

Структурные изменения белка NAP-22 — основного субстрата протеинкиназы С при кальций-зависимых формах артериальной гипертензии

О.С. Антонова^{1,4}, А.Ю. Плеханов², Е.И. Петрова¹, С.Я. Резник³, Н.З. Ключева¹

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

² Петербургский институт ядерной физики РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

Антонова О.С. — младший научный сотрудник, кандидат биологических наук; Плеханов А.Ю. — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; Петрова Е.И. — заведующая Научно-вспомогательным отделом лабораторного животноводства Института физиологии им. И.П. Павлова РАН; Резник С.Я. — доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной энтомологии и теоретических основ биометода Зоологического института; Ключева Н.З. — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук.

Контактная информация: наб. адм. Макарова, д. 6, Санкт-Петербург, Россия, 190006. Тел.: 8 (812) 714-42-61. Факс: 8 (812) 328-05-01. E-mail: NatKlyeva@mail.ru (Ключева Наталья Зиновьевна).

Резюме

Цель исследования — изучить скорость развития в раннем онтогенезе и оценить содержание мажорного субстрата протеинкиназы С белка NAP-22 в теменной коре и гиппокампе крыс линии SHR и нормотензивных крыс (линия WKY). **Материалы и методы.** В работе использовали крыс линий SHR и WKY определенного возраста, оценивали вес животных и показатели их общего развития. Уровень NAP-22 определяли в гиппокампе и теменной коре головного мозга животных линий SHR и WKY в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней методом гель-электрофореза с последующим поверхностным иммуноблоттингом. **Результаты.** На этапе, предшествующем формированию у животных артериальной гипертензии, крысы линий SHR развивались медленнее, чем крысы WKY. На протяжении всего исследованного возрастного диапазона (5–30 дней после рождения) уровень белка NAP-22 в конечном мозге крыс со спонтанной гипертензией был заметно выше, чем у крыс WKY, это касалось как агрегированной, так и неагрегированной форм NAP-22. **Выводы.** При спонтанной гипертензии генетически детерминированные нарушения обмена внутриклеточного кальция не только вызывают нарушения в деятельности сердечно-сосудистой системы, но и могут негативно влиять на процессы формирования центральной нервной системы в раннем онтогенезе посредством дисрегуляции обмена регуляторных белков головного мозга, в том числе NAP-22.

Ключевые слова: спонтанная гипертензия, нарушения обмена кальция, белок NAP-22, крысы линии SHR, онтогенез.

Structural modifications of a protein kinase C substrate, NAP-22 protein, in spontaneously hypertensive rats

O.S. Antonova^{1,4}, A.Y. Plekhanov², E.I. Petrova¹, S.Y. Reznik³, N.Z. Klueva¹

¹ Pavlov Institute of Physiology of RAS, St Petersburg, Russia

² Petersburg Nuclear Physics Institute of RAS, St Petersburg, Russia

³ Zoological Institute of RAS, St Petersburg, Russia

⁴ Institute for Analytical Instrumentation of RAS, St Petersburg, Russia

Corresponding author: 6 Admiral Makarov emb., St Petersburg, Russia, 190006. Phone: 8 (812) 714-42-61. Fax: 8 (812) 328-05-01. E-mail: NatKlyeva@mail.ru (Natalia Z. Klyueva, PhD, Senior Researcher).

Abstract

Background. The spontaneously hypertensive rat (SHR) strain is the most common animal model both of hypertension and of cognitive impairment. SHR show genetically determined calcium homeostasis abnormality. **Objective.** To investigate protein metabolism disturbance and to reveal the difference in the level of a major protein kinase C substrate, NAP-22, between SHR and normotensive WKY strain. **Design and methods.** Our experiments were carried out on SHR and WKY rats. NAP-22 amount was examined in developing hippocampus and in parietal cortex by immunoblotting with anti-NAP-22 serum. **Results.** In all studied age groups (5–30 days), the amount of NAP-22 (including both aggregated and non-aggregated NAP-22 forms) in SHR telencephalon was considerably higher than in control WKY strain rats. There was also a significant

difference between rate of development during considered period in SHR and WKY rats. **Conclusion.** Our results demonstrate that calcium homeostasis alterations could result in both cardiovascular abnormalities and in the damage of central nervous system through NAP-22 dysregulation.

