

УДК 612.466

СРАВНЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ОБМЕНА БЕЛКОВ *BASP1* И *MARCKS* В ПОЧКАХ КРЫС СО СПОНТАННОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ*

А.С. Альдекеева

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Исследовали возможные различия в обмене белков *BASP1* и *MARCKS* в почках крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR), путем сравнения уровней экспрессии мРНК этих белков в различных структурах почек. Работа выполнена на самцах крыс линии SHR (n=8) и крыс линии WKY (n=8), в возрасте 90 дней. Исследование проводили на образцах ткани из коркового и мозгового слоев почек. Уровни экспрессии мРНК *BASP1* и *MARCKS* определяли методом ПЦР в реальном времени. Обнаружены достоверные различия ($p < 0.001$) уровней экспрессии мРНК *BASP1* и *MARCKS* между корковыми и мозговыми слоями почек у крыс линий SHR и WKY. При этом межлинейные различия в уровнях экспрессии мРНК обоих белков практически отсутствовали ($p = 0.050$). Показано, что неравномерное распределение уровней экспрессии мРНК белков *BASP1* и *MARCKS* в мозговом и корковом слоях почек не зависит от уровня артериального давления и наличия спонтанной гипертензии.

Ключевые слова: *SHR, WKY, корковый слой почек, мозговой слой почек, *BASP1, MARCKS*.*

DOI: 10.26456/vtbio146

Введение. В последнее время появились принципиально новые данные о структуре и функциях, которые выполняют во внутриклеточных каскадах такие важнейшие белки, как протеинкиназы (Lipp, Reiter, 2011). Для взаимодействия с окружающими клетками и внеклеточной средой клетки различных тканей должны оценивать входящие сигналы, интерпретировать их и формировать значимые ответы. По большей части эти сигнальные механизмы включают в себя переформирование таких входящих воздействий в адекватные внутриклеточные сигналы, обычно в виде вторичных мессенджеров или систем вторичных мессенджеров. Переходные процессы, связанные со вторичными мессенджерами в клетке, содержат информацию в виде пространственно-временных

* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РФ 47 ГП "Научно-технологическое развитие Российской Федерации" (2019-2030).

характеристик изменения их концентрации. Клетка воспринимает эту информацию только через систему, способную интерпретировать свойства вторичного мессенджера и передать ее либо в соответствующие сигнальные внутриклеточные каскады, либо непосредственно на эффектор. Важнейшим в этом отношении является семейство протеинкиназ С (ПКС) (Newton, 2010). Они связаны с двумя ключевыми системами вторичных мессенджеров, а именно с ионами кальция и сигнальными липидами, играющими важную и часто синергическую роль в сигнальных внутриклеточных каскадах. Белки семейства ПКС перерабатывают и декодируют такие сигналы, фосфорилируя компоненты каскадов внутриклеточной сигнализации, либо сразу белки-эффекторы.

Ключом к пониманию реакций ПКС в различных условиях в клетке может служить исследование обмена белков ее основных субстратов – GAP-43, BASP1 и MARCKS. Эти белки, после фосфорилирования ПКС, участвуют во многих процессах, а именно в миграции клеток, функционировании актинового цитоскелета и процессах транслокации между клеточной мембраной и цитоплазмой (Hartl, Shneider, 2019).

Функционирование ПКС образом связано с обменом кальция в клетке, поэтому особый интерес представляет изучение обмена ее основных субстратов у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR), у которых обнаружены генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке. (McCarron et al., 1994). Результатом таких нарушений является повышение уровня несвязанного кальция в цитозоле (Cox, Fromme, 2015).

В патогенезе артериальной гипертензии особая роль принадлежит почкам. Крысы линии SHR – общепринятая экспериментальная модель спонтанной гипертензии, поэтому мы исследовали особенности обмена белков – основных субстратов ПКС в их выделительной системе. Из этих белков только BASP1 и MARCKS встречаются за пределами структур ЦНС, например, в семенниках и почках (Mosevitsky, 2005; Mosevitsky, Silicheva, 2011).

BASP1 – преобладающий белковый компонент пресинаптических мембран. Он участвует в регуляции активности, роста нейритов и анатомической пластичности (Frey et al., 2000). BASP1 взаимодействует с фосфолипидами клеточной мембраны, образуя олигомеры и получившиеся структуры отсоединяются от клеточной мембраны и переходят в цитоплазму.

MARCKS взаимодействует с актином, участвует в регуляции цитоскелета, в процессах миграции клеток и их выживании. После обратимого фосфорилирования его ПКС происходит миграция этого белка от клеточной мембраны в цитоплазму и обратно. При этом

MARCKS через эффекторный домен захватывает фосфоинозитолтрифосфат, что вызывает перекрест актиновых филаментов цитоскелета и приводит к динамическим изменениям цитоскелета и формы клетки. Такие изменения цитоскелета обеспечивают клеточную подвижность, фагоцитоз и мембранный транспорт.

