

## ОБ АМИЛОИДНЫХ СВОЙСТВАХ ТИТИНА

©2017 г. Э. И. ЯКУПОВА<sup>1,2</sup>, И. М. ВИХЛЯНЦЕВ<sup>1,2</sup>,  
М. Ю. ЛОБАНОВ<sup>3</sup>, О. В. ГАЛЗИТСКАЯ<sup>3</sup>,  
А. Г. БОБЫЛЁВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Пуццино, Россия;*

<sup>2</sup> *ФГБОУ ВПО Пуццинский государственный естественно-  
научный институт, Пуццино, Россия;*

<sup>3</sup> *Институт белка РАН, Пуццино, Россия*

I. Введение. II. Структурно-функциональные особенности титина и его доменов. III. Роль титина в механических свойствах мышечных клеток. Регуляция жесткости молекулы титина в саркомере. Функциональная роль идентичности аминокислотной последовательности титиновых доменов. IV. Агрегационные свойства титина *in vitro* и *in vivo*. Механизмы защиты клеток от агрегации титина. V. О возможной функциональной роли амилоидной агрегации титина в саркомере. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

История изучения амилоидов берет начало в 1639 г., когда Николао Фонтано описал сильно увеличенную селезенку человека, содержащую крупные белые включения, являющиеся, по-видимому, амилоидными отложениями [1]. Спустя 150 лет в 1789 г. Антуаном Порталем впервые был описан амилоидоз печени [2]. В 1854 г. Рудольфом Вирховым при исследовании включений в «восковой» печени были обнаружены структуры, которые окрашивались йодом подобно крахмальным зернам у растений. Этим структурам Вирхов дал название «амилоиды» от латинского «amylum» или греческого «amylon», что означает крахмал. Однако в 1859 г. Карл Фрейдрих и Август Кекуле показали, что в этих включениях нет углеводных

---

*Принятые сокращения:* A $\beta$ -пептид – амилоидный  $\beta$ -пептид; Ig – иммуноглобулин-подобный домен титина; FnIII – фиброннектин III-подобный домен титина.

*Адреса для корреспонденции:* yakupova.mira@mail.ru; ivanvikhlyantsev@gmail.com; bobylev1982@gmail.com.

Работа выполнена при поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант 01201353567).

составляющих, и они содержат белки. Эти данные заложили основу изучения амилоидов как белковых образований [3, 4].

Принято считать, что амилоиды – это белковые агрегаты, имеющие кросс- $\beta$  структуру, способные связываться с красителями тиофлавином Т и Конго красным, имеющие двойное лучепреломление в поляризованном свете, а также обладающие устойчивостью к воздействию растворителей и протеаз [5–8]. К настоящему времени известно более тридцати белков/пептидов, формирующих амилоиды, обнаруживаемые у человека при различных заболеваниях [8, 9]. Показано, что амилоиды играют центральную роль в патогенезе болезней Альцгеймера, Паркинсона, диабета II типа, прионных заболеваний, а также системных амилоидозов [6, 10–12]. Амилоидные отложения обнаружены в интиме и меди сосудов при амилоидозе аорты и в поперечно-полосатых мышцах при миокардитах, миозитах, кардиомиопатиях [13–15]. В частности, в сосудах обнаружены амилоидные агрегаты, формируемые сывороточным белком А и его фрагментами, которые накапливаются в интиме и меди артериол, под эндотелием венул [13]. При амилоидозе аорты обнаружены амилоиды медины [14]. В сердечной мышце найдены амилоиды таких белков как транстиретин, легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, сывороточный амилоид-А, аполипопротеин АIV,  $\alpha$ -цепь фибриногена и предсердный натрийуретический фактор, которые вносят вклад в развитие «амилоидной кардиомиопатии» или «амилоидоза сердца» [15, 16]. Амилоидные отложения, содержащие А $\beta$ -пептид, обнаружены при миозитах в скелетных мышцах [8]. Однако в настоящее время парадигма о том, что амилоиды – негативные для клетки образования и являются только лишь причиной развития патологических процессов в живых системах, пересматривается. Появились работы, демонстрирующие, что амилоиды могут играть и положительную роль в организме, в частности, у прокариот были обнаружены функциональные амилоиды таких белков как: курлин (curli, *E. Coli*) [17], тафи (tafi, *Salmonella spp.*) [18], чаплины (chaplins, *Streptomyces coelicolor*) [19]. Исследования показали, что амилоиды этих белков участвуют в процессах адгезии клеток, в формировании биопленок, а амилоиды чаплины участвуют в процессах образования воздушных гиф и рассеивании спор [20]. Функциональные амилоиды открыты и у эукариотических организмов: на поверхности спор и плодовых тел некоторых грибов амилоидные агрегаты формируют плотные гидрофобные монослои [21]; у бабочки *Antheraea polyphemus* амилоиды выполняют защитную функцию хориона (оболочки яйца) [22]; амилоиды спидроина входят в состав паутиновых нитей [23]. Из-

вестны функциональные амилоидные фибриллы у млекопитающих, формирующиеся в меланосомах из протеолитических фрагментов белка Pmel17 [24].

Исследования последних лет показали, что многие белки при определенных условиях способны формировать амилоиды *in vitro*. Появилось такое понятие как «амилом» (amylome), обозначающее совокупность белков, потенциально способных формировать амилоидные агрегаты [25]. Среди этих белков есть и мышечные: субфрагмент-1 миозина [26], связанные с миозином белки семейства титина (С-, Х-, Н-белки) [27, 28] и сам титин [29]. Возможна ли амилоидная агрегация титина и других мышечных белков *in vivo*, и какое значение будут иметь эти агрегаты в клетке? Эти вопросы требуют дальнейших исследований. Однако недавно проведенные исследования дают основания утверждать, что при сворачивании развернутых доменов титина могут формироваться неправильно свернутые конформации, которым авторы дали название «внутримолекулярный амилоид» [30].

В обзоре представлены данные о структурных и функциональных особенностях титина, о роли этого белка в определении механических свойств саркомеров и особенностях регуляции жесткостно-упругих свойств его молекул, об амилоидной агрегации этого белка *in vitro* и возможности формирования внутримолекулярных амилоидных структур *in vivo*; описаны молекулярные механизмы защиты титина от агрегации его молекул в мышечных клетках. Анализ данных позволяет сделать предположение об амилоидных свойствах титина и формируемых им эластичных нитей.

## II. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТИТИНА И ЕГО ДОМЕНОВ

Титин (тайтин/коннектин) – самый большой из известных на сегодняшний день белков по молекулярной массе, достигающей у его изоформ ~3,0–3,7 МДа в поперечно-полосатых мышцах и ~2 МДа в гладких мышцах [31, 32]. Титин имеет многодоменную структуру и его ген способен кодировать белок, в состав которого входят: протеинкиназный домен, 152 Ig-домена, 132 FnIII-домена, 31 домен PEVK, 7 Z-повторов и 33-неидентифицированных домена (по базе UniProt).

