

УДК 612.833.8

**ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ БЕЛКОВ - МАЖОРНЫХ СУБСТРАТОВ
ПРОТЕИНКИНАЗЫ С В ФОРМИРОВАНИИ СИНДРОМА
ДЕФИЦИТА ВНИМАНИЯ С ГИПЕРАКТИВНОСТЬЮ У КРЫС
ЛИНИИ SHR***

Н.З. Ключева¹, А.С. Альдекеева¹, Ю.С. Крайнова¹, А.Ю. Плеханов²

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

В данной работе представлены результаты изучения обмена белков NAP-22 и GAP-43 - мажорных субстратов протеинкиназы С у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR). При помощи методов ПЦР в реальном времени и электрофореза был исследован уровень экспрессии мРНК и содержание этих белков в нейронах теменной коры и гиппокампа. У крыс линии SHR по сравнению нормотензивным контролем (крысы линии WKY) в гиппокампе наблюдается пониженный уровень экспрессии мРНК белков NAP-22 и GAP-43, а в теменной коре снижен только уровень экспрессии мРНК NAP-22. Также обнаружены межлинейные различия в содержании белка NAP-22 в гиппокампе и теменной коре, а в случае белка GAP-43 межлинейные различия наблюдаются только в теменной коре. Белки NAP-22 и GAP-43 активно участвуют в процессах нейропластичности, и изменение их обмена в нейронах может свидетельствовать о нарушениях в этих процессах, что, в свою очередь, может быть связано с характерными для СДВГ поведенческими нарушениями и гиперактивностью у крыс линии SHR. Таким образом, полученные данные могут указывать на возможное участие этих белков в формировании СДВГ. Работа выполнена с использованием животных из Биокolleкции ИФ РАН.

Ключевые слова: СДВГ, SHR, WKY, NAP-22, GAP-43.

DOI: 10.26456/vtbio94

Введение. Крысы со спонтанной гипертензией (линия SHR) являются общепринятой экспериментальной моделью таких заболеваний, как артериальная эссенциальная гипертензия и синдром дефицита внимания с гиперактивностью у детей (СДВГ). В последнее

* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013-2020 годы (ГП-14, раздел 65.2).

время, они широко используются в качестве наиболее ценной экспериментальной модели СДВГ. Доказано, что крысы линии WKY, которых часто используют в качестве их нормотензивного контроля, являются наиболее подходящим контролем и в этом случае. Многочисленные исследования показали, что между животными этих двух линий имеются существенные генетические отличия (Sagvolden, Johansen, 2011). Однако, механизмы возникновения таких отличий и возможные молекулярные и клеточные процессы, влияющие на уровень активности, остаются недостаточно исследованными.

СДВГ – это стойкое, хроническое неврологическо-поведенческое расстройство развития, которое проявляется с раннего детского возраста и выражается в нарушениях концентрации внимания и гиперактивности (встречается примерно у 5% детского населения), у взрослых может перерасти в снижение интеллекта и трудности с восприятием информации. Оно широко распространено во всём мире, но в настоящее время нет общепринятого эффективного способа диагностики и лечения этого синдрома. Для крыс линии SHR характерны генетически детерминированные нарушения обмена кальция в клетке, проявляющиеся в изменении структуры и функционирования кальциевых каналов разных типов (Cox, Rusch, 2002), приводящие к перегрузке цитозоля клеток несвязанными ионами Ca^{2+} . Постоянно повышенный уровень кальция в цитоплазме у таких животных неизбежно вызывает изменения в функционировании кальций-зависимых каскадов передачи внутриклеточного сигнала.

