

©Рейхардт, Шабанов

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ЭТИМИЗОЛА НА ПРОТЕИНКИНАЗУ СК2, ФОСФОРИЛОВАНИЕ БЕЛКОВ И ТРАНСКРИПЦИЮ ХРОМАТИНА НЕЙРОНОВ КОРЫ И ГИППОКАМПА МОЗГА КРЫС

Б.А. Рейхардт*, П.Д. Шабанов

Институт экспериментальной медицины,
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12; *эл. почта: reichardt@mail.ru

Многофункциональная протеинкиназа СК2 – важный фермент в нервной системе. Ядерные формы СК2 регулируют структуру хроматина и экспрессию генов, играющих ключевую роль в формировании долговременной памяти. Установлено, что модуляторы памяти из группы структурных аналогов этимизола (САЭ) способны повышать или снижать активность СК2 хроматина коры и гиппокампа мозга крыс *in vitro*. *In vivo* усилители памяти из группы САЭ (3 мг/кг), начиная с 30 мин, стимулировали активность СК2 и транскрипцию хроматина коры и гиппокампа с пиком на 60 мин и продолжительностью до 180 мин. В эти сроки ингибитор памяти из группы САЭ снижал активность СК2 и транскрипцию хроматина. Предполагается, что эффекты САЭ на долговременную память связаны с модулирующим действием этих соединений на активность СК2 и транскрипцию.

Ключевые слова: мозг; долговременная память; хроматин; транскрипция; фосфорилирование белков; протеинкиназа СК2

DOI: 10.18097/PBMC20206602130

ВВЕДЕНИЕ

Протеинкиназа СК2 (casein kinase 2, КФ 2.7.11.1) богато представлена в тканях млекопитающих, особенно в гиппокампе, где её активность в 3-4 раза выше, чем в других тканях [1-3]. Холофермент СК2 ($\alpha_2\beta_2$) состоит из двух каталитических (α) и двух регуляторных субъединиц (β) и локализуется преимущественно в ядре. Наряду с $\alpha_2\beta_2$ в цитозоле обнаруживаются свободные мономеры СК2 α [4, 5]. СК2 α синтезируется *de novo* в каталитически-активной форме и не требует фосфорилирования или вторичных посредников (Ca^{2+} , cAMP, фосфолипиды) для активации. Аллостерическими эффекторами холо-СК2 являются полиамины [2, 4, 6]. До 85% клеточных полиаминов связано с ДНК, где они нейтрализуют отрицательный заряд нуклеотидмонофосфатов, способствуя стабилизации и компактизации ДНК [7]. Благодаря этому, активность СК2 особенно высока в ядерном компартменте.

СК2 фосфорилирует различные белки-субстраты [8], многие из которых вовлечены в механизмы памяти [2]. СК2-зависимыми событиями, актуальными для краткосрочных форм памяти, являются: фосфорилирование потенциал-зависимого К-канала,

фосфорилирование NMDA-рецептора (NMDAR) и повышение Ca -токов; фосфорилирование кальмодулина (CaM), усиление его связывающей способности и стимуляция CaM-зависимых ферментов (PP2B, PP2C, AC, PKC, CaMK); активация DARPP32 и сопряжение сигнальных каскадов Ca^{2+} и cAMP; усиление сигнализации в каскаде MAPK (сборка оси RAF-ERK) и прямая активация протеинкиназ Jnk, Akt, и PKC [2, 8].

К настоящему времени установлено, что активация киназных каскадов, фосфорилирование транскрипционных факторов и индукция генного ответа играют ключевую роль в переходе кратковременных форм памяти в долговременные [9]. В ответ на самые разнообразные стимулы СК2 фосфорилирует ядерные рецепторы гормонов (PR, ER, AR, TR, VDR, IR), транскрипционные факторы (Jun, Мус, CREB, SRF, NF- κ B) и осуществляет тем самым проведение сигнала в ядро; путём фосфорилирования UBF, TBP, TFIIIF, TFIIIA и РНК-полимераз всех трёх типов СК2 способствует инициации сборки транскрипционного комплекса; стимулирует диссоциацию архитектурных белков хроматина (HP1, HMGN1); регулирует активность HDAC1 и ферментов, осуществляющих микро- и макроманипуляции ДНК (ДНК-лигаза,

Принятые сокращения: AC – аденилатциклаза; AR – андрогеновый рецептор; Akt/PKB, RAC-alpha – serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha; BSA – бычий сывороточный альбумин; CaMK – Ca/кальмодулин-зависимая протеинкиназа; CDKs – циклин-зависимые протеинкиназы; CK1 – casein kinase 1; DARPP32 – dopamine and cAMP regulated phosphoprotein 32-kDa; ER – эстрогеновый рецептор; Erk1/2 – extracellular signal-regulated kinase; HDAC1 – гистондеацетилаза 1; HP1 – heterochromatin protein 1, HMG14/HMGN1 – non-histone chromosomal protein High Mobility Group 14 / High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 1 containing protein; IR – инсулиновый рецептор; Jnk – c-Jun N-terminal kinase; PKA – протеинкиназа A; PKC – протеинкиназа C; PMSF – фенилметилсульфонил фторид; PP2B – протеинфосфатаза 2B; PP2C – протеинфосфатаза 2C; RAF-ERK – сигнальный путь стресс и митоген активируемых протеинкиназ, передающий сигнал от протеинкиназ Raf1/A/B к эффекторным киназам; PR – прогестероновый рецептор; TR – рецептор тиреоидных гормонов; VDR – рецептор витамина D; ДП – долговременная память, САЭ – структурные аналоги этимизола, TAX – транскрипционная активность хроматина; ТХУ – трихлоруксусная кислота.

ДНК-топоизомераза II). Субстратами СК2 являются эукариотические факторы инициации трансляции (eIF2B ϵ , eIF3j, eIF4E, eIF5), рибосомальные белки (L22, L41, L5, p0, p1, p2) и РНК-связывающие белки (нуклеофозмин, нуклеолин, и Nopp140) [2, 3, 8].