В саркомерах сердечной и скелетных мышц позвоночных титин является третьим по количеству (после актина и миозина) белком. Его молекулы длиной около 1 мкм и диаметром 3–4 нм [33–36] перекрывают половину саркомера от М-зоны до Z-диска, формируя третий тип нитей [37], получивших название эластичных. В А-зоне

саркомера титин связан с миозиновыми (толстыми) нитями [38]. В I-диске саркомера некоторые участки титиновой молекулы могут взаимодействовать с актиновыми (тонкими) нитями [39–49], однако большая часть его молекулы в этой зоне проходит свободно, соединяя концы миозиновых нитей с Z-диском. Предполагается, что на каждую миозиновую нить в половине саркомера приходится по шесть молекул титина [50], N-концы которых перекрываются в Z-линии, а C-концы в M-линии саркомера [37]. Исследования показали, что этот гигантский полипептид имеет различное строение в разных зонах саркомера и вносит свой вклад в их архитектуру и функционирование. Большая часть (до 90%) молекулы титина состоит из повторяющихся иммуноглобулин-подобных (Ig) и фибронектин III-подобных (FnIII) доменов с  $\beta$ -складчатой структурой [37]. Кроме этих доменов титин содержит уникальные последовательности: киназный домен вблизи M-линии саркомера, N2A, N2B и PEVK-элементы в I-зоне саркомера, а также фосфорилируемые участки в M-, I- и Z-зонах саркомера [37, 51–55]. Расположение титина во всех зонах саркомера, эластические свойства и взаимодействие со многими белками создают основу для полифункциональности этого белка. Показано, что титин: 1) является каркасом для сборки миозиновых нитей и саркомера [56–60]; 2) участвует в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и, вследствие этого, сократительной функции мышцы [61, 62]; 3) участвует в запуске и регуляции актин-миозинового взаимодействия как через связывание с белками тонких нитей [41, 63], так и посредством изменения АТФазной активности миозина [36, 64, 65]. Предполагается, что в комплексе с сигнальными белками, объединенными титином в единую сеть, титин играет роль сенсора растяжения и напряжения, участвуя в процессах внутриклеточной сигнализации, в частности, в регуляции экспрессии генов мышечных белков и белкового обмена в саркомере [52, 54, 66–77].

В отличие от A-зоны саркомера, где титин прочно связан с миозиновыми нитями, в I-зоне эластичная часть его молекулы способна развивать пассивное напряжение при растяжении [78] и возвратную силу при сокращении саркомера [79–82]. Биофизические исследования показали, что эта часть молекулы титина ведет себя как «нелинейная энтропийная пружина», которая распрямляется при воздействии на нее силы от 20 пН до 30 пН и оказывает упругое сопротивление при сжатии с силой 2,5 пН [83]. Методом атомно-силовой микроскопии или молекулярного динамического моделирования были получены более высокие значения силы, необходимой для разворачивания отдельных доменов титина или их тандемных последовательностей (табл.).

Таблица. Значения силы, необходимые для разворачивания отдельных доменов титина или тандемных последовательностей его доменов

Участок молекулы титина	Сила, необходимая для разворота участка молекулы (пН)	Ссылки
Z-зона		
Z1Z2-домены*	750	[84]
I-зона		
Домены I27-I34**	237/150–330	[85], [86]
Тандем из I27 (8 доменов)* *	204	[86]
Тандем из I28 (8 доменов)* *	257	[86]
Тандем из I32 (8 доменов)* *	298	[86]
Тандем из I34 (8 доменов)* *	281	[86]
Тандем из 3-х доменов I27, N2B и 3-х доменов I27**	200	[86]
Тандем из четырех идентичных копий I55–I56-доменов**	156–222	[87]
Тандем из четырех идентичных копий I57–I58-доменов**	200	[85]
I91–I98-домены***	225	[88]
Специфичные для скелетных мышц Ig домены Sk47-Sk53**	210	[87]
Граница I- и A-зоны		
I48–I54-домены**	200	[87]
A-зона		
A60–A65-домены**	180	[87]
15 доменов Fn3**	113	[87]

\* Использовался метод молекулярного динамического моделирования.

\*\* Измерено при помощи атомно-силовой микроскопии.

\*\*\* Измерено при помощи модифицированного метода атомно-силовой микроскопии, получившего название «a molecular force probe».

Из таблицы видно, что самыми устойчивыми к растяжению являются Z1Z2-повторы титина. В растяжимой I-зоне Ig домены титина разворачиваются в диапазоне сил  $\sim 150\text{--}330$  пН [86, 88]. В А-части молекулы титина, которая прочно связана с миозиновой нитью и не изменяет своей длины в естественных условиях, FnIII домены разворачиваются при силе от 100 пН до 200 пН [87, 89]. Следует отметить, что подобные значения силы, необходимые для разворачивания амилоидной структуры, получены и для ряда амилоидных фибрилл: 115 пН для амилоидов из человеческого прионного белка (huPrP90-231) [90], 250 пН для амилоидов глюкогона [91] (значения получены с помощью атомно-силовой микроскопии), 522 пН для амилоидов А $\beta$ -пептида [90] (значения рассчитаны с помощью метода молекулярного динамического моделирования). Видно, что метод молекулярного динамического моделирования даёт завышенные значения силы, поэтому эти значения некорректно сравнивать с другими, полученными с помощью атомно-силовой микроскопии. Выявленная аналогия между титином и амилоидами является, по всей вероятности, следствием большого содержания в них  $\beta$ -складчатой структуры, для разворачивания которой необходимо приложить примерно одинаковую силу. Таким образом, этот параметр не может лежать в основе сравнения механических свойств амилоидных агрегатов и молекул титина. Основным критерием при проведении подобных сравнений должны быть структурные особенности белка, определяющие его механические свойства, или сформированных им агрегатов. Интерес, проявляемый в этой связи к титину, обусловлен тем, что упруго-эластичные свойства его молекул опосредуют механические свойства саркомеров, клеток и мышцы в целом.

