.м. 3.7 МДа) N2A-изоформы титина. Проверка этого предположения являлась главной задачей настоящей работы. Второй задачей являлось исследование возможного влияния Rbm20 (РНК-связывающего белка) на альтернативный сплайсинг мРНК титина в *m. soleus* крысы. Эта задача была поставлена в связи с ранее опубликованными данными, указывающими на участие Rbm20 в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК титина в сердечной мышце млекопитающих [26].

МЕТОДИКА

Для определения возможных вариантов сплайсинга транскриптов титина были использованы образцы камбаловидной мышцы (*m. soleus*), взятые из эксперимента, проведенного в 2019 г., по моделированию семисуточной гравитационной разгрузки у крыс. Использовали самцов крыс Вистар (210 ± 10 г, виварий ИТЭБ РАН, г. Пушкино). Моделирование функциональной разгрузки проводили по стандартной методике Ильина–Новикова в модификации *Morey–Holton* [27, 28] — вывешивание задних конечностей крысы. После эвтаназии крыс трибромэтанолом (240 мг/кг интраперитонеально, *Sigma–Aldrich*) *m. soleus* взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -75°C . Более подробное описание этой методической части представлено в работе [29].

Для определения вариантов сплайсинга транскриптов титина использовали метод ПЦР длинных фрагментов. Суммарную РНК экстрагировали из 4–6 мкг замороженной *m. soleus* при помощи набора *RNeasyMicroKit* (*QIAGEN*, Германия) по протоколу изготовителя. Определение концентрации РНК проводили на спектрофотометре *UV 2450* (*SHIMADZU*, Япония). Показания снимали в диапазоне от 200 до 320 нм. Пробу перед измерением разводили в 21 раз в ТЕ-буфере (10 мМ трис, 1 мМ ЭДТА, рН 8.0). Измерение каждой пробы проводили не менее трех раз в кювете для микрообъемов. Чистоту образцов оценивали исходя из соотношений показателей поглощения при различных длинах волн. Соотношение A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} экспериментальных образцов было >2.0, это указывало на то, что они являлись достаточно чистыми от белков, углеводов, пептидов, фенолов или ароматических соединений [30].

Обратную транскрипцию проводили с использованием высоко процессивной обратной транскриптазы *Maxima H minus* (*Thermo*, США), при этом в качестве праймеров использовали случайные гексануклеотиды (в концентрации 25 пмоль на реакцию) и oligo(dT) праймер (в концентрации 25 пмоль на реакцию) с последовательностью 5'-ACTTGCCTGTGCTC-TATCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'.

Образцы для секвенирования транскриптов титина подготавливали с использованием метода ПЦР длинных фрагментов (длина ампликона достигает более 10000 п. н.). Для этого весь транскрипт титина был разбит на фрагменты, последовательно включающие следующие экзоны: 1–40, 40–50, 49–78, 78–116, 115–175, 175–221, 220–258, 257–287, 281–290, 289–297, 296–317, 316–328. К фрагментам с помощью программы *Primer3* подбирали праймеры для последующей амплификации данных фрагментов с перекрытиями для каждого последующего фрагмента около 100 нп.

Праймеры были следующие:

с 1 по 40 экзон (9563 п. н.) 1–40 F TCGGAGATGGTTGGA AAAAC; 1–40 R GGACATCCCTG-CCTTCTACA; 40 по 50 экзон (9559–14645) 40–50 F AATATGTCCACCGCCTTCTG; 40–50 R CATTAGCCACCACACATTCG (5025 п. н.); с 49 по 78 экзон (14085–22526) 49–78 F CCTCCATTG-CAAGCTGAAAG; 49–78 R CGTTAGTGGCTTTG-CAGTGA (8336 п. н.); с 78 по 116 экзон (22248–30668) 78–116 F AGTGTGAGATTTCCGGGAACG; 78–116 R CGGTGTGAGAGGCAAAGAAC (8334 п. н.); со 115 по 175 экзон (30504–36311) 115–175 F AAAAAACCTTCCCGGACTC; 115–175 R GCACTTTTACGCGGTGTAGGC (5702 п. н.); со 175 по 221 экзон (36231–45395) 175–221 F GCCACAGCTGAAAAGAAAG; 175–221 R CTTTGTGATGTCGGAAGGT (8909 п. н.); с 220 по 258 экзон (45093–55094) 220–258 F GACCTC-CAACTCGCCTAGAA; 220–258 R GTCTGGC-SATCTCTGAGACC (9904 п. н.); с 257 по 282 экзон (54483–64778) 257–282 F CCAAAGGCATATC-CATCCA; 257–282 R TCAGACTGAACGG-GTTCTCC (10117 п. н.); с 281 по 290 экзон (63894–73234) 281–290 F GGTGGCCATAAATG-GACAGG; 281–290 R TAAATCGCGTTTCT-CAACGA (9219 п. н.); с 289 по 297 экзон (73067–83699) 289–297 F TGGACCAAACCTGTGTACGA; 289–297 R GCTCGGACTCGGAAGATGTA (10511 п. н.); с 296 по 317 экзон (83112–93488) 296–317 F CGAGCCTACGATTTGAGTGGT; 296–317 R TCTGCTGAGACACGGAAATG (10215 п. н.); с 316 по 328 экзон (92601–103961) 316–328 F GGGAAAACCCACAAAATCCAA; 316–328 R CAGCTTCATTGGTGGTGATG (11201 п. н.). Для повышения качества покрытия дополнительно амплифицировали 5' конец кДНК с прямым праймером 316–328 F и обратным праймером с последовательностью АСТТGCCTGTC-GCTCTATCTTC.

ПЦР на основе полученной кДНК проводили, используя набор для ПЦР *LongAmp MasterMix* (NEB, Великобритания), который позволяет получить длинные ампликоны. Реакцию проводили по схеме 95°C – 5 мин, 95°C – 15 с, 60°C – 20 с, 65°C – 9 мин (35 циклов) и 65°C – 9 мин (финальная элонгация). Ампликоны анализировали с помощью агарозного гель-электрофореза.

Нанопоровое секвенирование. Библиотеку для секвенирования на основе полученных ампликонов готовили с помощью набора *Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)*, согласно прилагаемым протоколам. Для мультиплексирования библиотек ампликонов использовали набор *Native Barcoding Expansion 1–12 (PCR-free) (EXPND104, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)*, который позволяет произвести баркодирование до 12 образцов. Процедуру баркодирования осуществляли согласно прилагаемым протоколам. Секвенирование проводили на приборе *MinION (Oxford*

Nanopore Technologies, Великобритания), используя проточную ячейку *R9.4.1 (FLO-MIN106D, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)* и программное обеспечение *MinKNOW (v. 19.12.5, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)*. Секвенирование проводили до достижения объема данных 2 Гбаз.

Анализ полученных данных секвенирования. Полученные первичные данные обрабатывали и демультиплексировали с помощью бейзколлера *Guppy 4.0.0 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания)*. Анализ результатов секвенирования производили программой *minimap2*, с помощью которой выполняли выравнивание отсеквенированных последовательностей на референсную последовательность – полноразмерную сборку предсказанного транскрипта титина крысы (XM_039106393.1). Генерацию консенсусных последовательностей и визуализацию данных выполняли программой *Unipro UGENE*.

Вестерн-блоттинг Rbm20. С целью выяснения возможной роли Rbm20 в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК титина, методом Вестерн-блоттинга определяли содержание этого белка в ядерной фракции *m. soleus* крысы. Для экстракции ядерной фракции использовали набор “*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*” (*Thermo Scientific*). Перед проведением ДСН-гель-электрофореза определяли концентрацию суммарного белка методом Бредфорда по протоколу изготовителя (“Силекс”, Россия). В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин. На дорожки наносили одинаковые объемы образцов, выравненных по концентрации суммарного белка. Образцы экспериментальных групп загружались на один гель с маркерами молекулярных весов. ДСН-гель-электрофорез Rbm20 и Lamin B (ядерного референсного белка) проводили в 10-процентном разделяющем ПААГ по методу [31], используя минисистему “*Bio-Rad Laboratories*” или “*Helicon*” (Россия) (размер геля 10.0 × 10.0 × 0.1 см). Электрофорез проводили при силе тока 15 мА при температуре +20–22°C. После электрофореза гели переносили в установку для электропереноса белков на мембрану. Электроперенос проводили в буфере (25 мМ Tris (pH 8.3), 192 мМ глицин, 20-процентный этанол, 0.04-процентный Ds-Na) на PVDF мембрану при силе тока 100 мА в течение 2–3 ч при температуре 4°C в системе *mini Trans-Blot (“Bio-Rad Laboratories”)*. После электропереноса PVDF мембраны блокировали в растворе 5-процентного сухого молока (“*Bio-Rad Laboratories*”) в PBS буфере 1 ч при комнатной температуре, затем помещали в раствор первичных антител на 2 ч. Для выявления белковых полос были использованы следующие первичные антитела: к Rbm20 (Rbm20 Polyclonal Antibody PA5-19403, ThermoFisher Scientific, 1 : 500), к