Уникальные свойства СК2 (постоянная экспрессия при минимальной регуляции, “врождённая” каталитическая активность, отсутствие контроля со стороны вторичных посредников и других протеинкиназ, преимущественно ядерная локализация и тесная связь с белками хроматина) [2, 3, 8] делают СК2-зависимое фосфорилирование мощным механизмом, усиливающим прохождение сигнала к ядру, повышающим открытость хроматина, стимулирующим инициацию и элонгацию транскрипции и начало биосинтеза белка. Это позволяет рассматривать СК2 как “неспецифический эффектор” генной экспрессии [10] и использовать в качестве объекта фармакотерапии для коррекции нарушений памяти различного генеза [11].

Предпосылкой наших исследований явилось то, что СК2 оказалась молекулярной мишенью мнемотропных соединений из группы САЭ, включающей вещества с позитивным и негативным влиянием на ДП [12]. Располагая набором стимуляторов и ингибиторов ДП, представлялось целесообразным использовать САЭ для изучения роли СК2 в механизмах памяти и возможности фармакологического управления процессами слеодообразования [11]. Ранее было показано, что САЭ в зависимости от структуры могут регулировать (стимулировать/ингибировать) активность изолированной СК2 в отношении ряда белков-субстратов (фосфитин, HMG14) [13].

Задачей настоящего исследования было изучить эффекты САЭ на активность СК2 в составе хроматина из нейронов коры и гиппокампа мозга крыс *in vitro*, а также СК2-зависимое фосфорилирование белков хроматина (СК2-ЗФБХ) и транскрипционную активность хроматина (ТАХ) *in vivo*.

МЕТОДИКА

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах (Рапполово) весом 200-220 г (2-3 мес.). Питание и содержание животных осуществлялось в соответствии с ГОСТ 34088-2017 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными”.

В работе использовали САЭ (Институт экспериментальной медицины) с известным действием на ДП [12]: 1-этил-4,5-ди(Н-метил-карбамоил)имидазол (этимизол, ИЭМ-306), 1-этил-4,5-ди-карбамоилимидазол (ИЭМ-834), 1-этил-4-карбамоил-5-метилкарбамоилимидазол (ИЭМ-1512), 1-пропил-4,5-ди(Н-метилкарбамоил)имидазол (ИЭМ-372), 1-этил-4,5-ди(Н-метилкарбамоил)пиразол (ИЭМ-476), и 1-аллил-4,5-ди(Н-метил-карбамоил)имидазол (ИЭМ-336).

Для получения нейрональных клеток кору мозга и гиппокамп измельчали, экспонировали 10 мин в смеси глицерол-вода-ацетон 1:1 (по объёму)

и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Осадок гомогенизировали в растворе глицерол-0,25 М сахароза 3:1 (по объёму) и пропускали через каптроновый фильтр (d=82 мкм). Фильтрат отмывали трёхкратным объёмом 0,9% NaCl (масса/объём) и осаждали при 1000 g в течение 10 мин. Осадок мягко гомогенизировали в 1,75 М сахарозе и центрифугировали 30 мин при 40000 g.

Для получения изолированных ядер осадок, содержащий тела нейронов, гомогенизировали в 0,5%-ном растворе Тритона X-100 на 0,32 М сахарозе (содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7,6), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂), экспонировали 10 мин и центрифугировали 10 мин при 800 g. Процедуру повторяли дважды. Ядерные осадки отмывали в 0,32 М сахарозе, а затем в 0,2 М трис-НСl (рН 7,6) с последующим центрифугированием (10 мин при 1000 g). Конечный осадок суспензировали в 0,32 М сахарозе, содержащей 0,2 М трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ β -глицерофосфат и 0,4 мМ DTT, и хранили при 4°C не более суток. Препараты содержали 90-95% нейрональных ядер по классификации Lovtrup-Rein и McEven [14].

Из ядерной суспензии выделяли хроматин двукратной гомогенизацией в EDTA-буфере (0,02 М EDTA; 0,08 М NaCl; 0,005 М трис-НСl, рН 5,4) с последующей обработкой осадков 0,02 М трис-НСl (рН 8,0). Осадки получали центрифугированием при 1000 g 10 мин. Для получения препаратов растворимого хроматина гелеобразный осадок хроматина суспензировали в 0,02 М трис-НСl (рН 8,0) и обрабатывали ультразвуком (44 кГц, 12 серий по 10 с, интервал 20 с) при 0°C. Нерастворимый осадок удаляли центрифугированием при 12000 g 30 мин. Выход растворимого хроматина составлял ~20% по белку. Препараты растворимого хроматина характеризовались OD_{230/260}=1,3 и соотношением белок/ДНК 3:1. Все среды выделения содержали 1 мМ PMSF.

Одним из уникальных свойств СК2 является способность использовать АТФ/ГТФ в качестве доноров фосфата [1, 2]. Активность СК2 определяли по включению ³³P при инкубации препаратов растворимого хроматина с γ -³³P-ГТФ в течение 1 мин при 30°C. Инкубационная среда содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 5-10 мМ MgCl₂, 0,4 мМ DTT, 10 мМ β -глицерофосфат, 100 мкМ GTP, 100 нМ ³³P-ГТФ (М.А. 60-90 ПБк/моль). Реакцию начинали внесением 50 мкг белка хроматина и останавливали при 0°C добавлением равного объёма 30% (масса/объём) ТХУ, содержащей 10% (масса/объём) PPI, 0,5 мМ GTP и 0,5% (масса/объём) BSA. Пробы переносили на фильтры (d=0,24 мкм), промывали 25% (m/V) ТХУ и определяли радиоактивность в сцинтиллаторе Брзя. За активность СК2 принимали дефицит включения метки в присутствии ингибиторов СК2 – гепарина (1 мкг/мл) или 20 мкМ DRB (5,6-дихлор-1- β -D-рибофуранозилбензимидазол) [1, 2].

ТАХ определяли по включению ³H-UMP (М.А. 860 ТБк/М) при инкубации ядерной суспензии в течение 10 мин при 37°C. Инкубационная среда содержала: 40 мМ трис-НСl (рН 8,0); 70 мМ KCl,

ВЛИЯНИЕ САЭ НА СК2 ХРОМАТИНА И ТРАНСКРИПЦИЮ

5 mM MgCl₂, 1,3 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM GTP и 1 mM CTP, 0,1 mM ³H-UTP. Реакцию начинали добавлением 10 мкг ДНК ядерной суспензии и останавливали при 0°C добавлением 10% ТХУ. Пробы отмывали 5% ТХУ и 96% (по объёму) этанолом на фильтрах (d=0,38 мкм), и считали радиоактивность. ДНК-зависимость включения контролировали по ингибирующему эффекту (95%) актиномицина D (62 мг/мл). Содержание ДНК определяли по методу Бартон, белка – по методу Лоури (используя BSA в качестве стандарта). Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Количество опытов (n) указано в таблице. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Корреляционный анализ проводили, используя Statistica 6.0.