### **III. РОЛЬ ТИТИНА В МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ МЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК. РЕГУЛЯЦИЯ ЖЕСТКОСТИ МОЛЕКУЛЫ ТИТИНА В САРКОМЕРЕ. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ИДЕНТИЧНОСТИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ТИТИНОВЫХ ДОМЕНОВ**

В настоящее время не подвергается сомнению роль титина в опосредовании упруго-эластичных свойств мышечных клеток, в частности, кардиомиоцитов. Коэкспрессия N2B- и N2BA-изоформ титина, различающихся по длине растяжимой I-части, и изменение их соотношения под влиянием факторов внешней или внутренней

среды (при онтогенетическом развитии, при развитии патологических процессов, при гибернации, микрогравитации (для ссылок см. [92]), рассматривается как один из молекулярных механизмов изменения жесткости кардиомиоцитов и сердечной мышцы в целом. N2BA-изоформа (м.м. ~3300 кДа) титина имеет более длинную (более эластичную и, соответственно, менее жесткую) I-часть молекулы; N2B-изоформа (м.м. ~3000 кДа) титина имеет более короткую (менее эластичную и, соответственно, более жесткую) I-часть (рис. 1). Показано, что содержание N2B-изоформы титина напрямую коррелирует с увеличением уровня пассивного напряжения при растяжении миофибрилл сердечной мышцы [93, 94–96]. Регуляция жесткости кардиомиоцитов на уровне соотношения длинных и коротких изоформ титина ярко прослеживается в онтогенезе млекопитающих [96–98]. В раннем неонатальном периоде развития с усилением насосной функции сердца происходят изменения в составе изоформ титина, направленные на увеличение доли более коротких (более жестких) изоформ этого белка [93, 96, 97]. У взрослых животных отмечается корреляция между уровнем частоты сердечных сокращений и долей короткой N2B-изоформы титина в миокарде левого желудочка. В частности, у мелких животных с частотой сердечных сокращений 140–650 ударов/мин (кролик, хомяк, мышь, крыса) содержание жесткой N2B-изоформы титина в левом желудочке составляет 80–94%. У крупных животных с частотой сердечных сокращений 60–80 ударов/мин (овца, свинья, коза, бык) содержание короткой изоформы титина уменьшается до 41–76% [99]. Предполагается, что преобладание этой изоформы титина способствует увеличению скорости активного сокращения миокарда во время раннего систолического укорочения, а также более быстрому расслаблению сердца [99]. Таким образом, варибельность по длине упруго-эластичного участка изоформ титина в I-зоне саркомера является важной частью молекулярного механизма, участвующего в регуляции механических и сократительных свойств сердечной мышцы. Варибельность по длине растяжимого участка молекулы титина характерна и для его N2A-изоформы в скелетных мышцах. В частности, альтернативный сплайсинг приводит к образованию N2A-изоформы титина с более короткой I-частью молекулы в *m. psoas* (м.м. ~3300 кДа) и более длинной I-частью молекулы в *m. soleus* (м.м. ~3700 кДа) [100]. Функциональное значение подобной варибельности по длине упруго-эластичной I-части N2A-изоформы титина в скелетных мышцах остается неизвестным.

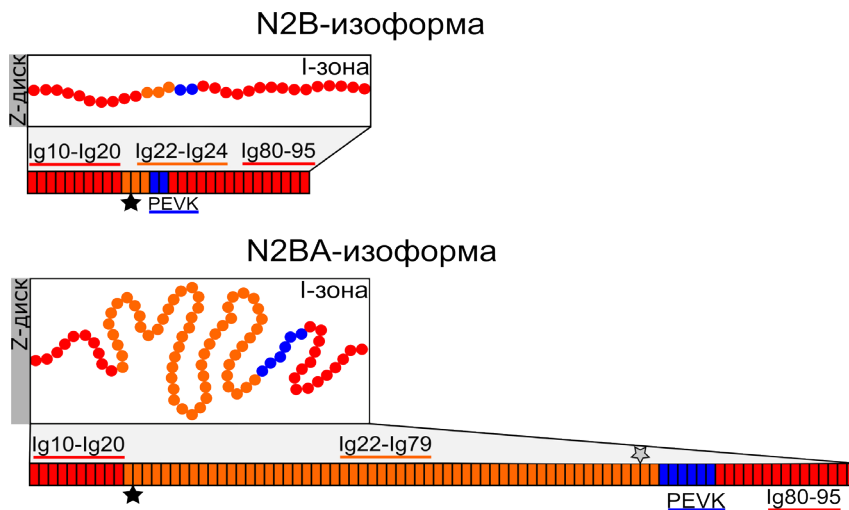


Рис. 1. Схематическое изображение доменной структуры сердечных изоформ титина в I-зоне саркомера.

Последовательность доменной структуры титина представлена по базе данных UniProtKB – Q8WZ42 (TITIN\_HUMAN). Обе изоформы содержат одинаковые последовательности: проксимальную (Ig10–Ig20) и дистальную (Ig80–95). N2BA-изоформа титина в отличие от более короткой и жесткой N2B-изоформы имеет более длинный средний участок, состоящий из иммуноглобулин-подобных доменов (Ig22–Ig79), большая часть из которых является варибельным (по-разному сплайсируемым у N2BA-изовариантов) участком (Ig25–79). PEVK-последовательность в N2B-изоформе более короткая. В обеих изоформах есть уникальная N2-B последовательность, состоящая из трех иммуноглобулин-подобных доменов и уникальной последовательности, содержащей 572 аминокислотных остатка (располагается после Ig22). В N2BA-изоформе присутствует также N2A-последовательность, состоящая из четырех иммуноглобулин-подобных доменов и участка уникальной последовательности, содержащей 106 аминокислотных остатков (располагается перед PEVK-участком); на схеме их локализация указана звездочками (черная – N2B, серая – N2A).



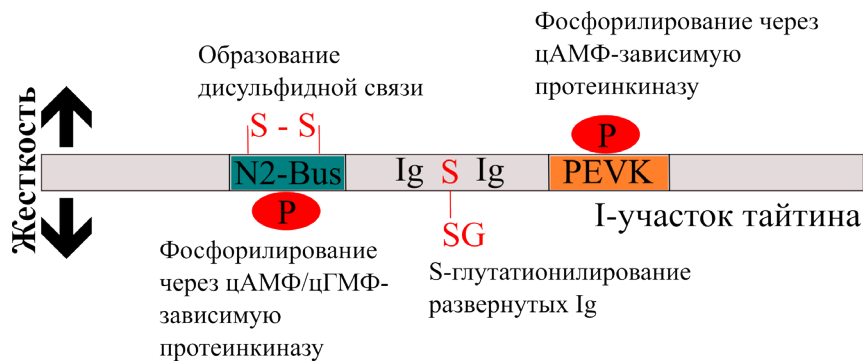


Рис. 2. Посттрансляционные механизмы изменения жесткости титина.

Образование дисульфидных связей в участке N2B и фосфорилирование PEVK цАМФ-зависимой протеинкиназой способствуют увеличению жесткости молекулы. Фосфорилирование через цАМФ/цГМФ-зависимую протеинкиназу N2-B-последовательности и S-глутатионирование развернутых Ig-доменов титина, напротив, способствуют снижению жесткости его молекулы.

Упруго-эластичные свойства титиновых молекул регулируются не только за счет изменения их длины в I-зоне саркомера, но и с помощью посттрансляционных модификаций [101] (рис. 2). Показано, что фосфорилирование N2-B-участка цГМФ-зависимой или цАМФ-зависимой протеинкиназами уменьшает жесткость титиновой молекулы, в то время как фосфорилирование PEVK-последовательности (обогащенной остатками пролина, глутаминовой кислоты, валина и лизина) цАМФ-зависимой протеинкиназой увеличивает ее жесткость [102, 103]. Жесткость титиновых молекул может индуцироваться окислительным стрессом, возникающим при инфаркте миокарда, ожирении или сахарном диабете, что ухудшает диастолическую функцию левого желудочка [104]. Это связано с образованием дисульфидных связей в N2-B-последовательности титина, что приводит к увеличению жесткости его молекулы. При этом показано, что повышенная жесткость титина может компенсироваться за счет обратимого S-глутатионирования цистеинов в развернутых (за счет увеличения нагрузки на саркомер) Ig-доменах [104].