Рис. 1. Результаты выравнивания последовательностей секвенированных ампликонов (серые линии) транскриптов титина на референсную последовательность титина крысы (XM_039106393.1); *m. soleus* крыс контрольной группы. Слева и справа показаны начало и конец, соответственно, последовательности референса, которая представлена в последовательностях ампликонов. Цифрами обозначены номера экзонов.

Lamin B (ab16048, Abcam, 1 : 500). Мембраны отмывали от первичных антител в PBS буфере 3 раза по 5 мин на шейкере и инкубировали 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой (ab97048, Abcam, 1 : 3000). Для визуализации белковых полос использовали раствор *NBT/BCIP* (“Roche”, Германия). PVDF мембраны фотографировали, а затем проводили денситометрическую обработку с помощью компьютерной программы *Total Lab v. 1.11* (Newcastle Upon Tyne, Великобритания). Содержание Rbm20 нормировали на содержание Lamin B (ядерного референсного белка).

Статистическую обработку результатов по изменению содержанию Rbm20 проводили с использованием непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 и 2 показаны результаты выравнивания, полученные в результате секвенирования ампликонов транскрипта титина из образцов контрольной группы ($n = 3$) и группы с 7-суточным вывешиванием ($n = 3$). Полных сборок тран-

скрипта получить не удалось, и поэтому пока невозможно провести количественную оценку о степени вероятности присутствия или отсутствия того или иного экзона в полученных транскриптах. Однако анализ данных картирования показал, что во всех исследуемых образцах наблюдается чрезвычайно разнообразная картина вариантов транскриптов, которые включают различное количество экзонов в сравнении с референсным транскриптом титина крысы (XM_039106393.1). В целом, можно отметить следующие закономерности распределения количества транскриптов титина в *m. soleus* крысы. У большинства мРНК-транскриптов титина *m. soleus* крысы отсутствовали экзоны с 50 по 78, с 220 по 257, 283, 284, а также отсутствовала последовательность экзонов с 297 и до конца референсного транскрипта титина. Последнее, по всей видимости, является следствием того, что не прошло полноценное амплифицирование 3'-концевой последовательности мРНК.

Однако наблюдались и отличительные особенности транскрипционных вариантов мРНК титина *m. soleus* контрольных и вывешенных крыс. В частности, примерно 20% мРНК-транскриптов титина *m. soleus* контрольной группы имели более длинные последовательности, со-



Рис. 2. Результаты выравнивания последовательностей секвенированных ампликонов (серые линии) транскриптов титина на референсную последовательность титина крысы (XM_039106393.1); *m. soleus* вывешенных крыс. Пояснения см. рис. 1.

держат экзоны с 50 по 78, с 220 по 257, 283 и 284 (рис. 1). Такие более длинные мРНК-транскрипты не наблюдались или были представлены в значительно меньшем количестве в *m. soleus* вывешенных крыс (рис. 2). Кроме этого, примерно 50% мРНК-транскриптов титина *m. soleus* вывешенных крыс не содержали экзоны с 290 по 297, которые всегда присутствовали в контрольных мРНК-транскриптах (рис. 1, 2).

Таким образом, обнаружили, что семисуточная гравитационная разгрузка сопровождается изменениями альтернативного сплайсинга мРНК титина в сторону увеличения доли более коротких транскриптов в *m. soleus* крысы. Можно полагать, что эти изменения будут приводить к трансляции (синтезу) и более коротких вариантов N2A-изоформы титина в *m. soleus* вывешенных крыс, по сравнению с животными контрольной группы.