В работе использовали: Tris, EDTA, ATP, GTP, CTP, DTT, PMSF, MgCl₂, и MnCl₂ (“Serva”, Германия); BSA, β-глицерофосфат, гепарин и DRB (“Sigma-Aldrich”, США); ³³P-GTP и ³H-UTP (“Изотоп”, Россия); и “полиядерные” фильтры (Объединённый институт ядерных исследований). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч., ос.ч. или дополнительно перекристаллизованные.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения влияния САЭ на активность СК2 хроматина *in vitro* САЭ (10⁻⁹-10⁻⁴ М) добавляли к инкубационной смеси. Контрольные пробы не содержали САЭ. Пробы прединкубировали 3 мин, реакцию начинали внесением препаратов хроматина. Неспецифическое включение исключали с помощью холодого и теплого контролей. В первом случае к стандартной среде инкубации добавляли максимальные концентрации САЭ и раствор хроматина, но не инкубировали. Во втором случае вместо хроматина добавляли среду выделения и инкубировали. Затем все пробы обрабатывались в одинаковых условиях.

Установлено, что САЭ в концентрациях 10⁻⁹-10⁻⁵ М способны модулировать (повышать и снижать) активность СК2 хроматина коры и гиппокампа мозга

крыс. Как видно из рисунка 1А, стимуляторы памяти из группы САЭ (ИЭМ-306, ИЭМ-834, ИЭМ-1512) повышали активность СК2 хроматина нейронов на 16-88% в концентрациях 10⁻⁹-10⁻⁶ М с пиком (81-88%) при 10⁻⁸-10⁻⁷ М. В то же время, ингибиторы памяти (ИЭМ-336, ИЭМ-372) снижали активность СК2 хроматина на 17-52% с пиком (минус 48-52%) при 10⁻⁷-10⁻⁶ М. При этом не оказывающий действия на память САЭ (ИЭМ-476) [11, 12, 15] не влиял на активность СК2 в широком диапазоне концентраций.

Сходным образом САЭ действовали на СК2 хроматина из нейронов гиппокампа (рис. 1Б), активность которой была в 1,4 раза выше, чем в коре мозга. Стимуляторы памяти из группы САЭ вызывали подъём активности СК2 (21-94%) в концентрациях 10⁻⁹-10⁻⁶ М с пиком (83-94%) при 10⁻⁸-10⁻⁷ М, ингибиторы памяти снижали активность СК2 хроматина (на 16-48%) в концентрациях 10⁻⁸-10⁻⁵ М с максимальным эффектом (минус 33-48%) при 10⁻⁸-10⁻⁷ М, а ИЭМ-476 не влиял на активность СК2.

На рисунке 1 видна колоколообразная форма кривых “доза-эффект” при действии САЭ. Сходная кинетика наблюдалась при изучении чувствительности СК2 к стимулирующему действию MgCl₂, ионной силы и полиаминов [16-18], а также в наших исследованиях при действии САЭ в системе СК2-НMG14 [13]. В отличие от гиперболических или сигмообразных кривых, колоколообразные кривые “доза-эффект” характерны для мультисубъединичных ферментов и, предположительно, отражают взаимодействие между отдельными субъединицами. Одним из механизмов, ограничивающих активность СК2, является автофосфорилирование регуляторной β-субъединицы [19]. Можно предположить, что при действии САЭ снижение активности СК2 по достижении пика (10⁻⁸-10⁻⁷ М) связано с автофосфорилированием СК2β и представляет собой молекулярный фидбэк при гиперактивации фермента. Интересно, что дозы САЭ, эффективные в отношении памяти (1,5-3 мг/кг ~ 0,7-1,4×10⁻⁷ М) [12, 15], располагаются в том же диапазоне.

Таблица. Взаимосвязь СК2-3ФБХ–ТАХ при действии САЭ

Выборка	Интервал (мин)	n	Кора		Гиппокамп	
			r	p	r	p
контроль + САЭ	0-180	60	0,73	0,00	0,45	0,00
САЭ	30-180	48	0,78	0,00	0,45	0,00
ИЭМ-372	30-180	12	0,86	0,00	0,70	0,01
ИЭМ-834 + ИЭМ-1512	30-180	24	0,46	0,02	0,27	0,20
САЭ	120-180	24	0,65	0,00	-0,17	0,43
ИЭМ-834 + ИЭМ-1512	120-180	12	-0,20	0,53	0,66	0,02
САЭ	30-60	24	0,94	0,00	0,91	0,00
ИЭМ-834 + ИЭМ-1512	30-60	12	0,94	0,00	0,65	0,04
ИЭМ-372	30-60	6	0,89	0,02	0,71	0,11
САЭ	30	12	0,83	0,00	0,89	0,00
САЭ	60	12	0,94	0,00	0,97	0,00

Примечание: n – количество наблюдений, r – коэффициент Спирмена, p – уровень значимости r.

