

На правах рукописи

**ЕЧИКОВ Сергей Николаевич**

**УЧАСТИЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ В  
МЕХАНИЗМАХ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К  
АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ**

03.00.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино - 2002

Работа выполнена в Институте теоретической и экспериментальной  
биофизики РАН (Пушино)

**Научные руководители:** кандидат биологических наук  
Т. Г. Щипакина  
доктор биологических наук  
О. В. Годухин

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
проф. В. И. Новосёлов  
кандидат физико-математических наук  
Ю. М. Кокоз

**Ведущая организация:** Биологический факультет МГУ  
им. М. В. Ломоносова, г. Москва

Защита диссертации состоится « 3 » июля 2002г. в 13 часов 30 мин. на заседании  
диссертационного совета Д 002 093.01 в Институте теоретической и экспериментальной  
биофизики РАН по адресу: 142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 3, ИТЭБ  
РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке НЦБИ РАН  
По адресу 142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, 3, ИТЭБ РАН.  
Автореферат разослан « 3 » июня 2002г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук

Н. Ф. Ланина

2002-А  
12431

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы:** Эпилепсия представляет собой широко распространенную группу заболеваний центральной нервной системы. В последние годы ведутся интенсивные исследования клеточно-молекулярных механизмов возникновения и поддержания высокой нейрональной возбудимости, лежащей в основе этого заболевания.

Показано, что эпилепсия может сопровождаться изменением свойств определенных рецепторных комплексов и ионных каналов, нарушением внутриклеточного гомеостаза  $Ca^{2+}$  и энергетики нейронов, а так же морфологическими перестройками, приводящими к созданию гипервозбудимых нейрональных сетей. Нарушение нормальной работы нейрона также может быть обусловлено изменениями во внутриклеточной системе регуляции -- системе вторичных посредников. Конечными эффекторами системы вторичных посредников являются протеинфосфотрансферазы (протеинкиназы) - ферменты, осуществляющие одну из самых распространенных посттрансляционных модификаций белков - фосфорилирование. Стоит отметить, что функциональные свойства большинства рецепторных и канальных белков, а так же белков-регуляторов цитоскелета регулируются фосфорилированием. В этой связи, большой интерес представляет изучение фосфорилирования ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP2), так как он является связующим звеном между регуляторными внутриклеточными системами, морфологией и функциональной активностью нейрона. Фосфорилирование этого белка  $Ca^{2+}$ /кальмодулин- (САМКП) и цАМФ- (ПКА) зависимыми протеинкиназами регулирует динамику микротрубочек цитоскелета, которая, в свою очередь может влиять на такие процессы, как внутриклеточный транспорт, кластеризацию рецепторов и поддержание формы дендритов. САМКП и ПКА являются наиболее изученными и распространенными типами протеинкиназ в мозге. Изменение их активности может приводить к модификации функциональной активности большого числа фосфопротеинов, так как эти протеинкиназы обладают широкой субстратной специфичностью. Длительные изменения фосфорилирования белков и активности протеинкиназ показаны при долговременной потенциации синаптической передачи, процессах, связанных с обучением и некоторыми патологическими состояниями мозга. Однако, данные об участии протеинкиназ и фосфопротеинов в процессах, ответственных за возникновение и поддержание гипервозбудимости нейронов, крайне немногочисленны.

Известно, что некоторые формы эпилепсии передаются по наследству. Существует гипотеза о наследовании не самого заболевания, а лишь предрасположенности к его развитию. С этой точки зрения, представляется актуальным исследование клеточно-молекулярных механизмов, определяющих предрасположенность к развитию эпилепсии.

БИБЛИОТЕКА  
С.Петербург  
09 2002 акт 498

**Цель и задачи исследования:** Целью данной работы являлось исследование особенностей цАМФ- и  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин- зависимых систем фосфорилирования нейрональных белков и состояния тубулинового цитоскелета в мозге крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), обладающих наследственной предрасположенностью к аудиогенным судорогам.