Для выявления у крыс линии SHR возможных изменений генетической экспрессии в системах, имеющих отношение к СДВГ, в рамках Международного многоцентрового генетического проекта по СДВГ (IMAGE) были проанализированы гены-кандидаты на участие в развитии СДВГ (DasBanerjee et al., 2008) и их биологические соседи, которые совокупно относят к IMAGE-генам. Каждый из таких генов определяют, как любой ген из семейства, уже отнесенный к IMAGE-генам или имеющий установленное прямое отношение с IMAGE-генами. (Kuntsi et al., 2006). Было показано, что у крыс линии SHR имеются существенные различия относительно IMAGE-генов, значительное количество которых связано с теорией обучения. Теория динамического развития СДВГ (Sagvolden et al. 2005a; Johansen et al., 2009) предполагает, что при СДВГ дефектное взаимодействие между дофаминовой и глутаматной передачами изменяет синаптическую пластичность, в частности, формирование длительной потенциации. На поведенческом уровне такое неполноценное взаимодействие может привести к ухудшению процессов закрепления, в котором участвует дофамин, и снижению удержания ранее закрепленного поведения.

Подобные изменения могли бы объяснить и дефицит внимания, и гиперактивность с импульсивностью, характерные для СДВГ.

Некоторые такие гены показывают снижение экспрессии в тканях взрослых крыс линии SHR по сравнению с крысами линии WKY. К ним относятся гены, продуктами которых являются: ионотропный глутаматный NMDA-связывающий белок (Grina)/ NMDA-подобный глутаматный рецептор (А-комплекс Grin1 1a); NR2D-субъединица (Grin2d); Субъединица рецептора AMPA Glur-3(Grin-3); альфа-стимулирующий гуаниннуклеотид-связывающий белок ольфакторного типа (Gnal/Golf); транспортер норэпинефрина NET (Slc6a2); кальмодулин 3 (Calm 3); кальций-кальмодулинзависимая протеинкиназа (Camk1, Camk 2, и Camk2g); синаптотагмин III (Synt3) и синаксин-связывающий белок (Stxbp1). Gnal (Golf) связывается с дофаминовым рецептором DRD1 и играет важную роль в регуляции дофаминовой передачи в полосатом теле. Ген Gnal у детей с СДВГ имеет характерные изменения на уровне однонуклеотидного полиморфизма (SNP) (Laurin et al, 2008). Другие гены, напротив, показывают повышение экспрессии мРНК у крыс SHR по сравнению с WKY. Таковы гены, кодирующие субъединицу рецептора AMPA GluR2 (Grin2); субъединицы NR1 и NR2 NMDA-рецепторов Grin1 и Grin2c; кальций-кальмодулинзависимую протеинкиназу 1 (Camkk1), катехол-О-метилтрансферазу (Comt); дофаминовый транспортер DAT1 (Slc6a3); белок, взаимодействующий с дофаминовым рецептором D1 (DRD1ip); серотониновый рецептор (Htr3b), стриатин, синтаксин11, синтаксин 17 (DasBanerjee et al., 2008; Sagvolden, Johansen, 2011).

Поскольку часть IMAGE генов кодирует белки, участвующие в каскадах передачи внутриклеточного кальциевого сигнала, мы передоложили, что некоторые нейрорегуляторные белки – мажорные субстраты одного из ключевых ферментов кальциевого каскада - протеинкиназы С (ПКС), а именно NAP-22 и GAP-43, также могут входить в группу IMAGE. Для проверки этого предположения, мы сравнили экспрессию мРНК этих белков и их содержание в клетках теменной коры и гиппокампа у крыс линий SHR и WKY.

Методика. Для определения уровня экспрессии мРНК этих белков и их содержания в образцах нервной ткани животные были декапитированы под легким эфирным наркозом с последующим забором проб. Из образцов нервной 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 NAP-22 и GAP-43 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. 95°C 300 с – 1 цикл; 2. 60°C 40 с, 95°C 15 с – 50 циклов. Количественное выражение результатов проводилось с помощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно нормировочного гена по формуле $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

Для определения содержания NAP-22 и GAP-43 белки из образцов мозговой ткани (около 30 мг) экстрагировали раствором, содержащим 1 % тритон X-100, 1 мМ ФМСФ и 2 мМ ЭДТА-NA (0,5 мл, 5 мин.), фракционировали трихлоруксусной кислотой 1-10 %, осадки промывали спиртом, затем ацетоном. Полученные препараты, обогащенные исследуемыми белками, наносили на старт геле-электрофореза с уксусной кислотой и мочевиной (Panym, Chalkley, 1969). По завершении электрофореза белки из геля электрофоретически переносили на поливинилидендифторидную мембрану.