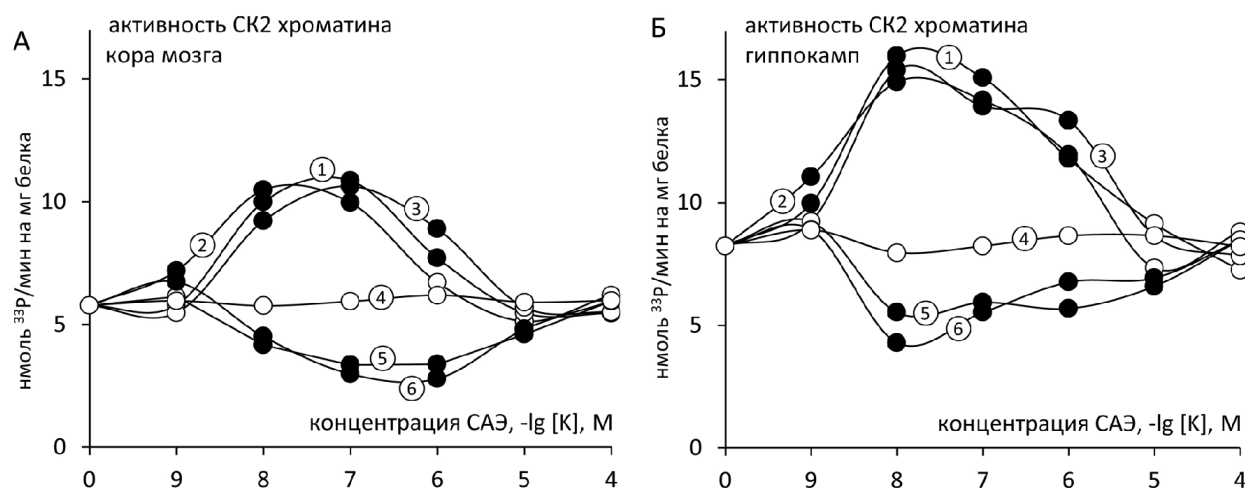


Рисунок 1. Влияние САЭ на активность СК2 хроматина нейронов коры (А) и гиппокампа (Б) мозга крыс. 1 – ИЭМ-306; 2 – ИЭМ-834; 3 – ИЭМ-1512; 4 – ИЭМ-476; 5 – ИЭМ-362; 6 – ИЭМ-372; • – $p < 0,05$ к контролю; $n=5$.

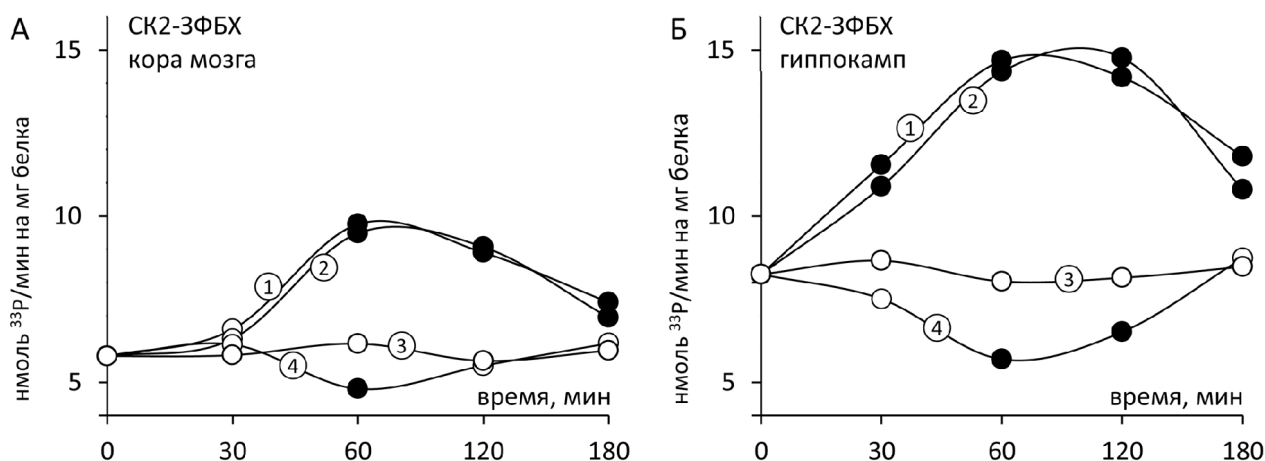


Рисунок 2. Динамика СК2-3ФБХ нейронов коры (А) и гиппокампа (Б) мозга крыс после инъекции САЭ (3 мг/кг). 1 – ИЭМ-834; 2 – ИЭМ-1512; 3 – ИЭМ-476; 4 – ИЭМ-372; • – $p < 0,05$ к контролю; $n=3$.

В следующей серии экспериментов изучали эффекты САЭ при системном введении в дозе 3 мг/кг внутривенно (в/вр). Контролем служили интактные животные и животные, получавшие инъекции физраствора в том же объеме, как и опытные. Через 30 мин, 60 мин, 120 мин и 180 мин после инъекции САЭ определяли уровень СК2-3ФБХ и ТАХ.

Активность СК2 определяли, как и в предыдущих опытах. Пробы преинкубировали, добавляли препараты хроматина и рассчитывали включение ^{33}P в белки хроматина относительно наибольшего из контролей (холодового/теплого). Учитывая, что *in vivo* возможно изменение локальной концентрации СК2 и белков-субстратов в ядре, результаты опытов трактовали как влияние САЭ на СК2-3ФБХ. Так, благодаря NLS и способности взаимодействовать с bZIP-доменами ряда транскрипционных факторов (ATF1, GST, CREB, CRE-BP1, Fos, Jun), СК2 может быстро перемещаться из цитоплазмы в ядро и ассоциироваться с промоторными участками ДНК [2]. В результате СК2 получает возможность фосфорилировать

не только непосредственные партнеры по связыванию, но и белки ближайшего окружения, такие как ко-активаторы транскрипции, ремоделирующие комплексы и архитектурные факторы хроматина. В этих опытах (рис. 2) установлено, что стимуляторы памяти из группы САЭ (ИЭМ-834, ИЭМ-1512) вызывают подъем СК2-3ФБХ нейронов в коре (14-64%) и гиппокампе (31-79%) с пиком на 60-120 мин, тогда как ингибитор памяти (ИЭМ-372) снижает СК2-3ФБХ (на 17-31%) в коре и гиппокампе с максимумом на 60 мин.

В параллельных экспериментах изучали ТАХ. В ответ на обучение или действие биологически активных веществ хроматин клеток мозга претерпевает динамические преобразования, включающие связывание транскрипционных активаторов, декомпактизацию и перемещение нуклеосом, модификации ДНК, формирование комплексов РНК-полимеразы, которые, предположительно, лежат в основе “памяти хроматина” [20]. Все эти изменения формируют “слепок” структуры хроматина, отражающий степень его открытости и готовности к транскрипции в текущий момент времени.