В основе более тонкого механизма регуляции жесткостно-упругих свойств титина могут лежать вариации в идентичности аминокислотной последовательности его доменов. Это предположение возникло на основании данных о различной способности к агрегации *in vitro* доменов титина, имеющих разную степень идентичности аминокислотной последовательности [105], а также проведенных нами расчетов идентичности аминокислотной последовательности

Ig-доменов I-зоны N2B- и N2BA-изоформ титина (рис. 1). Известны данные, полученные с помощью метода динамического светорассеяния, что скорость агрегации *in vitro* доменов титина, имеющих более высокую идентичность аминокислотной последовательности, выше таковой у доменов, имеющих более низкую идентичность аминокислотной последовательности [105]. С помощью программы BLAST нами было обнаружено, что домены переменного участка, экспрессирующегося только у N2BA-изоформы, имеют более высокую идентичность аминокислотной последовательности (~32%, рассчитано для 26 доменов) по сравнению с таковой (~23–25%, рассчитано для 30 доменов) у других доменов I-зоны N2B и N2BA-изоформ титина. До сих пор не существует точного представления о том, сколько молекул этого гигантского белка и как они укладываются в I-зоне саркомера. Однако, принимая во внимание данные об агрегации титина *in vitro* [29, 30, 106, 107], в том числе, с образованием амилоидных агрегатов [29], нельзя исключить связывания *in vivo* близко расположенных доменов одной и той же или разных молекул этого белка. В этом случае можно предположить, что домены переменного участка N2BA-изоформы будут иметь более высокую склонность к агрегации, чем другие домены. Это приведет к увеличению жесткости агрегированного участка N2BA-изоформы титина, что может иметь непосредственное значение в изменении механических и сократительных свойств мышечных клеток.

#### IV. АГРЕГАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ТИТИНА *IN VITRO* И *IN VIVO*. МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ КЛЕТОК ОТ АГРЕГАЦИИ ТИТИНА

Возможна ли вышеуказанная агрегация титина *in vivo* или нет, неизвестно, однако исследования агрегации *in vitro* коротких последовательностей некоторых доменов титина, проведенные в 2005 году [105] и других белков [106] позволили сделать заключение о том, что способность к агрегации возрастает, если идентичность аминокислотной последовательности доменов составляет больше 30–40% [105]. Предпосылкой проведения подобных исследований стали более ранние работы, в которых была продемонстрирована способность соседних идентичных доменов титина формировать *in vitro* неправильно свернутые структуры (misfolding structures) [107]. Недавно проведенные исследования, опубликованные в Nature Communications в 2015 году, показали, что вне зависимости от аминокислотной идентичности в процессе сворачивания развернутых доменов титина формируются неправильно свернутые конформации [30].

Молекулярное моделирование позволило авторам предположить, что значительная часть этих неправильно свернутых конформаций является внутримолекулярным амилоидом [30]. При этом более высокая идентичность в аминокислотной последовательности способствовала образованию более стабильных форм [30]. Авторы этого исследования сделали предположение, что в процессе эволюции многодоменные белки, к которым относится и титин, претерпевали изменения, направленные на снижение идентичности аминокислотной последовательности их доменов для предотвращения или снижения вероятности образования устойчивых (в том числе и амилоидоподобных) агрегатов белка *in vivo* [30].

Тем не менее, исключить вероятность возможной агрегации титиновых молекул *in vivo* в I-зоне саркомера нельзя. Показано, что при растяжении саркомера домены титина могут разворачиваться, открывая скрытые гидрофобные участки, что может привести к агрегации белка и нарушению его функций [108, 109]. Следствием агрегации развернутых Ig-доменов в I-зоне может быть аномально высокая жесткость молекул титина и, следовательно, миоцитов [110]. Одним из механизмов предотвращения агрегации Ig-доменов в I-зоне саркомера является взаимодействие с этой частью молекулы титина малых белков теплового шока (sHsps), способных подавлять агрегацию многих белков. В частности, показано, что Hsp27 и  $\alpha$ B-кристаллин не взаимодействуют с дистальными Ig-доменами, расположенными вблизи А-диска саркомера, но связываются с Ig-доменами растяжимой части молекулы титина, расположенной между Z-диском и PEVK [110]. Следует отметить, что эти Ig-домены в отличие от PEVK и N2-B-последовательностей, более склонны к агрегации в условиях частичной денатурации [110]. Чем объясняются эти различия? Известно, что белки, имеющие неупорядоченную структуру, устойчивы к агрегации благодаря различным механизмам: высокому суммарному заряду и низкой гидрофобности, низкому числу амилоидогенных участков и большому содержанию остатков пролина [105, 111]. PEVK-участок титина богат пролином и имеет сравнительно высокий суммарный заряд [34]. N2-B-последовательность также содержит много остатков пролина и более высокий суммарный заряд, чем типичный Ig-домен титина [110]. Таким образом, наличие в составе молекулы титина PEVK и N2-B-последовательностей снижает вероятность агрегации этой части белка *in vivo*. Однако в условиях перерастяжения мышцы, происходящего как при интенсивных физических нагрузках, так и при патологии (например, при ишемии, когда гибель миоцитов может привести к перерастяжению соседних

клеток), вероятность разворачивания и, следовательно, агрегации Ig-доменов титина возрастает [86]. И, несмотря на то, что развернутые Ig-домены титина повторно сворачиваются *in vitro* без малых белков теплового шока [108], в условиях *in vivo* при достаточно тесном расположении белков в саркомере, этот процесс может быть затруднен даже в присутствии вышеуказанных белков. При этом более высокая идентичность аминокислотной последовательности варибельного участка N2BA-изоформы повышает вероятность агрегации титина *in vivo*, что, несомненно, приведет к значительному увеличению жесткости титиновых нитей. Это, в свою очередь, будет иметь негативные последствия для механических свойств и сократительной способности миоцитов и мышцы в целом. Защитой от подобных изменений может быть повышенный протеолиз титина в саркомере. Однако этот путь не исключает накопления фрагментов титина в клетке и формирования ими амилоидных агрегатов в цитозоле. В этом случае аутофагия клетки – последняя стадия защиты организма от неконтролируемой агрегации саркомерных цитоскелетных белков [110, 112, 113].

А возможно ли накопление агрегатов титина *in vivo*? На такую возможность указывают результаты наших исследований *in vitro*. В частности, показано, что в условиях, близких к физиологическим, гладкомышечный титин за короткие временные интервалы (десятки минут) формирует амилоидные агрегаты [29]. Методом кругового дихроизма при этом не выявлено структурных перестроек типа  $\alpha$ -спираль –  $\beta$ -структура, характерных для других амилоидогенных белков [114, 115]. Обнаружен выраженный цитотоксический эффект амилоидных агрегатов титина на культуру гладкомышечных клеток аорты быка, который сопровождался дезорганизацией актинового цитоскелета [29]. Полученные данные не только указывают на возможность амилоидной агрегации титина *in vivo*, но и позволяют сделать предположение об участии этого белка в развитии мышечных амилоидозов.