Обсуждая полученные результаты, необходимо отметить следующее. В опубликованной работе [32], был исследован альтернативный сплайсинг мРНК титина в 12 скелетных мышцах, в том числе и в *m. soleus*, у человека. Проведение РНК-секвенирования (одноконцевые прочтения) на приборе *NextSeq500* с последующим анализом данных с помощью различных биоинформатических программ показало, что ряд экзонов титина имели невысокую вероятность включения, иными словами — повышенную вероятность пропуска в процессе альтернативного сплайсинга мРНК титина. В частности, вероятность включения в

транскрипты мРНК таких экзонов как: 150, 159, 167–171, 213–217 составляла от 2 до 26% [32]. При этом экзоны 160–166 отсутствовали в транскриптах мРНК титина скелетных мышц человека. Сравнивая эти результаты с полученными нами, можно заметить несовпадение “выпадающих” экзонов в мРНК-транскриптах человека и крысы. Это, по-видимому, является следствием видовых различий альтернативного сплайсинга мРНК титина.

На рис. 3 представлены результаты Вестерн-блот анализа содержания Rbm20 в ядерной фракции *m. soleus* крыс двух исследуемых групп. Принимая во внимание полученные нами данные об изменениях альтернативного сплайсинга мРНК титина в *m. soleus* крыс в условиях гравитационной разгрузки (рис. 1, 2), можно предположить, что должно происходить увеличение содержания Rbm20 в ядерной фракции камбаловидной мышцы вывешенных крыс. Это предположение было сделано на основании данных, полученных в работе [26], в которой авторы выявили корреляцию между содержанием Rbm20 в ядерной фракции кардиомиоцитов крысы и содержанием более коротких или более длинных изоформ титина. В работе [26] было использовано 3 группы крыс: контрольная группа; крысы с гетерозиготной мутацией в гене белка Rbm20 (содержание данного белка было достоверно снижено в отличие от контроля); крысы с гомозиготной мутацией в гене данного белка (Rbm20 не экспрессировался). Было обнаружено, что у гетерозиготных крыс при

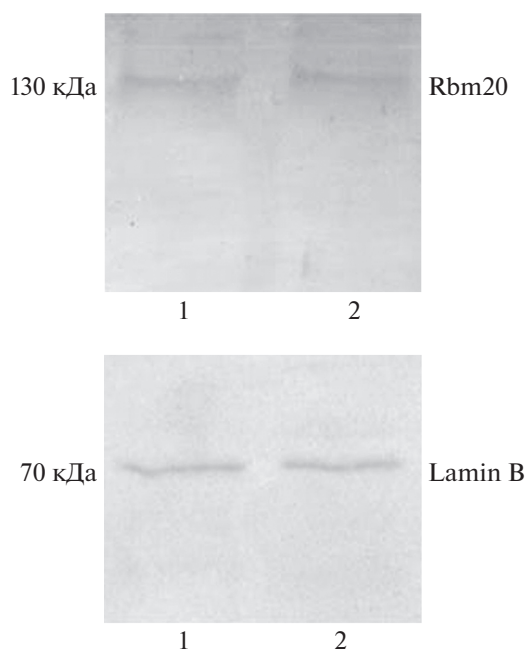


Рис. 3. Содержание мРНК-связывающегося белка Rbm20 в ядерной фракции *m. soleus* крысы. 1 – контроль ($n = 7$); 2 – 7-суточное вывешивание ($n = 7$). Статистически значимых различий в содержании Rbm20 в ядерной фракции камбаловидной мышцы исследуемых групп крыс не выявлено. Lamin B – референсный белок.

уменьшении содержания Rbm20 наблюдалось увеличение содержания более длинной N2BA изоформы титина (м.м. ~ 3.3 МДа) и уменьшение содержания более короткой N2B изоформы этого белка (м.м. ~ 3.0 МДа). У гомозиготных крыс (у которых Rbm20 не синтезировался) экспрессировалась только одна – наиболее длинная N2BA-G изоформа титина с молекулярной массой ~ 3.9 МДа [26]. Учитывая эти данные можно было ожидать, что обнаруженное нами увеличение доли более коротких мРНК-транскриптов титина будет сопровождаться увеличением содержания Rbm20 в ядерной фракции *m. soleus* вывешенных крыс. Полученные результаты не подтвердили это предположение. Не выявлено статистически значимых различий в содержании Rbm20 в ядерной фракции *m. soleus* крыс контрольной группы ($n = 7$) и группы 7-суточного вывешивания ($n = 7$) (рис. 3). Можно сделать предположение, что Rbm20 не участвует в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК титина в скелетной мышце *m. soleus* у крысы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, впервые были выявлены изменения альтернативного сплайсинга мРНК титина в *m. soleus* крысы в условиях моделируемой гравитационной