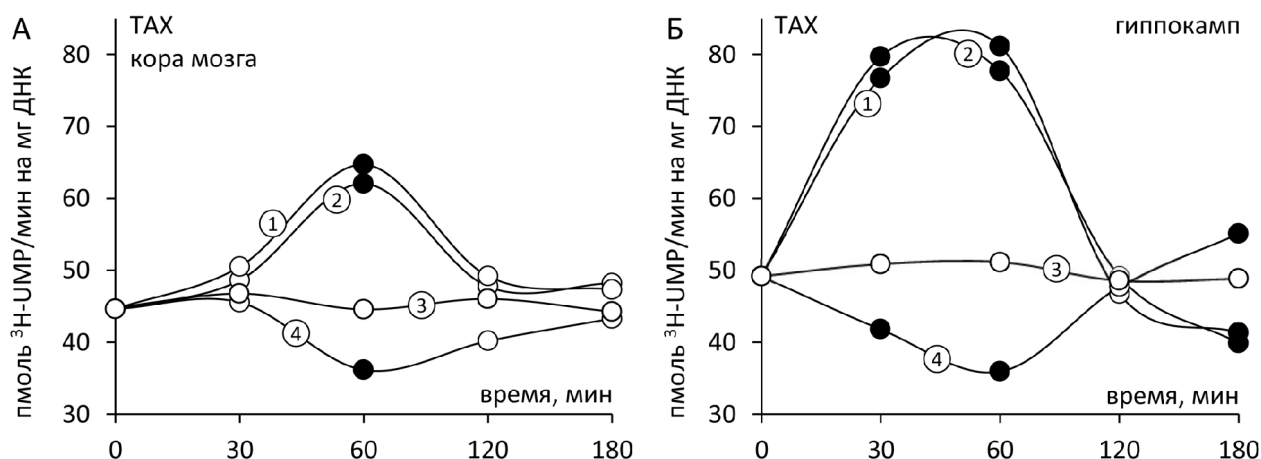


Рисунок 3. Динамика TAX нейронов коры (А) и гиппокампа (Б) мозга крыс после инъекции САЭ (3 мг/кг). 1 – ИЭМ-834; 2 – ИЭМ-1512; 3 – ИЭМ-476; 4 – ИЭМ-372; • – $p < 0,05$ к контролю; $n = 3$.

При этом в препаратах изолированных ядер остаются неизменными все компоненты транскрипционной машины (эндогенные РНК-полимеразы, главные факторы транскрипции) и другие белки, необходимые для транскрипции. В этом плане TAX представляется удобной физиологической моделью для характеристики функционального статуса хроматина.

Для определения TAX пробы преинкубировали, вносили изолированные ядра и рассчитывали включение ³H-UMP. Уровень неспецифического включения контролировали с помощью холодных и тепловых проб. Установлено (рис. 3), что в коре мозга, начиная с 30 мин, стимуляторы СК2 (ИЭМ-834, ИЭМ-1512) повышают TAX с пиком (39-45%) на 60 мин. В эти сроки ингибитор СК2 (ИЭМ-372) снижал TAX на 19%. Более выраженные изменения TAX наблюдали в гиппокампе. Стимуляторы СК2 повышали TAX на 56-65% с пиком на 30-60 мин, тогда как ингибитор СК2 снижал TAX на 15-27%.

В этих опытах привлекает внимание инверсия эффектов стимуляторов и ингибиторов СК2 в гиппокампе на поздних сроках. Так, ИЭМ-372 показал прирост TAX в 12% при возвращении СК2-ЗФБХ к норме на 180 мин. Сходным образом при действии стимуляторов СК2 подъём TAX начинался с 30 мин, достигал максимума к 60 мин, а затем возвращался к исходному уровню (120 мин), продолжая снижаться до минус 16-19% к 180 мин. При этом, снижение TAX в гиппокампе (относительно пика на 120 мин и выхода на отрицательные значения к 180 мин) наблюдалось на фоне высокого уровня СК2-ЗФБХ (30-180 мин, рис. 2). В эти сроки в коре мозга не было отмечено подобного спада TAX при относительно высоком уровне СК2-ЗФБХ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения зависимости TAX от уровня СК2-ЗФБХ проводили корреляционный анализ. Выборки включали значения СК2-ЗФБХ и TAX в контроле и через 30 мин, 60 мин, 120 мин и 180 мин после введения САЭ в коре и гиппокампе. На рисунке 4 представлена диаграмма рассеивания

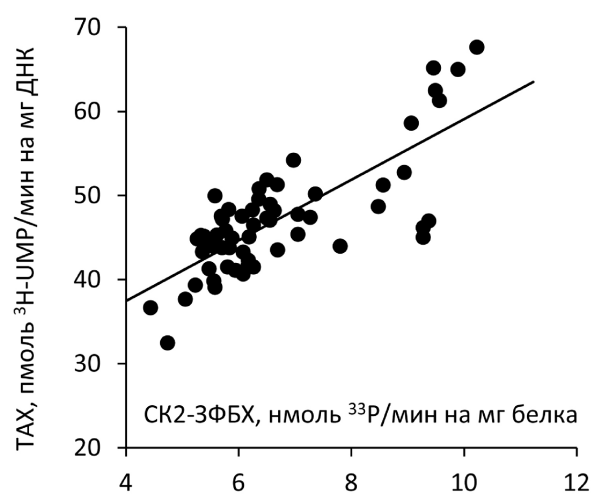


Рисунок 4. Зависимость TAX от СК2-ЗФБХ при действии САЭ в нейронах коры мозга крыс, $n = 60$.

для коры мозга. Тесты Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка показали частично ассиметричное распределение переменных в подгруппах, поэтому в дальнейшем связь между выборками оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (r) и уровню его значимости (p).

Результаты анализа (таблица) показали, что в коре мозга TAX позитивно коррелирует с СК2-ЗФБХ ($r = 0,73$). Чем ближе модуль r к единице, тем более тесной является связь между измеряемыми величинами. В данном случае $r > 0,7$ является показателем сильной и прямой связи. Сходную оценку даёт коэффициент ранговой конкордации (τ) Кендалла ($\tau = 0,55$; $p = 0,00$). Однако в гиппокампе такой чёткой связи не наблюдалось ($r = 0,45$; $\tau = 0,36$). Связь СК2-ЗФБХ–TAX в гиппокампе характеризуется как прямая, но слабая.