#### **V. О ВОЗМОЖНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ АМИЛОИДНОЙ АГРЕГАЦИИ ТИТИНА В САРКОМЕРЕ**

Общепринято, что амилоиды играют негативную роль в живых клетках. Амилоидные фибриллы из-за высокой жесткости способны механически разрывать клеточную мембрану, поэтому накопление амилоидных агрегатов, являющихся устойчивыми к протеолитической деградации, приводит к гибели клеток [116, 117] и развитию патологического процесса [118]. Однако следует отметить, что высокая

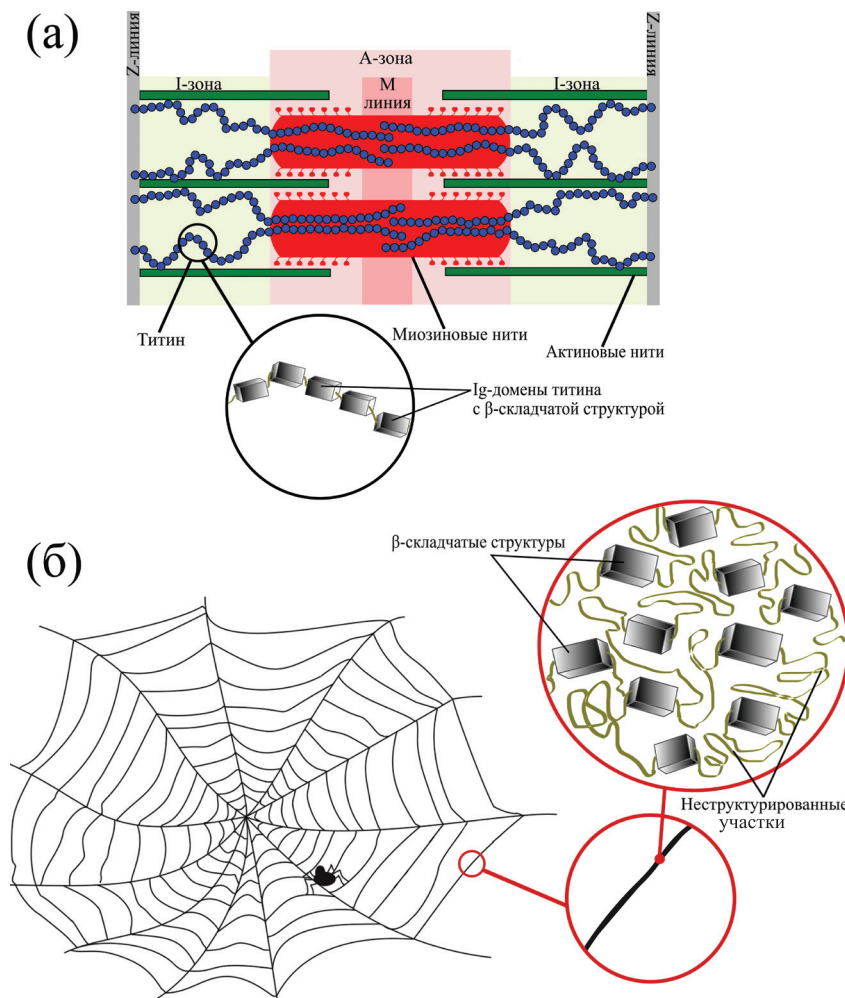


Рис. 3. Морфологическое сходство молекулы титина (а) и функциональных амилоидов спидроина – белка паутины (б).

жесткость присуща и функциональным амилоидам, например, амилоидам спидроина – белка, участвующего в формировании прочных эластичных нитей паутины. Обращает на себя внимание морфологическое сходство функциональных амилоидов спидроина и молекулы титина (рис. 3). Белок паутины богат β-складчатой структурой (до 40–50% от общего объема паутиновой фибриллы [119]),

а остальная часть заполнена менее упорядоченными, возможно, аморфными структурами [120]. Молекула титина также имеет кроме  $\beta$ -складчатой структуры до ~50% неструктурированных участков, что показано методом кругового дихроизма [29], а также короткие  $\alpha$ -спиральные участки, к примеру, в PEVK-последовательности [40] и киназном домене [121].

Тонкие эластичные нити титиновых молекул формируют внутриклеточный цитоскелетный растяжимый каркас, определяющий механические свойства мышечной ткани. Не исключено, что агрегация молекул титина в I-зоне саркомера, в том числе с формированием «внутримолекулярных амилоидных структур», может иметь функциональное значение, заключающееся в увеличении жесткости мышцы. Это, в свою очередь, может играть защитную роль, заключающуюся в противодействии растяжению саркомеров сверх значений длин, при которых могут быть неблагоприятные последствия для мышцы. Нельзя исключить изменений и в механосенсорной роли титина в случае агрегаций его молекул.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог проведенному анализу данных о свойствах титина, можно акцентировать внимание на следующих фактах: титин формирует внутриклеточный цитоскелетный эластичный каркас, определяющий механические свойства саркомеров и мышцы в целом; титин формирует амилоидные агрегаты *in vitro*; в молекуле титина при сворачивании развернутых доменов могут образовываться амилоидо-подобные структуры; имеется морфологическое сходство этого белка с функциональными амилоидами спидроина. Можем ли мы на основании этих данных утверждать, что титин – это молекулярный амилоид? Утвердительно ответа на этот вопрос пока дать нельзя. Однако ясно, что в процессе эволюции создана одна из самых уникальных молекул живой природы, сочетающая в себе свойства амилоида и эластичного белка, участвующего не только в формировании саркомера и поддержании его структуры, но и в тонкой регуляции процессов актин-миозинового взаимодействия и внутриклеточной сигнализации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fonteyn, N. (1639) Responsionum et Curationum Medicinalium, Amstelodami, Amsterdam. (Цит. по [2]).
2. Kyle, R. (2001) Amyloidosis: a convoluted story, *Br. J. Haematol.*, **114**, 529–538.
3. Sipe, J.D., Cohen, A.S. (2000) Review: history of amyloid Fibril, *J. Struct. Biol.*, **130**, 88–89.
4. Kelly, J.J. (1987) Amyloidosis. Topics in the Neurosciences, *Top. Neurosci.*, **5**, 105–127.
5. Langkilde, A.E., Vestergaard, B. (2009) Methods for structural characterization of prefibrillar intermediates and amyloid fibrils, *FEBS Lett.*, **583**(16), 2600–2609.
6. Dobson, C.M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **15**, 3–16.
7. Ross, C.A., Poirier, M.A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat. Med.*, **10**, 10–17.
8. Uversky, V.N., Fink, A.L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded, *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 131–153.
9. Chiti, F., Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333–366.
10. Knowles, T.P., Vendruscolo, M., Dobson, C.M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**(6), 384–396.
11. Dobson, C.M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding, *Methods*, **34**, 4–14.
12. Buxbaum, J.N., and Linke, R.P. (2000) A molecular history of the amyloidoses, *J. Mol. Biol.*, **421**, 142–159.
13. Rosenthal, C.J., Franklin, E.C., Frangione, B. and Greenspan, J. (1976) Isolation and partial characterization of SAA-an amyloid-related protein from human serum, *J. Immunol.*, **116**, 1415–1418.
14. Häggqvist, B., Näslund, J., Sletten, K., Westermark, G.T., Mucchiano, G., Tjernberg, L.O., Nordstedt, C., Engstrom, U. and Westermark, P. (1999) Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 8669–8674.
15. Барсуков А., Шустов С., Шкодкин И., Воробьев С., Пронина Е. (2005) Гипертрофическая кардиомиопатия и амилоидоз сердца, *Врач, вып.* **10**, 42–46.
16. Guan, J., Mishra, S., Falk, R.H., Liao, R. (2012) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **302**, 544–552.
17. Olsen, A., Jonsson, A. and Normark, S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli, *Nature*, **338**, 652–655.
18. Rçmling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. and Normark, S. (1998) Curli fibers are highly conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with respect to open structure and regulation. *J. Bacteriol.*, **180**, 722–731.
19. Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreughd, P., Boersma, F. G. H., Dijkhuizen, L. and Wçsten, H. A. B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils, *Genes Dev.* **17**, 1714–1726.