Вышеописанные свойства исследуемых белков определяют их важную роль в процессах, происходящих в структурах почек, особенно в патологических условиях сформировавшейся артериальной гипертензии.

Методика. В опытах использовали 8 взрослых самцов линии SHR массой 180-250 граммов, АД выше 170 мм рт. ст., и 8 взрослых самцов линии WKY (в качестве контроля) такой же массы, АД ниже 125 мм рт. ст., в возрасте 90 дней. Регистрация АД у всех животных производилась манжеточным методом перед экспериментом (с помощью окклюзионной манжетки и электроманометра «ELEMA»).

Для определения уровня экспрессии мРНК белков *VASP1* и *MARCKS* животные были декапитированы под легким эфирным наркозом с последующим забором образцов ткани почек из коркового и мозгового слоев. Из полученных образцов ткани крыс обеих линий была выделена валовая мРНК с помощью набора Quick-RNA™ MiniPrep Kit (ZymoResearch, США) согласно протоколу исследования. Далее был осуществлен синтез комплементарной ДНК посредством обратной транскрипции. Уровни экспрессии мРНК *VASP1* и *MARCKS* определяли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе АНК-32 (ИАП РАН, Россия). В качестве референса для нормировки результатов амплификации использовали ген β -актина. Условия проведения ПЦР: 1. 95⁰ С 300 с – 1 цикл; 2. 60⁰ С 40 с, 95⁰ С 15 с – 50 циклов. Количественное выражение результатов проводилось с помощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно нормировочного гена по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Работа выполнена с использованием животных из биокolleкции ИФ РАН, при проведении экспериментов соблюдались все требования комиссии по контролю по содержанию и использованию лабораторных животных при Институте физиологии им И.П. Павлова РАН. Это исследование проводилось в соответствии с принципами Базельской декларации, Международными стандартами по работе с лабораторными животными, и с разрешения комиссии по биоэтике ФГБУН «Институт физиологии имени И.П. Павлова» РАН.

Статистическую оценку данных проводили с применением однофакторного и двухфакторного ANOVA. Все статистические вычисления были проведены с помощью программы SYSTAT 10.2.

Результаты и обсуждение. Статистическая обработка полученных данных по уровням экспрессии мРНК *BASP1* выявила значительные различия между разными слоями почек, в то время как межлинейные различия были на грани достоверности. Аналогичная обработка результатов по уровням экспрессии мРНК *MARCKS* также выявила существенные различия между слоями почек, но при этом межлинейные различия отсутствовали. Результаты статистической обработки представлены в таблице 1.

Таблица 1
Влияние факторов и их взаимодействия на уровни экспрессии мРНК *BASP1* и *MARCKS*

Фактор или взаимодействие факторов	<i>BASP1</i>	<i>MARCKS</i>
Линия	$F = 3.937, p = 0.050$	$F = 0.259, p = 0.612$
Слой почки	$F = 54.633, p < 0.001$	$F = 23.003, p < 0.001$
Линия*слой почки	$F = 2.969, p = 0.425$	$F = 0.174, p = 0.840$

Примечание: Представлены результаты двухфакторного дисперсионного анализа совокупных результатов опыта: коэффициент Фишера F и достоверность влияния p (данные перед обработкой были ранжированы).

На рисунке 1 представлены результаты измерения уровня экспрессии мРНК *BASP1* в различных слоях почек крыс линий SHR и WKY. Оказалось, что крысы обеих линий имеют схожий характер распределения уровней экспрессии мРНК *BASP1* в тканях коркового, мозгового слоев и целого сегмента почек, но у крыс линии SHR он наиболее ярко выражен.

На рисунке 2 представлены результаты измерения уровня экспрессии мРНК *MARCKS* в различных слоях почек крыс линий SHR и WKY. В этом случае крысы обеих линий также имеют схожий характер распределения уровней экспрессии мРНК *MARCKS* в тканях коркового, мозгового слоев и целого сегмента почек.

Таким образом, у крыс со спонтанной гипертензией в структурах мозгового вещества уровни экспрессии мРНК *BASP1* и *MARCKS* были значительно ниже, чем в структурах коркового вещества и чем в аналогичных структурах крыс линии WKY. Полученные нами различия в распределениях в слоях могут быть связаны с особенностями функций, которые эти белки выполняют в клетках различных органов и тканей.