Для осуществления иммунохимической процедуры избыточную сорбционную емкость поливинилидендифторидной мембраны с сорбированными белками исчерпывали вымачиванием в молоке (в течение 1 часа), после чего мембрану выдерживали в растворе поликлональных кроличьих антител, полученных нами против электрофоретически чистых белков NAP-22 и GAP-43 крысы (1:500, 10 часов, $+5^{\circ}\text{C}$), затем промывали физиологическим трис-буферным раствором (3 x 10 минут), далее выдерживали в растворе козьих антител против иммуноглобулина G кролика, меченых пероксидазой хрена (Sigma, 1:500; 1 час, 37°C) и снова промывали физиологическим трис-буферным раствором (3 x 10 минут). Пероксидазную активность на мембране выявляли способом усиленной хемилюминесценции.

Сравнительная оценка содержания белка осуществлялась посредством анализа данных иммуноблоттинга, оцифрованных с помощью программы ScanDens, свободно распространяемого программного обеспечения.

Разницу в экспрессии мРНК оценивали по методу Стьюдента с использованием стандартного программного обеспечения. Значимыми считали различия, вероятность которых превосходила 95 %. Для усреднения параметрических признаков использованы средние и ошибки среднего. Разницу в содержании белков по данным иммуноблоттинга оценивали методом Вилкоксона-Манна-Уитни с использованием стандартного программного обеспечения. Значимыми считали различия, вероятность которых превосходила 95 % (в минимальном случае $n = 7, U = 0$).

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.

Результаты и обсуждение. Мы исследовали особенности обмена белков-субстратов ПКС, таких как NAP-22 и GAP-43 в некоторых отделах головного мозга крыс линий SHR и WKY. На рисунках 1 и 2 представлены уровни экспрессии мРНК этих белков в образцах тканей теменной коры и гиппокампа. На рисунках 3 и 4 показано содержание разных форм белков NAP-22 и GAP-43 в теменной коре и гиппокампе.

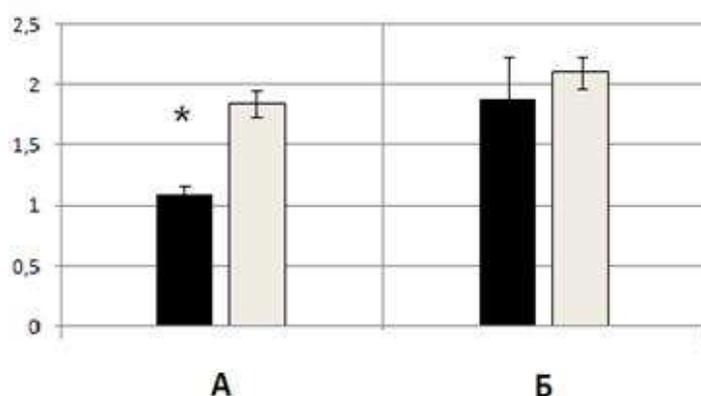


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (А) и GAP-43 (Б) (в относительных единицах) в теменной коре крыс линий SHR и WKY. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

* обозначены статистически достоверные межлинейные различия ($p < 0,05$)

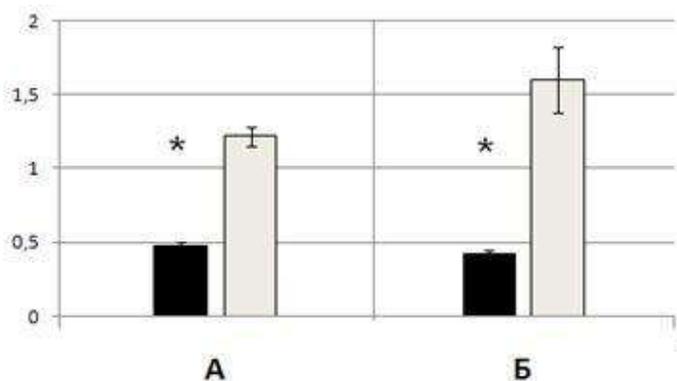


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК NAP-22 (А) и GAP-43 (Б) (в относительных единицах) в гиппокампе крыс линий SHR и WKY. Данные представлены в виде средних и ошибок среднего ($M \pm m$).