20. Otzen D., Nielsen P.H. (2008) We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid, *Cell Mol. Life Sci.*, **65**(6), 910–927.
21. Wöesten, H.A.B., de Vocht, M.L. (2000) Hydrophobins, the fungal coat unraveled, *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 79–86.
22. Iconomidou, V.A., Chryssikos, G.D., Gionis, V. et al. (2006) Amyloid fibril formation propensity is inherent into the hexapeptidetandemly repeating sequence of the central domain of silk moth chorion proteins of the A-family, *J. Struct. Biol.*, **156**, 480–488.
23. Slotta, U., Hess, S., Spiess, K. et al. (2007) Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison, *Macromol. Biosci.*, **7**, 183–188.
24. Fowler, D.M. et al. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue, *PLoS Biol.*, **4**, e6.
25. Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R., Eisenberg, D. (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**(8), 3487–3492.
26. Komatsu, H., Shinotani, N., Kimori, Y., Tokuoka, J., Kaseda, K., Nakagawa, H., Kodama, T. (2006) Aggregation of partially unfolded Myosin subfragment-1 into spherical oligomers with amyloid-like dye-binding properties, *J. Biochem.*, **139**(6), 989–996.
27. Марсагишвили, Л.Г., Шпагина, М.Д., Емельяненко, В.И., Подлубная, З.А. (2005) Саркомерные белки семейства тайтина образуют амилоиды, *Биофизика*, **50**(5), 803–809.
28. Марсагишвили, Л.Г., Шпагина, М.Д., Шаталин, Ю.В., Шубина, В.С., Наумов, А.А., Поцелуева, М.М., Подлубная, З.А. (2006) Исследование цитотоксичности амилоидных фибрилл Х-белка, *Биофизика*, **51**(5), 799–803.
29. Bobylev, A.G., Galzitskaya, O.V., Fadeev, R.S., Bobyleva, L.G., Yurshenas, D.A., Molochkov, N.V., Davidchenko, N.V., Selivanova, O.M., Penkov, N.V., Podlubnaya, Z.A., Vikhlyantsev, I.M. (2016) Smooth muscle titin forms in vitro amyloid aggregates, *Biosci. Rep.*, **36**(3), e00334.
30. Borgia, A., Kemplen, K.R., Borgia, M.B., Soranno, A., Shammass S., Wunderlich, B., Nettels, D., Best, R.B., Clarke, J., Schuler, B. (2015) Transient misfolding dominates multidomain protein folding., *Nat. Commun.*, **6**, 8861.
31. Labeit, S., Lahmers, S., Burkart, C., Fong, C., McNabb, M., Witt, S., Witt, C., Labeit, D., Granzier, H. (2006) Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins, *J. Mol. Biol.*, **362**(4), 664–681.
32. Meyer, L.C., Wright, N.T. (2013) Structure of giant muscle proteins, *Front. Physiol.*, **4**, 368.
33. Suzuki, J., Kimura, S., Maruyama, K. (1994) Electron microscopic filament lengths of connection and its fragments, *J. Biochem.*, **116**, 406–410.
34. Tskhovrebova, L., Trinick, J. (1997) Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules, *J. Mol. Biol.*, **265**, 100–106.
35. Вихлянцев, И.М. (2011) Полиморфизм тайтина поперечно-полосатых мышц в норме, при адаптации и патологии, Дисс. докт. биол. наук, Пушино, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 235.
36. Вихлянцев, И.М., Окунева, А.Д., Шпагина, М.Д., Шумилина, Ю.В., Молочков, Н.В., Салмов, Н.Н., Подлубная, З.А. (2011) Изменения изоформного состава, структуры и функциональных свойств тайтина