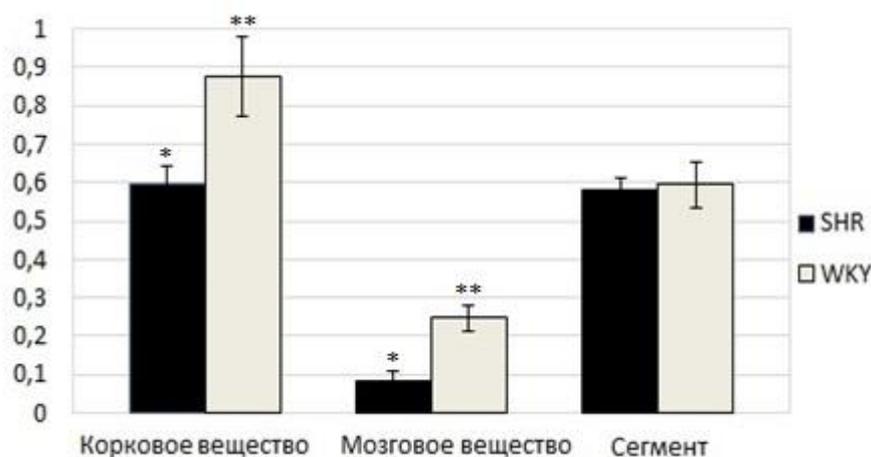


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК BASP1 (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$). * и ** обозначены статистически достоверные различия между различными слоями почек ($p < 0,001$).

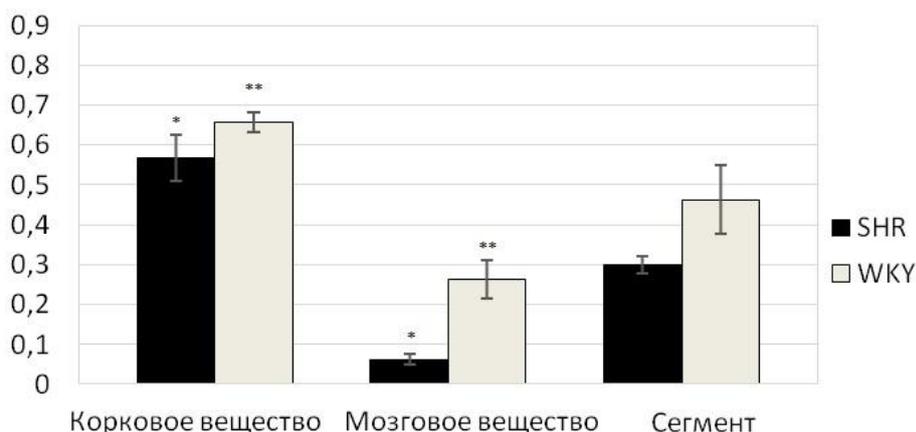


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК MARCKS (в относительных единицах) в корковом, мозговом веществе и сегменте почек крыс линий SHR и WKY. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$). * и ** обозначены статистически достоверные различия между различными слоями почек ($p < 0,001$).

Снижение экспрессии мРНК белков основных субстратов ПКС считается признаком развития патологических процессов в клетке (Hart, Schneider, 2019). Фосфорилирование белков BASP1 и MARCKS ПКС ведет к отсоединению их от фосфолипидов мембраны и взаимодействию с кальмодулином. (Maekawa et al., 1994; Mosevitsky, 2005).

В клетках различных тканей белки WASP1, GAP-43 и MARCKS, влияют на эффективность рафт-зависимых сигналов (Caroni et al., 1997; Golub et al., 2004), а также на количество и распределение сигнальных липидов мембраны регулирующих динамику цитоскелета (Caroni, 2001).

Во время нейронального развития удлинение аксона и рост его отростков регулируются активностью PI(4)P5 киназы (Hernandez-Deviez et al., 2004), энзима, синтезирующего фосфоинозитол дифосфат PtdIns(4,5)P2. Таким образом, количество и распределение PtdIns(4,5)P2 регулирует динамику цитоскелета, который в свою очередь влияет на рост и развитие нейронов (Caroni, 2001). Аналогично, белок CAP-23, сходный по функциям с WASP1, влияет на перераспределение актинового цитоскелета. Результатом накопления CAP-23 является увеличение динамики актиновых структур и исчезновение более стабильных актиновых филаментов. Сходные процессы могут происходить и в почечных структурах.

При фосфорилировании ПКС или связыванием кальция зависимым кальмодулином MARCKS транслоцируется из мембраны в цитозоль, регулируя динамику актинового цитоскелета и везикулярный транспорт и активируя различные пути передачи сигналов (Chen et al., 2017). Как следствие, белок участвует в регуляции клеточной миграции, секреции, пролиферации и дифференциации в различных тканях (Fong et al., 2017).

Заключение. Таким образом, наши данные свидетельствуют о неравномерности распределения мРНК белков - основных субстратов ПКС в различных структурах почек. Отсутствие выраженных межлинейных различий в уровнях экспрессии мРНК MARCKS и слабые отличия для WASP1 свидетельствует о том, что неравномерность распределения этих белков в почках в большей степени связана с особенностями функционирования клеточных структур в различных частях нефронов и является фундаментальным фактом, в меньшей степени зависящим от более частных воздействий, например от уровня повышения артериального давления или от характерных для крыс со спонтанной гипертензией генетически детерминированных нарушений обмена кальция в клетке.