Key words: spontaneously hypertensive rats, ontogenesis, calcium, NAP-22.

Статья поступила в редакцию: 30.03.11. и принята к печати: 22.07.11.

Введение

Крысы со спонтанной гипертензией (линия SHR — spontaneously hypertensive rats) являются общепризнанной моделью артериальной гипертензии, связанной с генетически детерминированными нарушениями обмена кальция в клетке [1, 2]. Установлено, что у этих животных, наряду с выраженным повышением артериального давления (до 180 мм рт. ст.), существенно нарушены механизмы, обеспечивающие постоянство концентрации ионов кальция в цитоплазме: увеличена активность гидропиридиновых каналов наружной клеточной мембраны и рианодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулума (ЭР), что приводит к повышению уровня несвязанного внутриклеточного кальция [3, 4]. В этих условиях может меняться активность некоторых кальций-зависимых членов семейства протеинкиназ C, отвечающих за фосфорилирование белков и участвующих в передаче клеточного сигнала, не только в гладкомышечных клетках (ГМК), но и в других клетках, например, нейронах [5]. Поэтому крысы SHR, демонстрирующие выраженные нарушения в когнитивной сфере, широко используются в качестве модели синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ), одной из самых распространенных форм нарушений поведения у детей [6, 7].

Связь между нарушениями обмена кальция в организме и формированием устойчивого повышения артериального тонуса [8, 9], а также роль в этих процессах кальций-зависимого паратиреоидного гипертензивного фактора [10, 11] достаточно хорошо изучена. Меньше известно об изменениях, происходящих в таких условиях в центральной нервной системе (ЦНС), особенно в головном мозге. Крысы SHR более подвижны, чем нормотензивные крысы линии Вистар-Киото (WKY), и им присущи основные поведенческие симптомы и нарушения памяти, характерные для пациентов с СДВГ. Существует представление, что такие нейрокогнитивные нарушения у крыс линии SHR могут вызываться гипоперфузией сосудов головного мозга в результате повышения артериального давления [12]. Однако в настоящее время появляется все больше доказательств того, что у крыс SHR процесс формирования нейрокогнитивной недостаточности оказывается более сложным и может иметь место как до, так и во время формирования устойчивой гипертензии [13, 14]. Возможно, у крыс SHR нарушения в функционировании ЦНС вызываются, наряду с сосудистой недостаточностью, еще и изменениями в формировании и функционировании структур головного мозга, особенно в раннем постнатальном онтогенезе [14].

При нарушениях гомеостаза кальция в клетке, характерных для крыс со спонтанной гипертензией, важную роль может играть мажорный субстрат протеинкиназы C

в головном мозге, NAP-22 (neuronal tissue-enriched acidic protein). Он экспрессируется во всех отделах мозга и локализован в синаптических окончаниях, дендритных шипиках и нервных волокнах, ассоциированных с синаптическими пузырьками, пресинаптической и постсинаптической мембранами и микротрубочками, участвует в регенерации спинномозговых аксонов и был обнаружен во фракции мембранных рафтов [15].

Возможно, что формирование спонтанной гипертензии у крыс линии SHR связано не только с изменением функционирования ГМК артериальной стенки и кардиомиоцитов, но и с нарушениями в формировании головного мозга, которые позже могут проявиться в виде нарушений центральной регуляции сосудистого тонуса и симптомов СДВГ. Поэтому мы сравнивали содержание белка NAP-22 у крыс со спонтанной гипертензией (линия SHR) и у нормотензивных крыс (линия WKY) в различных структурах головного мозга на разных этапах постнатального онтогенеза. Одновременно мы оценивали скорость развития животных двух этих линий, анализируя такие параметры, как динамика открывания глаз, появление шерсти и нарастание массы тела.

Материалы и методы

Для исследований использовали пометы крыс линий SHR и WKY определенного возраста, оценивали вес животных и показатели их общего развития. Животные содержались в одной клетке с матерью со свободным доступом к еде и воде в условиях 12-часового светового дня.