- сердечной мышцы Монгольской песчанки (*Merionesunguiculatus*) после пребывания в условиях реальной невесомости, *Биохимия*, **76**, 1629–1639.
37. Gregorio, C.C., Granzier, H., Sori-machi, H., Labeit, S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement?, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 18–25.
38. Houmeida, A., Holt, J., Tskhovrebova, L., Trinick, J. (1995) Studies of the interaction between titin and myosin, *J. Cell Biol.*, **131**, 1471–1481.
39. Trombitás, K., Pollack, G.H. (1993) Elastic properties of the titin filament in the Z-line region of vertebrate striated muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **14**, 416–422.
40. Gutierrez-Cruz, G., Van Heerden, A.H., Wang, K. (2001) Modular motif, structural folds and affinity profiles of the PEVK segment of human fetal skeletal muscle titin, *J. Biol. Chem.*, **276**, 7442–7449.
41. Kulke, M., Fujita-Becker, S., Rostkova, E., Neagoe, C., Labeit, D., Manstein, D.J., Gautel, M., Linke, W.A. (2001) Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils, *Circ. Res.*, **89**, 874–881.
42. Linke, W.A., Kulke, M., Li, H., Fujita-Becker, S., Neagoe, C., Manstein, D.J., Gautel, M., Fernandez, J.M. (2002) PEVK domain of titin: an entropic spring with actin-binding properties, *J. Struct. Biol.*, **137**, 194–205.
43. Podlubnaya, Z.A., Shpagina, M.D., Vikhlyantsev, I.M., Malyshev, S.L., Udaltsov, S.N., Ziegler, C., Beinbrech, G. (2003) Comparative electron microscopic study on projectin and titin binding to F-actin, *Insect. BiochemMol. Biol.*, **33**, 789–793.
44. Niederlander, N., Raynaud, F., Astier, C., Chaussepied, P. (2004) Regulation of the actin-myosin interaction by titin, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4572–4581.
45. Raynaud, F., Astier, C., Benyamin, Y. (2004) Evidence for a direct but sequential binding of titin to tropomyosin and actin filaments, *Biochim. Biophys. Acta*, **1700**, 171–178.
46. Bianco, P., Nagy, A., Kengyel, A., Szatmári, D., Mártonfalvi, Z., Huber, T., Kellermayer, M.S. (2007) Interaction forces between F-actin and titin PEVK domain measured with optical tweezers, *Biophys. J.*, **93**, 2102–2109.
47. Fukushima, H., Chung, C.S., Granzier, H. (2010) Titin-isoform dependence of titin-actin interaction and its regulation by S100A1/Ca<sup>2+</sup> in skinned myocardium, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 9.
48. Chung, C.S., Bogomolovas, J., Gasch, A., Hidalgo, C.G., Labeit, S., Granzier, H.L. (2011) Titin-actin interaction: PEVK-actin-based viscosity in a large animal, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 8.
49. Chung, C.S., Methawasin, M., Nelson, O.L., Radke, M.H., Hidalgo, C.G., Gotthardt, M., Granzier, H.L. (2011) Titin based viscosity in ventricular physiology: an integrative investigation of PEVK-actin interactions, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **51**, 428–434.
50. Liversage, A.D., Holmes, D., Knight P.J., Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2001) Titin and the sarcomere symmetry paradox, *J. Mol. Biol.*, **305**, 401–409.
51. Labeit, S., Kolmerer, B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity, *Science*, **270**, 293–296.
52. Granzier, H., Labeit, S. (2004) The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease, *Circ. Res.*, **94**, 284–295.

53. Linke, W. (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction, *Cardiovasc. Res.*, **77**, 637–648.
54. Voelkel, T., Linke, W. (2011) Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle, *Eur. J. Physiol.*, **4**, 143–154.
55. Gautel, M. (2011) Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing, *Eur. J. Physiol.*, **462**, 119–134.
56. Peckham, M., Young, P., Gautel, M. (1997) Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen, *Cell Struct. Funct.*, **22**, 95–101.
57. Gregorio, C.C., Trombitás, K., Centner, T., Kolmerer, B., Stier, G., Kunke, K., Suzuki, K., Obermayr, F., Herrmann, B., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S. (1998) The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity, *J. Cell Biol.*, **143**, 1013–1027.
58. Ayoob, J.C., Turnacioglu, K.K., Mittal, B., Sanger, J.M., Sanger, J.W. (2000) Targeting of cardiac muscle titin fragments to the Z-bands and dense bodies of living muscle and non-muscle cells, *Cell. Motil. Cytoskeleton.*, **45**, 67–82.
59. Van der Ven, P.F., Bartsch, J.W., Gautel, M., Jockusch, H., Furst, D.O. (2000) A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly, *J. Cell Sci.*, **113**, 1405–1414.
60. Person, V., Kostin, S., Suzuki, K., Labeit, S., Schaper, J. (2000) Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture, *J. Cell Sci.*, **113**, 3851–3859.
61. Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E., Podolsky, R.J. (1986) A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle, *Nature*, **323**, 160–164.
62. Higuchi, H. (1992) Changes in contractile properties with selective digestion of connectin (titin) in skinned fibers of frog skeletal muscle, *J. Biochem.*, **111**, 291–295.
63. Lee, E.J., Peng, J., Radke, M., Gotthardt, M., Granzier, H.L. (2010) Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **49**, 449–458.
64. Kimura, S., Maruyama, K., Huang, Y.P. (1984) Interactions of muscle beta-connectin with myosin, actin, and actomyosin at low ionic strengths, *Biochem. J.*, **96**, 499–506.
65. Вихлянцев, И.М., Подлубная, З.А. (2003) Фосфорилирование саркомерных цитоскелетных белков – адаптационный фактор ингибирования сократительной активности мышц при зимней спячке, *Биофизика*, **48**(3), 499–504.
66. Granzier, H.L., Labeit, S. (2006) The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring, *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **34**, 50–53.
67. Linke, W. (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction, *Cardiovasc. Res.*, **77**, 637–648.
68. Linke, W.A., Krüger, M. (2010) The giant protein titin as an integrator of myocyte signaling pathways, *Physiology (Bethesda)*, **25**, 186–198.
69. LeWinter, M.M., Granzier, H. (2010) Cardiac titin: a multifunctional giant, *Circulation*, **121**, 2137–2145.
70. Ottenheijm, C.A., Granzier, H. (2010) Role of titin in skeletal muscle

- function and disease, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **682**, 105–122.
71. Gautel, M. (2011) The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain?, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23**, 39–46.
72. Gautel, M. (2011) Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing, *Pflugers Arch.*, **462**, 119–134.
73. Tskhovrebova, L., Trinick, J. (2005) Muscle disease: a giant feels the strain, *Nat. Med.*, **11**, 478–479.
74. Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L.G., Hughes, S.M., 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**, 1599–1603.
75. Puchner, E.M., Alexandrovich, A., Kho, A.L., Hensen, U., Schäfer, L.V., Brandmeier, B., Gräter, F., Grubmüller, H., Gaub, H.E., Gautel, M. (2008) Mechanoenzymatics of titin kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 13385–13390.
76. Buyandelger, B., Ng, K.E., Miodic, S., Gunkel, S., Piotrowska, I., Ku, C.H., Knöll, R. (2011) Genetics of mechanosensation in the heart, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **4**, 238–244.
77. Stahl, S.W., Puchner, E.M., Alexandrovich, A., Gautel, M., Gaub, H.E. (2011) A conditional gating mechanism assures the integrity of the molecular force-sensor titin kinase, *Biophys. J.*, **101**, 1978–1986.
78. Erickson, H.P. (1997) Stretching single protein molecules: titin is a weird spring, *Science*, **276**(5315), 1090–1092.
79. Linke, W.A., Popov, V.I., Pollack, G.H. (1994) Passive and active tension in single cardiac myofibrils, *Biophys. J.*, **67**, 782–792.
80. Granzier, H.L., Irving, T.C. (1995) Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments, *Biophys. J.*, **68**, 1027–1044.
81. Linke, W.A., Bartoo, M.L., Ivemeyer, M., Pollack, G.H. (1996) Limits of titin extension in single cardiac myofibrils, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17**, 425–438.
82. Helmes, M., Trombitás, K., Granzier, H. (1996) Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes, *Circ. Res.*, **79**, 619–626.
83. Kellermayer, M.S., Smith, S.B., Granzier, H.L., Bustamante, C. (1997) Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers, *Science*, **276**(5315), 1112–1116.
84. Lee, E. H., M. Gao, N. Pinotsis, M. Wilmanns, and K. Schulten. (2006) Mechanical strength of the titin Z1Z2/teletonin complex, *Structure*, **14**, 497–509.
85. Grützner, A., Garcia-Manyes, S., Kötter, S., Badilla, C.L., Fernandez, J.M., Linke, W.A. (2009) Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence, *Biophys. J.*, **97**(3), 825–834.
86. Li, H., Linke, W.A., Oberhauser, A.F., Carrion-Vazquez, M., Kerkvliet, J.G., Lu, H. et al. (2002) Reverse engineering of the giant muscle protein titin, *Nature*, **418**, 998–1002.
87. Rief, M., Gautel, M., Schemmel, A., Gaub, H.E. (1998) The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy, *Biophys. J.*, **75**(6), 3008–3014.
88. Watanabe, K., Muhle-Goll, C., Kellermayer, M. S., Labeit, S. &