Поскольку нас формально интересует, насколько эффекты САЭ на СК2-ЗФБХ определяют течение транскрипции, из выборок удаляли значения СК2-ЗФБХ и TAX у контрольных животных. Как видно из таблицы, между действием САЭ на СК2-ЗФБХ и TAX прослеживается

чёткая корреляция ($r=0,78$) в коре мозга, менее выраженная ($r=0,45$) в гиппокампе. Для сравнения анализировали зависимость TAX от СК2-3ФБХ при действии ингибитора СК2 (ИЭМ-372) и стимуляторов СК2 (ИЭМ-834, ИЭМ-1512) по отдельности. Оказалось, в коре и гиппокампе значения r при действии ингибитора СК2 составляют 0,86 и 0,70, а для активаторов СК2 – 0,46 и 0,27.

При рассмотрении физиологического смысла корреляции СК2-3ФБХ–TAX следует учитывать, что TAX – интегративный показатель, отражающий работу множества белков (транскрипционных факторов, ко-активаторов и ко-репрессоров транскрипции, архитектурных белков, ферментов ремоделирования хроматина, комплексов РНК-полимераз), а также других протеинкиназ (CDKs, PKA, PKC, CK1), присутствующих в ядре. При этом СК2 может оказывать как позитивное, так и негативное действие на функции этих белков, и это действие может быть прямым и опосредованным.

Так, СК2 непосредственно фосфорилирует c-Jun, снижая его ДНК-связывающую активность, и, наоборот, СК2 повышает ДНК-связывающую способность SRF путём фосфорилирования и опосредованно активирует FOS, содержащий SRE в области промотора [2]. СК2 может облегчать фосфорилирование белков-мишеней другими протеинкиназами. Фосфорилируя IκB (inhibitor κB), СК2 стимулирует его расщепление и высвобождение NF-κB, который затем фосфорилируется PKA. В более сложном случае СК2 фосфорилирует убиквитинлигазу Mdm2, дестабилизирует комплекс Mdm2–p53 и способствует накоплению p53. Одновременно СК2 снижает способность p53 связываться с ДНК [2], противодействуя PKC, повышающей ДНК-связывающую активность p53.

Наиболее убедительные доказательства критической роли СК2 в регуляции TAX даёт сопоставление эффектов ингибитора СК2 из группы САЭ (ИЭМ-372). Из всех САЭ, наиболее высокие значения r (0,86 и 0,70) в коре и гиппокампе обнаружены при действии ИЭМ-372. Однако низкие (0,46) и статистически недостоверные (0,27; $p=0,2$) значения r при действии стимуляторов СК2 свидетельствуют, что в интервале 30-180 мин данная модель неудовлетворительно описывает зависимость TAX от СК2-3ФБХ при действии САЭ.

Одной из причин отсутствия чёткой связи СК2-3ФБХ–TAX может быть различная временная динамика этих процессов (рис. 2 и 3). Если высокий/низкий уровень СК2-3ФБХ может поддерживаться продолжительное время (30-180 мин) за счёт прямого модулирующего действия САЭ на активность СК2 (рис. 1), то TAX непосредственно не зависит от САЭ и подчиняется собственным регуляторным законам. Одним из свойств транскрипции является волновой характер генного ответа, универсальный для действия различных эпигенетических стимулов (факторы роста, стресс, обучение, действие лекарственного препарата) в клетках эукариот [21-23]. В наиболее хорошо изученном случае при действии EGF [24],

в первые 15-60 мин после стимуляции происходит экспрессия генов немедленного ответа, продукты которых индуцируют вторую волну экспрессии поздних (эффекторных) генов, выполняющих адаптивные функции при изменении условий внешней среды (или консолидирующие след памяти при обучении). Между первой и второй волнами экспрессии генов обычно происходит экспрессия медленных ранних генов, продукты которых могут оказывать негативный фидбэк в отношении пускового механизма транскрипции. Для EGF такими белками являются MAPK-фосфатазы, которые дефосфорилируют и инактивируют MAPK, опосредующие эффект EGF; или белок ZFP36, дестабилизирующий мРНК EGF. Отрицательную обратную связь в отношении СК2-3ФБХ может осуществлять протеинфосфатаза PP2A (образующая комплекс с СК2α), а в отношении TAX – HDAC1/2 (субстрат СК2, относящийся к репрессорным элементам хроматина) [8]. Волновой характер TAX представляется рациональным объяснением снижения TAX в гиппокампе на 120-180 мин при высоком уровне СК2-3ФБХ. Более того, можно предположить, что подъём СК2-3ФБХ в первые 30-60 мин запускает первую волну экспрессии ранних генов, достигающую пика к 60 мин, по завершении которой TAX снижается, чтобы дать начало второй волне экспрессии поздних генов, происходящей обычно через 4-6 ч.

Приведенные доводы стимулировали поиск временных интервалов, в которых эффекты САЭ на СК2-3ФБХ максимально коррелируют с TAX. Таким оказался диапазон 30-60 мин (таблица). В этом интервале определяются наиболее высокие коэффициенты корреляции СК2-3ФБХ–TAX при действии стимуляторов СК2 ($r=0,94$ и $r=0,65$) и всех САЭ ($r=0,94$ и $r=0,91$) как в коре, так и в гиппокампе. На протяжении 30-60 мин ИЭМ-372 чётко ингибирует СК2-3ФБХ и TAX ($r=0,89$ и $r=0,71$) в обоих структурах мозга. Низкий уровень значимости r при действии ИЭМ-372 в гиппокампе ($p=0,11$), очевидно, связан с ограниченным числом наблюдений ($n=6$). Для сравнения, в интервале 120-180 мин все САЭ демонстрируют невысокий r (0,65) в коре и отсутствие связи в гиппокампе. В этот период эффекты стимуляторов СК2 (ИЭМ-834, ИЭМ-1512) на СК2-3ФБХ слабо коррелируют с TAX ($r=0,66$) в гиппокампе, и не отражаются на TAX в коре.

Выявленный нами временной интервал в 30-60 мин после введения САЭ хорошо известен исследователям памяти. Согласно современным представлениям, состояние транскрипции и трансляции в первые 60 мин после обучения является критическим для консолидации памяти (перехода кратковременной памяти в ДП) [21, 23]. Ингибиторы синтеза РНК и белка, введённые в этот период, приводят к необратимым нарушениям ДП [15, 22], а результаты нашего исследования свидетельствуют, что активация СК2-зависимых механизмов регуляции транскрипции в этот период приводит к улучшению сохранения условных рефлексов.