NAP-22 определяли в гиппокампе и теменной коре головного мозга животных линий SHR и WKY в возрасте 5, 13, 18 и 30 дней. Эти структуры чаще всего выбираются для морфологических и биохимических исследований формирования мозга в онтогенезе. Белки из образца мозговой ткани (ок. 30 мг) экстрагировали раствором, содержащим 6М гуанидинтиоцианат и 1 % Triton X-100 (1 мл). Для оценки общего содержания NAP-22 электрофорезом с последующим иммуноблоттингом NAP-22 в составе экстрактов гиппокампа или теменной коры головного мозга предварительно дезагрегировали хлороформом, для чего к экстракту, содержащему NAP-22, добавляли равный объем хлороформа и полученную смесь интенсивно встряхивали вручную в течение 2 минут; затем хлороформенную фазу отбрасывали, в пробу добавляли ацетон в шестикратном количестве по отношению к изначальному объему экстракта, выдерживали смесь 2 часа при -20 °C для выпадения белков в осадок, белковый осадок собирали центрифугированием. Полученный при этом белковый препарат в день приготовления разделяли гелем-электрофорезом с уксусной кислотой и мочевиной.

Таблица

ОЦЕНКА ВЫЖИВАЕМОСТИ И ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПОТОМСТВА КРЫС SHR И WKY

Признак	WKY	SHR	Достоверность различий
Общее число детенышей (штук) *	10,5 ± 3,2	7,4 ± 3,3	p = 0,03
Выживаемость потомства (%) **	100 (85–100)	67 (0–100)	p = 0,02
Время появления пуха (дни)*	9,2 ± 1,6	11,2 ± 1,3	p = 0,007
Время открывания глаз (дни)*	16,2 ± 0,9	17,9 ± 1,4	p = 0,003

Примечание: * — среднее и среднее отклонение; ** — медиана и квартили.

По окончании электрофореза белки из геля электрофоретически переносили на мембрану поливинилиденфторида (ПВДФ), избыточную сорбционную емкость мембраны исчерпывали вымачиванием в молоке (1 час) и далее осуществляли иммунохимическую процедуру. Для этого мембрану с сорбированными белками выдерживали в растворе поликлональных кроличьих антител, полученных нами против электрофоретически чистого NAP-22 крысы (иммунная сыворотка в разведении 1:1000, 10 час., +5 °C), промывали физиологическим трис-буферным раствором (ФБР; 3 × 10 мин.), далее выдерживали в растворе козьих антител против иммуноглобулина G кролика, меченных пероксидазой хрена (Sigma, 1:1000; 1 час, 37 °C), и снова промывали ФБР (3 × 10 мин.) Пероксидазную активность на мембране выявляли способом усиленной хемилюминесценции (УХЛ, набор реактивов и фотопленка Amersham) или реакцией с бензидином [16]. Для оценки содержания неагрегированного NAP-22 вышеуказанные экстракты (500 мкл) фракционировали трихлоруксусной кислотой 2–10 %, промывали спиртом, затем ацетоном, высушивали и далее анализировали электрофорезом с последующим иммуноблоттингом, как описано выше. Денситометрирование оцифрованных изображений гелей и иммуноблотов осуществлялось с помощью оригинальной программы ScanDens [17].

Для усреднения параметрических признаков использованы средние и средние отклонения, для непараметрических — медианы и квартили. Достоверность различий проверена непараметрическим тестом Краскелла-Уоллеса.

Результаты

В таблице представлены результаты изучения числа новорожденных детенышей в помете, выживаемость потомства, возраст опушения и возраст открывания глаз в пометах крыс SHR и WKY. У крыс линии SHR количество крысят в помете и их выживаемость в первые 3 дня жизни были достоверно ниже, чем у контрольных нормотензивных крыс WKY. Несколько позже у животных со спонтанной гипертензией происходит открытие глаз и появление шерстяного покрова, совпадающие с началом включения механизмом восприятия звуковых и двигательных стимулов. Следует отметить, что у гипертензивных крыс была очень велика смертность в раннем постнатальном онтогенезе: к трехдневному возрасту в живых оставались не более 67 % крысят, в то время как крысята линии WKY к этому возрасту выживают практически все (табл.).

На рисунке 1 представлены результаты взвешивания животных (отдельно самцы и отдельно самки) в возрасте от 40 до 120 дней. Видно, что крысы линии WKY набирают вес быстрее, чем крысы со спонтанной гипертензией (межлинейные различия по обоим полам достоверны, $p < 0,001$ на каждый день взвешивания). Кроме того, в обеих линиях самцы набирают вес быстрее, чем самки, хотя и здесь выявлены межлинейные различия: самцы линии WKY весили больше самок на протяжении всего периода измерений ($p < 0,01$), а у крыс линии SHR различия между полами были значимы ($p < 0,01$) только на 90-й и 120-й дни жизни.