- Granzier, H. (2002). Different molecular mechanics displayed by titin's constitutively and differentially expressed tandem Ig segments, *J. Struct. Biol.* **137**, 248–258.
89. Wang, S.M., Jeng, C.J., Sun, M.C. (1992) Studies on the interaction between titin and myosin, *Histol. Histopathol.* **7**(3), 333–337.
90. Schlegel, M., vandenAkker, C.C., Deckert-Gaudig, T., Deckert, V., Velikov, K.P., Koenderink, G., Bonn, M. (2013) Amyloids: From molecular structure to mechanical properties, *Polymer*, **54**, 2473–2488.
91. Volpatti, L. R.; Knowles, T. P. J. (2014) Polymer physics inspired approaches for the study of the mechanical properties of amyloid fibrils, *J. Polymer Sci.*, **52**, 281–292.
92. Vikhlyantsev, I.M., Podlubnaya, Z.A. (2012) New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions, *Biochemistry (Mosc)*. **77**(13), 1515–1535.
93. Opitz, C.A., Linke, W.A. (2005) Plasticity of cardiac titin/connectin in heart development, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26**(6–8), 333–342.
94. Neagoe, C., Kulke, M., del Monte F., Gwathmey, J.K., de Tombe, P.P., Hajjar, R. and Linke, W.A. (2002) Titin isoform switch in ischemic human heart disease, *Circulation*, **106**, 1333–1341.
95. Neagoe, C., Opitz, C.A., Makarenko, I. and Linke, W.A. (2003) Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**, 175–189.
96. Opitz, C.A., Leake, M.C., Makarenko, I., Benes, V. and Linke, W.A. (2004) Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart, *Circ. Res.*, **94**, 967–975.
97. Lahmers, S., Wu, Y., Call, D.R., Labeit, S. and Granzier, H. (2004) Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in foetal and neonatal myocardium, *Circ. Res.*, **94**, 505–513.
98. Warren, C.M., Krzesinski, P.R., Campbell, K.S., Moss, R.L. and Greaser, M.L. (2004) Titin isoform changes in rat myocardium during development, *Mech. Dev.*, **121**, 1301–1312.
99. Opitz, C.A., Kulke, M., Leake, M.C., Neagoe, C., Hinssen, H., Hajjar, R.J., Linke, W.A. (2003) Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**(22), 12688–12693.
100. Freiburg, A., Trombitas, K., Hell, W., Cazorla, O., Fougereuse, F., Centner, T., Kolmerer, B., Witt, C., Beckmann, J.S., Gregorio, C.C., 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.
101. Linke, W.A., Hamdani, N. (2014) Gigantic business: titin properties and function through thick and thin, *Circ. Res.*, **114**(6), 1052–1068.
102. Kötter, S., Gout, L., Von Frieling-Salewsky, M., Müller, A.E., Helling, S., Marcus, K., Dos Remedios, C., Linke, W.A., Krüger, M. (2013) Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts, *Cardiovasc. Res.*, **99**(4), 648–656.
103. Krüger, M., Linke, W.A. (2006) Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive ten-

- sion, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **27**(5–7), 435–444.
104. Beckendorf, L., Linke, W.A. (2015) Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **36**(1), 25–36.
105. Wright, C. F., Teichmann, S. A., Clarke, J., Dobson, C. M. (2005) The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins, *Nature*, **438**, 878–881.
106. Sonnen, A.F.-P., Yu C., Evans, E.J., Stuart, D.I., Davis, S.J., Gilbert, R.J.C. (2010) Domain Metastability: A Molecular Basis for Immunoglobulin Deposition? *J. Mol. Biol.*, **399**(2–2), 207–213.
107. Oberhauser, A.F., Marszalek, P.E., Carrion-Vazquez, M., Fernandez, J.M. (1999) Single protein misfolding events captured by atomic force microscopy, *Nature Structural & Molecular Biology*, **6**, 1025–1028.
108. Minajeva, A., Kulke, M., Fernandez, J.M. and Linke, W.A. (2001) Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils, *Biophys. J.*, **80**, 1442–1451.
109. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J.M., and Gaub, H.E. (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM, *Science*, **276**, 1109–1112.
110. Kötter, S., Unger, A., Hamdani, N., Lang, P., Vorgerd, M., Nagel-Steger, L., Linke, W.A. (2014) Human myocytes are protected from titin aggregation-induced stiffening by small heat shock proteins, *J Cell Biol.* **204**(2), 187–202.
111. Monsellier, E., and Chiti, F. (2007) Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution, *EMBO Rep.*, **8**, 737–742.
112. Galvez, A.S., Diwan, A., Odley, A.M., Hahn, H.S., Osinska, H., Melendez, J.G. et al. (2007) Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis, *Circ. Res.*, **100**, 1071–1078.
113. Willis, M.S., Schisler, J.C., Portbury, A.L., Patterson, C. (2009) Build it up-Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere, *Cardiovasc. Res.*, **81**(3), 439–448.
114. Селиванова, О.М., Галзитская, О.В. (2012) Структурный полиморфизм и возможные пути образования амилоидных фибрилл на примере белка инсулина, *Биохимия*, **77**, 1478–1490.
115. Gross, M. (2000) Proteins that convert from alpha helix to beta sheet: implications for folding and disease, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **1**(4), 339–47.
116. Engel, M. F. M., Khemtouri, L., Kleijer, C. C., Meeldijk, H. J. D., Jacobs, J., Verkleij, A. J., de Kruijff, B., Killian, J. A. and Hoppener, J. W. M. (2008) Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 6033.
117. Fitzpatrick, A. W. P., Park, S. T. and Zewail, A. H. (2013) Exceptional rigidity and biomechanics of amyloid revealed by 4D electron microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 10976.
118. Pepys, M.B. (2001) Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 203–210.
119. Iizuka, E. (1965) Degree of crystallinity and modulus relationships of silk thread from cocoons of *Bombyx mori* L. and other moths, *Biorheology*, **3**(1), 1–8.

- 
120. Gosline, J.M., Guerette, P.A., Ortlepp, C.S., Savage, K.N. (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function, *Journal of Experimental Biology*, **202**, 3295–3303.
121. Krüger, M., Linke, W.A. (2011) The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, **286**(12), 9905–9912.