* обозначены статистически достоверные межлинейные различия ($p < 0,05$)

Из рисунка 1А видно, что у крыс линии SHR в теменной коре уровень экспрессии мРНК NAP-22 достоверно ниже, чем у их нормотензивного контроля – крыс линии WKY. Межлинейные различия в уровне экспрессии мРНК белка GAP-43 в теменной коре отсутствовали (Рис. 1Б). В гиппокампе уровень экспрессии мРНК обоих белков у крыс линии SHR был достоверно ниже, чем у нормотензивных крыс (Рис. 2А и 2Б).

На рисунке 3, непосредственно под линией старта, выявляется белок NAP-22, агрегированный в олигомеры (Zakharov, Mosevitsky, 2010; Forsova, Zakharov, 2016), а ниже – неагрегированная форма этого белка. Из рисунка видно, что в гиппокампе у крыс обеих линий различается не только уровень экспрессии мРНК NAP-22, но и содержание этого белка в клетках, причём, это касается как агрегированной, так и неагрегированной его форм. Аналогичные результаты были получены и для теменной коры.

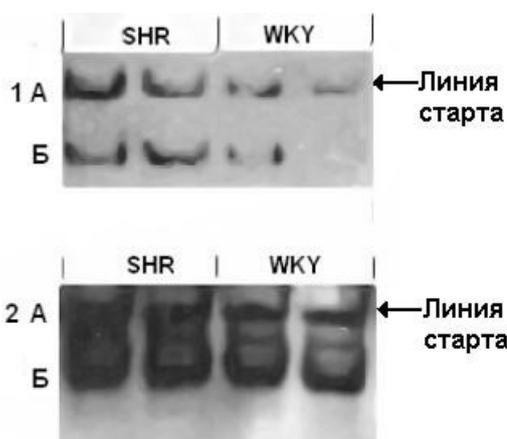


Рис. 3. Содержание агрегированной (А) и дезагрегированной (Б) форм NAP-22 в гиппокампах (1) и теменной коре (2) крыс линий SHR и WKY. Представлены данные электрофореза с последующим иммуноблоттингом

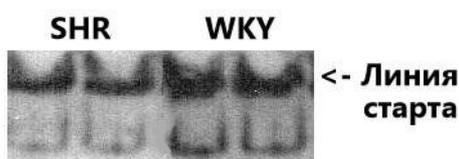


Рис. 4. Содержание GAP-43 в теменной коре крыс линий SHR и WKY. Представлены данные электрофореза с последующим иммуноблоттингом

На рисунке 4 показано содержание белка GAP-43 в теменной коре (содержание GAP-43 в гиппокампе мы не приводим за отсутствием межлинейных различий). Заметно, что содержание этого белка в теменной коре крыс линии SHR ниже, чем у крыс линии WKY, причём это касается как агрегированной, так и неагрегированной форм белка GAP-43 (как и в случае белка NAP-22).

Полученные результаты доказывают, что существует межлинейные различия в обмене белков – мажорных субстратов ПКС. Наши данные позволяют расширить представления о тех нарушениях, которые имеются у крыс со спонтанной гипертензией в реализации каскадов внутриклеточного сигнала. Известно, что у крыс со спонтанной гипертензией изменен обмен внутриклеточного кальция (Cox, Fromme, 2015), а также обмен катехоламинов, таких как адреналин, норадреналин и дофамин (Peltsch et al., 2010), в сторону увеличения содержания экстраклеточных сигнальных молекул. Эти молекулы при взаимодействии со своими рецепторами вызывают активацию фосфолипазы С (ФЛС). Активированная ФЛС катализирует расщепление мембранного фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (PIP2) на инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG). Оба эти вещества оказывают большое влияние на распределение ионов кальция между цитозолем и кальциевыми депо в клетке. Диацилглицерин стимулирует ПКС; кальмодулин связывает кальций и в таком виде активирует кальций-кальмодулинзависимую протеинкиназу, IP3 напрямую регулирует множество клеточных процессов (Fukami, 2002), таких как реорганизация цитоскелета, экзоцитоз и активность мембранных каналов, а в результате связывания IP3 с активируемым им Ca²⁺-каналом (IP3 рецептором) происходит выход кальция из эндоплазматического ретикула (Fukami, 2002).