Результаты, полученные при исследовании общего содержания белка NAP-22 в теменной коре и гиппо-

Рисунок 1. Масса тела (граммы) крыс линий SHR и WKY в возрасте от 40 до 120 дней

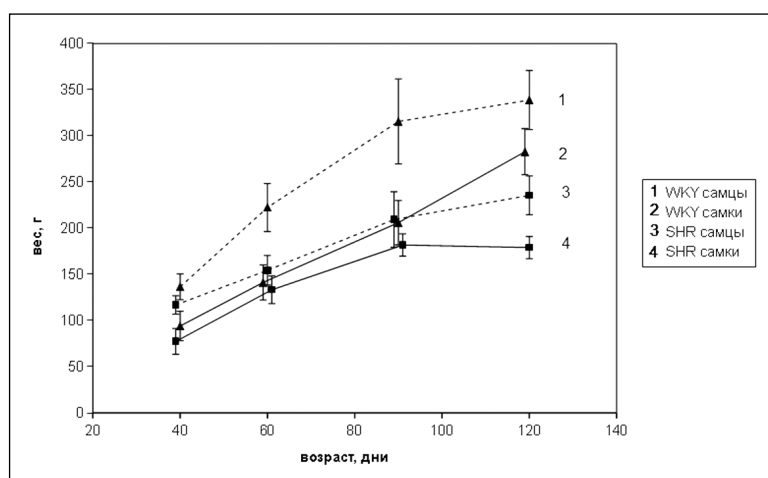
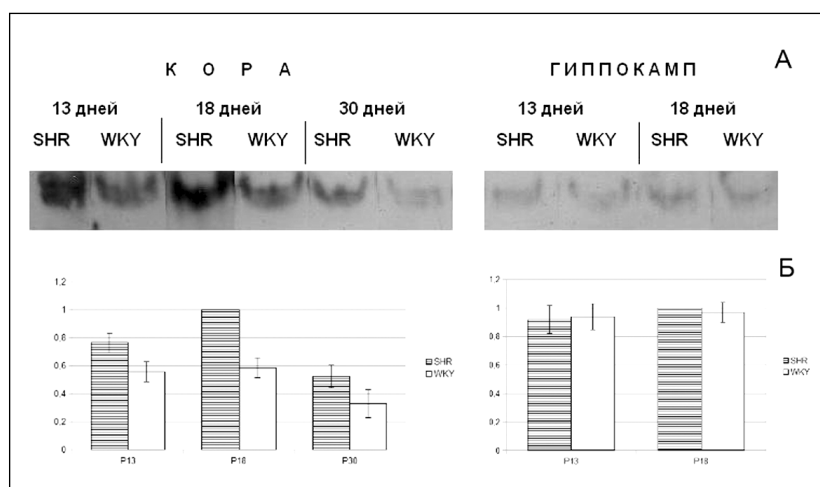
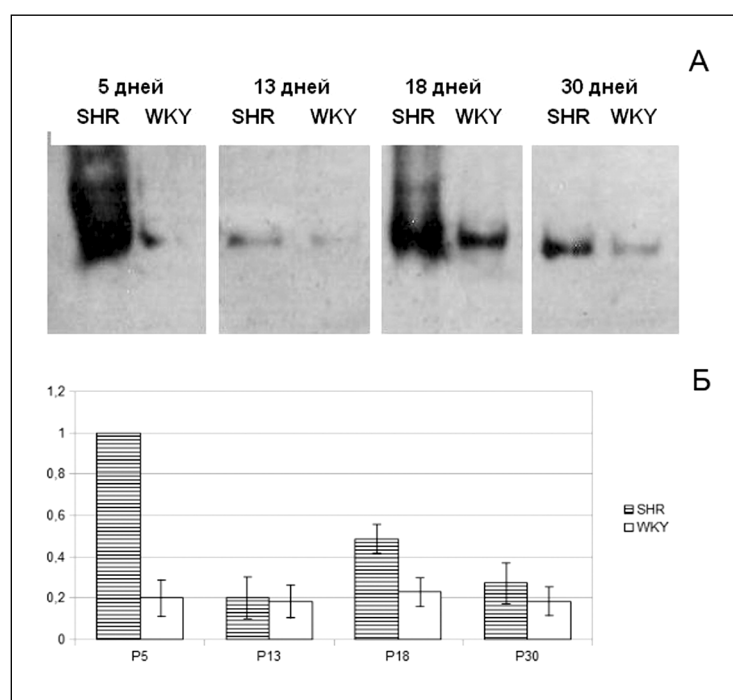