разгрузки. Было обнаружено, что семисуточная гравитационная разгрузка сопровождается изменениями альтернативного сплайсинга мРНК титина в сторону увеличения доли более коротких транскриптов в *m. soleus* крысы. По всей вероятности, эти изменения будут приводить к трансляции и более коротких вариантов N2A-изоформы титина в *m. soleus* вывешенных крыс, по сравнению с животными контрольной группы.

Предположение о том, что вышеуказанные изменения будут сопровождаться увеличением содержания Rbm20 в ядре, не подтвердилось. По всей вероятности, этот РНК-связывающийся белок не участвует в регуляции альтернативного сплайсинга мРНК титина в *m. soleus* крысы. Однако это предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Этические нормы. Исследования проведены в соответствии с принципами биоэтики, сформулированными в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино), протокол № 24/2019 от 05 апреля 2019 г.

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-15-00062 с использованием оборудования регионального пушинского центра коллективного пользования “Структурно-функциональные исследования биосистем” Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (Пушино).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tskhovrebova L., Trinick J. Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules // J. Mol. Biol. 1997. V. 265. № 2. P. 100.
2. Fürst D.O., Osborn M., Nave R., Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line // J. Cell Biol. 1988. V. 106. № 5. P. 563.
3. Li Y., Hessel A.L., Ungeret A. et al. Graded titin cleavage progressively reduces tension and uncovers the source of A-band stability in contracting muscle // Elife. 2020. V. 9. P. e64107.
4. Houmeida A., Holt J., Tskhovrebova L., Trinick J. Studies of the interaction between titin and myosin // J. Cell Biol. 1995. V. 131. № 6. Pt. 1. P. 1471.
5. Freundt J.K., Linke W.A. Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control // J. Appl. Physiol. (1985). 2019. V. 126. № 5. P. 1474.