NAP-22 и GAP-43 являются количественно преобладающими субстратами ПКС (Mosevitsky, 2005). Фосфорилированный GAP-43 ингибирует образование PIP2, а значит, IP3 и диацилглицерина, и, следовательно, активацию ПКС (Gispén et al., 1985). Нефосфорилированный GAP-43 к тому же способен связывать кальмодулин в отсутствие Ca²⁺ (McDonald, Lawrence, 1989) и таким образом, вероятно, способен регулировать его доступность для кальция.

У животных со спонтанной гипертензией при повышенном уровне кальция в цитозоле и в условиях активации ФЛС и ПКС, несомненно, изменяется и биохимия мажорных субстратов ПКС. Дополнительным подтверждением важной роли NAP-22 и GAP-43 в формировании нейрофизиологических особенностей крыс линии SHR являются обнаруженные нами сложные взаимодействия между

уровнем экспрессии мРНК и содержанием исследуемых белков в клетке.

Заключение. Обнаруженные нами различия в уровне экспрессии и содержании белков NAP-22 и GAP-43 в теменной коре и гиппокампе у крыс линии SHR и крыс линии WKY, могут указывать на участие этих белков в формировании СДВГ и позволяют рассматривать их как возможных кандидатов в группу IMAGE. Возможно, что наряду с другими участниками группы IMAGE, эти белки могут вносить вклад в нарушение обмена ионов, а также функциональные нарушения в тех нейронных структурах, где локализуются основные нарушения, связанные с симптомами, имеющими место при СДВГ.

Список литературы

- Cox R.H., Rusch N.J.* 2002. New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure // *Microcirculation*. V. 9. №. 4. P. 243-257.
- Cox R.H., Fromme S.* 2015. Expression of calcium channel subunit variants in small mesenteric arteries of WKY and SHR // *American journal of hypertension*. V. 28. №. 10. P. 1229-1239.
- DasBanerjee T., Middleton F.A., Berger D.F., Lombardo J.P., Sagvolden T., Faraone S.V.* 2008. A comparison of molecular alterations in environmental and genetic rat models of ADHD: a pilot study // *Am J Medical Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B. P. 1554-1563.
- Forsova O.S., Zakharov V.V.* 2016. High-order oligomers of intrinsically disordered brain proteins BASP1 and GAP-43 preserve the structural disorder // *FEBS J*. V. 283(8). P. 1550-1556.
- Fukami K.* 2002. Structure, Regulation, and Function of Phospholipase C Isozymes // *The Journal of Biochemistry*. V. 131. № 3. P. 293-299.
- Gispén W.H., Leunissen J.L.M., Oestreich A.B., Verkleij A.J., Zwijs H.* 1985. Presynaptic localization of B-50 phosphoprotein: the ACTH-sensitive protein kinase substrate involved in rat brain polyphosphoinositide metabolism // *Brain Res*. V. 328. P. 381.
- Johansen E.B., Killeen P.R., Russell V.A., Tripp G., Wickens J.R., Tannock R., Williams J., Sagvolden T.* 2009. Origins of altered reinforcement effects in ADHD // *Behav Brain Funct* 5. 7.
- Kuntsi J., Neale B.M., Chen W., Faraone S.V., Asherson P.* 2006. The IMAGE project: methodological issues for the molecular genetic analysis of ADHD // *Behav Brain Funct*. 2. 27.
- Laurin N., Ickowicz A., Pathare T., Malone M., Tannock R., Schachar R., Kennedy J.L., Barr C.L.* 2008. Investigation of the G protein subunit Galphao1f gene (GNAL) in attention deficit/ hyperactivity disorder // *J Psychiatr Res*. 42. P. 117-124.
- McDonald J.R., Lawrence J.C.* Identification of an adipocyte protein that binds to calmodulin in the absence of calcium and is phosphorylated in response to