Рисунок 2. Общее содержание белка NAP-22 в теменной коре и гиппокампе крыс линий SHR и WKY в онтогенезе



Примечание: А — иммунореплика геля после электрофореза с уксусной кислотой и мочевиной (~2 мг ткани в нанесении); Б — результаты денситометрирования геля. За единицу принимается электрофоретическая зона с максимальной плотностью.

Рисунок 3. Содержание неагрегированного NAP-22 в гиппокампе крыс линий SHR и WKY в онтогенезе



Примечание: А — иммунореплика геля после электрофореза с уксусной кислотой и мочевиной (~30 мг ткани в нанесении); Б — результаты денситометрирования геля. За единицу принимается электрофоретическая зона с максимальной плотностью.

кампе, представлены на рисунке 2 (А и Б). В теменной коре крысят со спонтанной гипертензией уровень белка NAP-22 заметно выше, чем у крысят линии WKY. Эта закономерность прослеживается во всем охваченном возрастном диапазоне. В то же время в гиппокампе такого соотношения не обнаружено.

По большей части NAP-22 в мозге представлен в виде агрегатов, состоящих из 10 или более «мономерных» молекул этого белка. При этом незначительная часть NAP-22 в мозге находится в неагрегированном состоянии (в виде «мономеров»). Агрегация-деагрегация NAP-22

это физиологическое явление [18], и, хотя роль этого явления остается неясной, при исследовании уровня NAP-22 следует принимать во внимание возможность изменения уровня агрегации этого белка. На рисунке 3 (А и Б) показано, как изменяется уровень неагрегированного NAP-22 в гиппокампе крыс линий SHR и WKY в онтогенезе.

Видно, что уровень неагрегированного NAP-22 в гиппокампе крысят линии SHR выше, чем у крысят WKY, и это соотношение в целом сохраняется в течение всего исследованного периода постнатального развития.

Особенно высок уровень неагрегированного NAP-22 в возрасте 5 и 18 дней — в критические периоды развития мозга у крыс, когда происходит интенсивное разрастание нервных отростков (5-й день) и интенсивное установление нервных контактов (18-й день) [19].

Эти результаты свидетельствуют о том, что у крыс линии SHR в конечном мозге уровень NAP-22 явно выше, чем в контрольной группе, и это касается как агрегированного, так и неагрегированного белка. Возможно, что эти изменения уровня мажорного субстрата кальций-зависимой протеинкиназы С связаны с нарушением обмена внутриклеточного кальция, обнаруженным в нейронах крыс со спонтанной гипертензией [20]. Полученные результаты позволяют рассматривать NAP-22 в качестве маркера раннего развития нарушений кальциевого обмена в клетке, в дальнейшем приводящих к формированию артериальной гипертензии, связанных с ней заболеваний и СДВГ, по крайней мере у экспериментальных моделей.

Как показали наши исследования, у крыс со спонтанной гипертензией неблагоприятные изменения касаются не только сердечно-сосудистой и нервной систем, но и приводят к снижению плодовитости и ухудшению показателей развития животных. Это свидетельствует о том, что значение нарушений в поддержании гомеостаза внутриклеточного кальция значительно шире, чем нарушения в функционировании сердечно-сосудистой системы и что одновременно они существенно влияют на процессы формирования и функционирования других систем организма, что особенно ярко проявляется в течение раннего постнатального онтогенеза.

Изменения экспрессии и модификационных особенностей NAP-22, вызванные аномальным увеличением концентрации несвязанного кальция в цитозоле нейронов, могут служить показателем серьезных нарушений в жизнедеятельности клетки и всего организма в целом. Их исследование может быть полезно для понимания молекулярных механизмов становления кальций-зависимых форм артериальной гипертензии и СДВГ.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессорам В.Е. Курочкину, С.К. Чуриной и А.Л. Тимковскому за всестороннее содействие в выполнении данного исследования.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 09-04-00954а, грантом Санкт-Петербургского Научного центра РАН и грантом Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов, молодых ученых и молодых кандидатов наук 2009 г.