6. *Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A.* New titin (connec-tin) isoforms and their functional role in striated mus-cles of mammals: facts and suppositions // *Biochemis-try (Mosc.)*. 2012. V. 77. № 13. P. 1515.
7. *Bang M.L., Centner T., Fornoff F. et al.* The complete gene sequence of titin, expression of an unusual ap-proximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identity a novel Z-line to I-band linking system // *Circ. Res.* 2001. V. 89. № 11. P. 1065.
8. *Guo W., Sun M.* RBM20, a potential target for treat-ment of cardiomyopathy via titin isoform switching // *Biophys. Rev.* 2018. V. 10. № 1. P. 15.
9. *Chen Z., Maimaiti R., Zhu C. et al.* Z-band and M-band titin splicing and regulation by RNA binding motif 20 in striated muscles // *Cell. Biochem.* 2018. V. 119. № 12. P. 9986.
10. *Ottenheijm C.A., Granzier H.* Role of titin in skeletal muscle function and disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 682. P. 105.
11. *Freiburg A., Trombitas K., Hell W. et al.* Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity // *Circ. Res.* 2000. V. 86. № 11. P. 1114.
12. *Randazzo D., Pierantozzi E., Rossi D., Sorrentino V.* The potential of obscurin as a therapeutic target in muscle disorders // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2017. V. 21. № 9. P. 897.
13. *Zou J., Tran D., Baalbaki M. et al.* An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of titin in ze-brafish // *Elife.* 2015. V. 4. P. e09406.
14. *Swist S., Unger A., Li Y. et al.* Maintenance of sarcomeric integrity in adult muscle cells crucially depends on Z-disc anchored titin // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 4479.
15. *Zaunbrecher R.J., Abel A.N., Beussman K. et al.* Cronos titin is expressed in human cardiomyocytes and neces-sary for normal sarcomere function // *Circulation.* 2019. V. 140. № 20. P. 1647.
16. *Shenkman B.S., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M. et al.* Human soleus fibers contractile characteristics and sar-comeric cytoskeletal proteins after gravitational un-loading. Contribution of support stimulus // *Biophys-ics.* 2004. V. 49. № 5. P. 807.
17. *Toursel T., Stevens L., Granzier H., Mounier Y.* Passive tension of rat skeletal soleus muscle fibers: effects of un-loading conditions // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002. V. 92. № 4. P. 1465.
18. *Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L., Belozeroва I.N. et al.* Effects of Ca²⁺(-)binding agent on unloaded rat soleus: muscle morphology and sarcomeric titin content // *J. Gravit. Physiol.* 2002. V. 9. № 1. P. 139.
19. *Udaka J., Ohmori S., Terui T. et al.* Disuse-induced pref-erential loss of the giant protein titin depresses muscle per-formance via abnormal sarcomeric organization // *J. Gen. Physiol.* 2008. V. 131. № 1. P. 33.
20. *Ulanova A., Gritsyna Y., Vikhlyantsev I. et al.* Isoform composition and gene expression of thick and thin fila-ment proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 104735.
21. *Ulanova A., Gritsyna Y., Salmov N. et al.* Effect of L-ar-ginine on titin expression in rat soleus muscle after hindlimb unloading // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. P. 1221.
22. *Gallagher P., Trappe S., Harber M. et al.* Effects of 84-days of bedrest and resistance training on single muscle fibre myosin heavy chain distribution in hu-man vastus lateralis and soleus muscles // *Acta Physi-ol. Scand.* 2005. V. 185. № 1. P. 61.
23. *Lomonosova Y.N., Turtikova O.V., Shenkman B.S.* Re-duced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of en-dogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2016. V. 37. № 1–2. P. 7.
24. *Guo W., Bharmal S.J., Esbona K., Greaser M.L.* Titin di-versity – alternative splicing gone wild // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. V. 2010. P. 753675.
25. *Neagoe C., Opitz C.A., Makarenko I., Linke W.A.* Gi-gantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar pas-sive stiffness // *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2003. V. 24. № 2–3. P. 175.
26. *Guo W., Schafer S., Greaser M.L. et al.* RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing // *Nat. Med.* 2012. V. 18. № 5. P. 766.
27. *Novikov V.E., Ilyin E.A.* Age-related reactions of rat bones to their unloading // *Aviat. Space Environ. Med.* 1981. V. 52. № 9. P. 551.
28. *Globus R.K., Morey-Holton E.* Hindlimb unloading: ro-dent analog for microgravity // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2016. V. 120. № 10. P. 1196.
29. *Gritsyna Yu.V., Ulanova A.D., Popova S.S. et al.* Inhibi-tion of histone deacetylases 4 and 5 reduces titin prote-olysis and prevents reduction of TTN gene expression in atrophied rat soleus muscle after seven-day hindlimb unloading // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 495. № 1. P. 338.
30. *Viljoen G.J., Nel L.H., Crowther J.R.* Molecular diag-nostic PCR handbook. Springer, The Netherlands. 2005. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0>
31. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680.
32. *Savarese M., Jonson P.H., Huovinen S. et al.* The com-plexity of titin splicing pattern in human adult skeletal muscles // *Skeletal Muscle.* 2018. V. 8. № 1. P. 11.

Alternative Splicing of Titin mRNA in Rat Soleus after Seven-Day Gravitational Unloading

A. M. Ermakov^a, Yu. V. Gritsyna^a, S. P. Belova^b, T. L. Nemirovskaya^b,
B. S. Shenkman^b, I. M. Vikhlyantsev^{a, c, *}

^a*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Moscow region, Pushchino, Russia*

^b*Institute of Biomedical Problems of RAS, Moscow, Russia*

^c*Pushchino State Institute of Natural Sciences, Moscow region, Pushchino, Russia*

*E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

Changes in titin alternative splicing in rat soleus after seven-day gravitational unloading (hindlimb unloading model) were studied by long-fragment PCR and nanopore sequencing. An increase in the proportion of shorter titin mRNA transcripts was found in m. soleus of hindlimb suspended rats, which may lead to the translation of shorter variants of the N2A isoform of this protein. In the nuclear fraction of m. soleus of control and hindlimb suspended rats, no significant differences were found in the content of Rbm20, an RNA-binding protein involved, as shown earlier, in the regulation of titin alternative splicing in mammalian cardiac muscle. It can be assumed that Rbm20 is not involved in the regulation of titin alternative splicing in rat soleus muscle.

Keywords: gravitational unloading, m. soleus, titin, alternative splicing, sequencing.