- insulin and tumor-promoting phorbol esters // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 961.
- Mosevitsky M.I.* 2005. Nerve ending "signal" proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1// *Int Rev Cytol.* V. 245. P. 245-325.
- Panyim S., Chalkley R.A.* 1969. *Biochem. Biophys.* V. 130 (1). P. 337-346.
- Peltsch H. A., Bizier C., Nguyen P., Tai T. C.* 2010. Regulation of adrenaline synthesis in the heart of the spontaneously hypertensive rat//*The FASEB Journal.* 24:1_supplement. 568.
- Sagvolden T., Johansen E.B., Aase H., Russell V.A.* 2005. A dynamic developmental theory of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes // *Behav Brain Sci* 28. P. 397–468.
- Sagvolden T., Johansen E.B.* 2011. Rat Models of ADHD / eds C. Stanford, R. Tannock // *Behavioral Neuroscience of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Its Treatment. Current Topics in Behavioral Neurosciences.* V. 9. Springer, Berlin, Heidelberg. P. 301-315.
- Zakharov V.V., Mosevitsky M.I.* 2010. Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1// *J Struct Biol.* V. 170. № 3. P. 470-483.

**POSSIBLE ROLE OF PROTEINS MAJOR SUBSTRATES
OF PROTEIN KINASE IN DEVELOPMENT
OF ADHD SYNDROME IN SHR RATS**

N.Z. Klyueva¹, A.S. Aldekeeva¹, Y.S. Kraynova¹, A.Y. Plekhanov²

¹Pavlov Institute of Physiology, Saint-Petersburg

²Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina

The paper presents the results of a study of the metabolism of proteins NAP-22 and GAP-43 - major substrates of protein kinase C in rats with spontaneous hypertension (SHR strand). Using real-time PCR and electrophoresis, the expression level of mRNA and the content of these proteins in the neurons of parietal cortex and hippocampus were investigated. In hippocampus of SHR rats, compared to the normotensive control (WKY rats), a reduced level of mRNA expression of NAP-22 and GAP-43 proteins is observed, while in the parietal cortex, only the level of NAP-22 mRNA expression is reduced. Interlinear differences in NAP-22 protein content in hippocampus and parietal cortex were also found, and in the case of GAP-43 protein, interlinear differences are observed only in the parietal cortex. NAP-22 and GAP-43 are actively involved in neuroplasticity processes, and changes in their metabolism in neurons may indicate abnormalities in these processes, which, in turn, may be associated with behavioral disturbances and hyperactivity in SHR rats characteristic of ADHD. Thus, the data obtained may indicate the possible participation of these proteins in ADHD formation. The work was performed using animals from the Biocollection of the Institute of Physiology, RAS.

Keywords: ADHD, SHR, WKY, NAP-22, GAP-43.

Об авторах:

КЛЮЕВА Наталия Зиновьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель группы экспериментальной кардиологии ФБГУН Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: natklueva@mail.ru.

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

КРАЙНОВА Юлия Сергеевна – младший научный сотрудник без степени в группе экспериментальной кардиологии ФБГУН Института физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6, e-mail: kardio_lab@mail.ru.

ПЛЕХАНОВ Антон Юрьевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биополимеров ФГБУ Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ "Курчатовский институт", Гатчина, e-mail: ayplekhanov@mail.ru.

Клюева Н.З. Возможная роль белков – мажорных субстратов протеинкиназы С в формировании синдрома дефицита внимания с гиперактивностью у крыс линии SHR / Н.З. Клюева, А.С. Альдекеева, Ю.С. Крайнова, А.С. Плеханов // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2019. № 3(55). С. 15-24.