Литература

1. Lerman L.O., Chade A.R., Sica V., Napoli C. Animal models of hypertension: an overview // J. Lab. Clin. Med. — 2005. — Vol. 146, № 3. — P. 160–173.
2. Белостоцкая Г.Б., Захаров Е.А., Ключева Н.З., Петрова Е.И., Наследов Г.А. Нарушения в работе рианодинового рецептора кардиомиоцитов спонтанно гипертензивных крыс, выявленные с помощью 4-хлорм-крезола // Биофизика. — 2008. — Т. 53, № 6. — С. 1033–1037.
3. Захаров Е.А., Ключева Н.З., Белостоцкая Г.Б. Механизмы формирования кальций-зависимой гипертензии на модели кардиомиоци-

тов крыс в культуре // Артериальная гипертензия. — 2009. — Т. 15, № 6. — С. 683–687.

4. Bal M.S., Paulis L., Zicha J., Kunes J. Effect of protein kinase C and protein kinase A inhibitors on contraction of isolated femoral arteries of SHR and Wistar rats // Physiol. Res. — 2009. — Vol. 58, № 6. — P. 793–798.
5. Salamanca D.A., Khalil R.A. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension // Biochem. Pharmacol. — 2005. — Vol. 70, № 11. — P. 1537–1547.
6. Davids E., Zhang K., Tarazi F.I., Baldessarini R.J. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder // Brain Res. Brain Res. Rev. — 2003. — Vol. 42, № 1. — P. 1–21.
7. Заваденко Н.Н., Успенская Т.Ю., Суворинова Н.Ю. Диагностика и лечение синдрома дефицита внимания у детей // Журн. неврол. и психиатр. — 1997. — № 1. — С. 57–61.
8. McCarron D.A., Hatton D., Roulet J.B., Roulet C. Dietary calcium, defective cellular Ca²⁺ handling, and arterial pressure control // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 1994. — Vol. 72, № 8. — P. 937–944.
9. Pang P.K., Benishin C.G., Lewanczuk R.Z. Combined effect of dietary calcium and calcium antagonists on blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rats // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 1992. — Vol. 19, № 3. — P. 442–446.
10. Рыжов Д.Б., Ключева Н.З., Куликов С.В., Чурина С.К. Особенности прессорного ответа на адреналин при артериальной гипертензии, вызванной дефицитом экзогенного кальция // Бюлл. экп. биол. и мед. — 1997. — Т. 124, № 8. — С. 148–150.
11. Pang P.K., Shan J.J., Lewanczuk R.Z., Benishin C.G. Parathyroid hypertensive factor and intracellular calcium regulation // J. Hypertens. — 1996. — Vol. 14, № 9. — P. 1053–1060.
12. Paule M.G., Rowland A.S., Ferguson S.A. et al. Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions and models // Neurotoxicol. Teratol. — 2000. — Vol. 22, № 5. — P. 631–651.
13. Gattu M., Terry A.V. Jr, Pauly J.R., Buccafusco J.J. Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. Part II // Brain Res. — 1997. — Vol. 771, № 1. — P. 104–114.
14. Kantak K.M., Singh T., Kerstetter K.A. et al. Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder // Behav. Neurosci. — 2008. — Vol. 122, № 2. — P. 340–357.
15. Benowitz L.I., Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity // Trends Neurosci. — 1997. — Vol. 20, № 2. — P. 84–91.
16. Plekhanov A.Y. Immunoreplica from the gel surface: rapid and sensitive blot plus intact gel // Anal. Biochem. — 1996. — Vol. 239, № 1. — P. 110–111.
17. Захаров В.В. Сигнальные белки нервных окончаний GAP-43 и BASP1: Структурные и функциональные аспекты: Дисс... канд. биол. наук: 03.00.03. — СПб., 2001. — 157 с.
18. Zakharov V.V., Mosevitsky M.I. Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1 // J. Struct. Biol. — 2010. — Vol. 170, № 3. — P. 470–483.
19. Rice R., Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models // Environ. Health Perspect. — 2000. — Vol. 108, № 3. — P. 511–533.
20. Orlov S.N., Li J.-M. Genes of intracellular calcium metabolism and blood pressure control in primary hypertension // Semin. Nephrol. — 1995. — Vol. 15, № 6. — P. 569–592.