И наконец, для обобщения результатов исследования (рис. 5) представлялось целесообразным выделить наиболее репрезентативные показатели влияния САЭ на активность СК2, СК2-ЗФБХ, ТАХ и ДП. Из рисунка 1 видно, что максимальное стимулирующее/ингибирующее действие САЭ на активность СК2 происходит в диапазоне концентраций 10^{-8} - 10^{-7} М. Концентрация САЭ 10^{-7} М была выбрана как наиболее близкая к терапевтическим концентрациям (1,5-3 мг/кг) [12, 15]. В концентрации 10^{-8} М САЭ оказывают сходное в качественном и количественном отношении действие, более выраженное в гиппокампе.

Для характеристики эффектов САЭ на СК2-ЗФБХ и ТАХ *in vivo* был определен временной интервал – 60 мин, дающий наиболее высокое суммарное значение r (0,94 + 0,97) в коре и гиппокампе (таблица). Сходные показатели ($r=0,94$ и $r=0,91$) наблюдали на протяжении всего периода консолидации ДП (30-60 мин).

Спектр мнемотропных эффектов САЭ был детально изучен ранее [12, 15]. САЭ улучшали память у нормальных животных и животных с когнитивными дефицитами различного генеза (аномальный эмбриогенез, гонадэктомия, гиперхолестеринемия, старение) [12, 15, 25], а этимизол успешно использовался для формирования искусственных стабильных функциональных связей у человека [26]. На рисунке 5 представлены эффекты САЭ на сохранение условной реакции активного избегания в Y-образном лабиринте. В этих экспериментах

белых беспородных крыс-самцов (200-220 г) обучали по сигналу покидать предпочтительный “тёмный” отсек [15]. По завершении тренинга животным вводили САЭ (1,5 мг/кг, в/бр). При тестировании через 30 дней определяли количество животных, сохранивших выработанный навык. Как видно из рисунка 5, САЭ (ИЭМ-834, ИЭМ-1512), повышающие активность СК2 *in vitro* и уровень СК2-ЗФБХ и ТАХ на стадии консолидации ДП, усиливают эффект обучения, а ингибитор СК2, СК2-ЗФБХ и ТАХ (ИЭМ-372) ухудшает сохранение следа памяти. При этом, неактивный в отношении памяти ИЭМ-476 не влияет на активность СК2, СК2-ЗФБХ и ТАХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что: (а) САЭ в зависимости от структуры могут повышать или снижать активность СК2 хроматина в нейронах коры и гиппокампа мозга крыс в опытах *in vitro* и СК2-зависимое фосфорилирование белков хроматина *in vivo*; (б) эффекты САЭ на СК2-зависимое фосфорилирование белков хроматина на протяжении 60 мин после введения строго коррелируют с влиянием этих веществ на транскрипционную активность хроматина *in vivo*, играющую критическую роль в механизмах консолидации ДП. Полученные результаты представляют практический интерес для разработки методов фармакологической коррекции процессов обучения и памяти с использованием модуляторов СК2 из группы САЭ.