Список литературы

- Caroni P., Aigner L., Schneider C. 1997. Intrinsic neuronal determinants locally regulate extrasynaptic and synaptic growth at the adult neuromuscular junction // J. Cell Biol. V. 136. P. 679-692.
- Caroni P. 2001. Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI (4,5) P2

- rafts // *EMBO J.* V. 20. P. 4332–4336.
- Chen C., Fong L., Yu E., Wu R., Trott J.R., Weiss R.* 2017. Upregulation of MARCKS in kidney cancer and its potential as a therapeutic target // *Oncogene.* V.36. P. 3588-3598.
- Cox R., Fromme S.* 2015. Expression of calcium channel subunit in small mesenteric arteries of WKY and SHR // *Amer. J. of hypertension.* V. 28. № 10. P. 1229-1239.
- Fong L., Yang D., Chen C.H.* 2017. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS): a multirole signaling protein in cancers // *Cancer metastasis Rev.* V. 36. P. 737-747.
- Frey D., Laux T., Xu I., Schneider C., Caroni P.* 2000. Shared and unique roles of CAP-23 и GAP-43 in active regulation neurite outgrowth and anatomical plasticity. *J Cell Biol.* V. 149. P. 1443-1454.
- Golub T., Wacha S., Caroni P.* 2004. Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts // *Curr Opin Neurobiol* V. 14. P. 542–550.
- Hartl R., Schneider A.* 2019. A unique family of neuronal signaling proteins implicated in Oncogenesis and tumor suppression // *Frontier in Oncology.* V. 9. P. 1-13.
- Hernandez-Deviez D.J., Roth M.G., Casanova J.E., Wilson J.M.* 2004. ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha // *Mol Biol Cell.* V. 15. P. 111–120.
- Lipp P., Reiter G.* 2011. Protein Kinase C: The “Masters” of Calcium and Lipid // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* V. 3. P. 1-17.
- Maekawa S., Murofushi H., Nakamura S.* 1994. Inhibitory effect of calmodulin of phosphorylation of NAP-22 with protein kinase C // *J Biol Chem.* V. 269, P. 19462-19465.
- McCarron D.A., Hatton D., Rouillet J.B., Rouillet C.* 1994. Dietary calcium, defective cellular Ca⁺⁺ handling, and arterial pressure control // *Can J Physiol Pharmacol.* V. 72(8). P. 937-944.
- Mosevitsky M.I.* Nerve ending “signal” proteins GAP-43, MARCKS and BASP1. *Int. Rev. Cytol.*, 2005, V.245, p.245-325.
- Mosevitsky M.I., Silicheva I.* 2011. Subcellular and regional location of “brain” proteins BASP1 and MARCKS in kidney and testis // *Acta Histochem.* V. 113. P. 13-18.
- Newton A.C.* 2010. Protein kinase C: Poised to signal // *Am J of Physiol Endocrinol Metab.* V. 298. P. 395-402.

COMPARISON OF BASP1 AND MARCKS PROTEIN EXCHANGE TRAITS IN THE KIDNEYS OF RATS WITH SPONTANEOUS HYPERTENSION

A.S. Aldekeeva

Pavlov Institute of Physiology, Saint-Petersburg

This study aims to detect differences in BASP1 and MARCKS protein metabolisms in kidneys of spontaneously hypertensive rats by comparing their mRNA expression in different kidney structures. The work was performed on 90 days old male SHR (n = 8) and WKY (n = 8) rats. The study was carried out on tissue samples from cortical and medullar kidney layers. BASP1 and MARCKS mRNA expression levels were determined by real-time PCR. Significant differences ($p < 0.001$) in the expression levels of BASP1 and MARCKS mRNA between cortical and medullar kidney layers in both SHR and WKY strain rats were found. Moreover, interlinear differences in the levels of both proteins' mRNA expression were practically absent ($p = 0.050$). It was shown that uneven distribution of mRNA expression levels of BASP1 and MARCKS mRNA in kidneys medullar and cortical layers does not depend on the level of blood pressure and the presence of spontaneous hypertension.

Keywords: *SHR, WKY, cortical layer of kidneys, medulla layer of kidneys, BASP1, MARCKS.*

Об авторе

АЛЬДЕКЕЕВА Анна Сергеевна – младший научный сотрудник без степени в группе экспериментальной кардиологии, ФБГУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: kardio_lab@mail.ru.

Альдекеева А.С. Сравнение особенностей обмена белков BASP1 и MARCKS в почках крыс со спонтанной гипертензией / А.С. Альдекеева // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2020. № 2(58). С. 18-26.