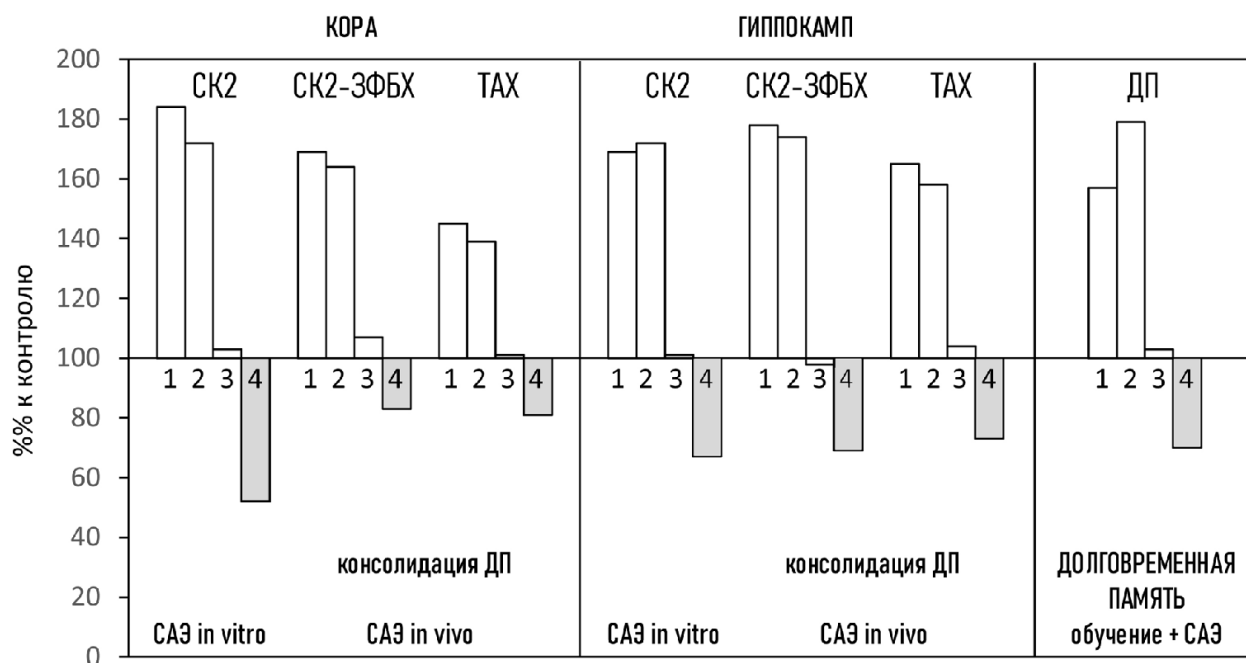


Рисунок 5. Эффекты САЭ на СК2 *in vitro*, и СК2-ЗФБХ и ТАХ *in vivo* в нейронах коры и гиппокампа – определяют характер действия этих веществ на ДП. По оси абсцисс: активность СК2 при действии САЭ (10^{-7} М); СК2-ЗФБХ через 60 мин после введения САЭ (3 мг/кг); ТАХ через 60 мин после введения САЭ (3 мг/кг); сохранение УРАИ через 30 дней после введения САЭ (1,5 мг/кг). По оси ординат: эффекты САЭ в %% относительно соответствующих контролей. 1 – ИЭМ-834; 2 – ИЭМ-1512; 3 – ИЭМ-476; 4 – ИЭМ-372; $n=3$. В коре и гиппокампе связи (СК2-СК2-ЗФБХ, СК2-ТАХ, СК2-ДП, СК2-ЗФБХ-ТАХ, СК2-ЗФБХ-ДП, и ТАХ-ДП) – характеризуются высокими коэффициентами корреляции ($r=0,82$ - $0,99$ при $p=0,00$).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с международным документом ETS №123 "Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях" (Страсбург, 18.03.1986-15.06.2006) и с одобрения локального комитета по биоэтике.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allende J.E., Allende C.C. (1995) FASEB J., **9**, 313-323.
2. Blanquet P.R. (2000) Prog. Neurobiol., **60**, 211-246.
3. Pinna L.A. (2002) J. Cell Sci., **115**, 3873-3878.
4. Litchfield D.W. (2003) Biochem. J., **369**, 1-15.
5. Olsten M.E., Litchfield D.W. (2004) Biochem. Cell Biol., **82**, 681-693.
6. Leroy D., Heriché J.K., Filhol O., Chambaz E.M., Cochet C.J. (1997) Biol. Chem., **272**, 20820-20827.
7. Смирнов И.В., Дмитриев С.И., Макаров В.Л. (1987) Мол. биол. (Москва), **21**, 1411-1421. [Smirnov I.V., Dimitrov S.I., Makarov V.L. (1986) Mol. Biol. (Moscow), **21**, 1411-1421.]
8. Meggio F., Pinna L.A. (2003) FASEB J., **17**, 349-368.
9. Giese K.P., Mizuno K. (2013) Learn. Mem., **20**, 540-552.
10. Barz T., Ackermann K., Dubois G., Eils R., Pyerin W. (2003) J. Cell Sci., **116**, 1563-1577.
11. Рейхардт Б.А., Куликова О.Г., Сапронов Н.С. (2002) Вестник РАМН, **12**, 20-24. [Reikhardt B.A., Kulikova O.G., Sapronov N.S. (2002) Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk., **12**, 20-24.]
12. Рейхардт Б.А., Сапронов Н.С. (2007) Эксп. клин. фармакол., **70**, 62-68. [Reikhardt B.A., Sapronov N.S. (2007) Eksp. Klin. Farmakol., **70**, 62-68.]
13. Куликова О.Г., Рейхардт Б.А. (1996) Биохимия, **61**, 1046-1055. [Kulikova O.G., Reikhardt B.A. (1996) Biochemistry (Moscow), **61**, 750-756.]
14. Lovtrup-Rein H., McEwen B.J. (1986) Cell Biol., **30**, 405-415.
15. Шабанов П.Д., Бородин Ю.С. (1989) Нарушения памяти и их коррекция, Наука, Л. [Shabanov P.D., Borodkin Yu.S. (1989) Narusheniya Pamyati i ih Korrekciya, Nauka, L.]
16. Glover C.V., Shelton E.R., Brutlag D.L. (1983) J. Biol. Chem., **258**, 3258-3265.
17. Hathaway G.M., Traugh J.A. (1983) Methods Enzymol., **99**, 317-331.
18. Li H., Roux S.J. (1992) Plant Physiol., **99**, 686-692.
19. Agostinis P., Goris J., Pinna L.A., Merlevede W. (1987) Biochem. J., **248**, 785-789.
20. Rothbart S.B., Strahl B.D. (2014) Biochim. Biophys. Acta, **1839**, 627-643.
21. Igaz L.M., Vianna M.R., Medina J.H., Izquierdo I. (2002) J. Neurosci., **22**, 6781-6789.
22. Hernandez P.J., Abel T. (2008) Neurobiol. Learn. Mem., **89**, 293-311.
23. Lefer D., Perisse E., Hourcade B., Sandoz J., Devaud J.M. (2012) Learn. Mem., **20**, 29-33.
24. Avraham R., Yarden Y. (2011) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **12**, 104-117.
25. Рейхардт Б.А., Куликова О.Г., Борисова Г.Ю., Александрова И.Я., Сапронов Н.С. (2002) Психофармакол. биол. наркол., **2**, 211-218. [Reikhardt B.A., Kulikova O.G., Borisova G.Yu., Aleksandrova I.Ya., Sapronov N.S. (2002) Psihofarmakol. Biol. Narkol., **2**, 211-218.]
26. Смирнов В.М., Бородин Ю.С. (1979) Артифициальные стабильные функциональные связи, Медицина, Л. [Smirnov V.M., Borodkin Yu.S. (1979) Artificial'nye Stabil'nye Funkcional'nye Svyazi, Medicina, L.]

Поступила в редакцию: 24. 10. 2019.
После доработки: 21. 04. 2020.
Принята к печати: 21. 04. 2020.

EFFECT OF ETIMIZOLE STRUCTURAL ANALOGUES ON PROTEIN KINASE CK2, PROTEIN PHOSPHORYLATION AND TRANSCRIPTION OF CHROMATIN IN RAT BRAIN CORTEX AND HIPPOCAMPUS

B.A. Reikhardt*, P.D. Shabanov

Institute of Experimental Medicine,
12 Akad. Pavlov str., S-Petersburg, 197376 Russia; *e-mail: reichardt@mail.ru

Protein kinase CK2 is an important enzyme in the nervous system. The nuclear forms of CK2 regulate chromatin structure and gene expression, the key processes for long-term memory formation. Memory modulators, the Structural Analogues of Etimizole (SAE), were able to increase or decrease the activity of chromatin-associated CK in the cortex and hippocampus of rat brain *in vitro*. *In vivo* memory enhancers from SAE-group (3 mg/kg) stimulated CK2 activity and the transcriptional ability of chromatin in the cortex and hippocampus, starting from 30 min with a peak for 60 min and a duration up to 180 min. At these periods the memory inhibitor from the SAE-group reduced CK2 activity and chromatin transcription. It is assumed that the modulating effect of SAE on CK2 activity and transcription underlies the effects of these compounds on long-term memory.

Key words: brain; long-term memory; chromatin; transcription; protein phosphorylation; protein kinase CK2

Received: 24.10.2019, revised: 21.04.2020, accepted: 21.04.2020.