В задачи исследования входило:

1. Выявление особенностей функционирования ПКА и САМКП в мозге крыс линии КМ по сравнению с крысами Вистар.
2. Исследование характера изменений активности ПКА и САМКП в мозге крыс КМ после процедуры «аудиогенного киндлинга» (АКМ), приводящей к появлению судорожной активности в неокортексе и распространению эпилептиформной активности в гиппокампе.
3. Выявление белков, изменение фосфорилирования которых могут сопровождать предрасположенность к аудиогенным судорогам и развитие судорожной активности.
4. Оценка активности ПКА и САМКП в компартментах нейронов, содержащих белки, изменение степени фосфорилирования которых сопровождает нейрональную гипервозбудимость мозга крыс КМ.
5. Определение функционального состояния и содержания высокомолекулярных изоформ MAP2 в неокортексе и гиппокампе крыс линии КМ по сравнению с Вистар и АКМ.
6. Сравнительное исследование структуры тубулиновых микротрубочек цитоскелета апикальных дендритов пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа крыс линии КМ и Вистар.

#### **Научная новизна:**

1. В представленной работе впервые продемонстрировано участие  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназы в механизмах наследственной предрасположенности к аудиогенным судорогам судорогам.
2. Показано возможное участие цАМФ- зависимой протеинкиназы в биохимических механизмах, обуславливающих предрасположенность к аудиогенным судорогам
3. Установлено, что наследственная склонность к аудиогенным судорогам сопровождается увеличением фосфорилирования и содержания ассоциированного с микротрубочками белка 2 в неокортексе и гиппокампе.
4. Показано снижение длины тубулиновых микротрубочек в апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа крыс, предрасположенных к аудиогенным судорогам.

**Научно-практическая значимость исследования:** Результаты, полученные в данной работе указывают на возможную роль фосфорилирования нейрональных белков-регуляторов цитоскелета в механизмах предрасположенности к развитию судорожных состояний и намечают подходы к разработке нового класса антиэпилептических препаратов, мишенью которых является система вторичных посредников.

**Апробация работы:** Результаты работы были представлены на совместном заседании секции «Нейробиология» Ученого совета ИГЭБ РАН с Пушкинским отделением Физиологического общества (Пушино, 2002), конференции "Цитоскелет и клеточная регуляция" (Пушино, 2000), 2 съезде биофизиков России (Москва, 1999), Всероссийской школе молодых ученых "Актуальные проблемы нейробиологии" (Казань, 2000).

**Публикации:** По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

**Структура и объем диссертации:** Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и «Выводы». Диссертация изложена на \_\_\_ страницах, содержит \_\_\_ рисунков, \_\_\_ таблиц и библиографический список из \_\_\_ наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Материалы и методы исследования.**

Каждая серия выполнена на 3 группах самцов крыс возрастом 80-90 дней: (1) крыс Вистар (Вистар, n=7), крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ, n = 7) и крыс КМ после выработки аудиогенного киндлинга (АКМ, n = 7) Аудиогенный киндлин у КМ вырабатывали ежедневным однократным звуковым воздействием (115дБ, 12-16 кГц) в течение 20 дней, что приводило к увеличению тяжести судорог и появлению миоклонической компоненты припадка, свидетельствующей о распространении судорожной активности в гиппокамп Животных группы АКМ брали в эксперимент через 2 дня после последней звуковой стимуляции. Анализ активностей ПКА и САМКП, а так же оценку фосфорилирования белков проводили в неокортексе и гиппокампе – структурах мозга, предрасположенных к развитию судорожной активности.

Измерение активностей ПКА и САМКП в ткани проводили с использованием экзогенных пептидных субстратов (кемптид и сингид 2. соответственно) Были оценены максимальная активность САМКП (отражает содержание САМКП в ткани),  $Ca^{2+}$ /кальмодулин- независимая активность САМКП (функционально значимая активность протенинкиназы) и максимальная активность ПКА Идентификацию ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP2) проводили с помощью моноклональных антител методом иммуноблота и автордиографии

меченого  $^{32}\text{P}$ -MAP2. Оценку содержания MAP2 осуществляли методом иммунодота с использованием моноклональных антител против MAP2 (клон HM-2, Sigma). Анализ свободных сайтов для фосфорилирования ПКА и САМКП на белковых субстратах проводили на основании данных, полученных методом *post hoc* фосфорилирования (оценка интенсивности включения меченого фосфата в белки при максимальной активации протеинкиназы, что отражает количество *in vivo* свободных акцепторных сайтов для фосфата) Выделение фракции тубулиновых микротрубочек и синаптических окончаний (синапсом) проводили методом дифференциального центрифугирования. Морфометрию тубулиновых микротрубочек апикальных дендритов поля CA3 гиппокампа проводили на продольных и поперечных ультратонких срезах при увеличении в 91000 и 65000 раз, соответственно Достоверность полученных результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента и результатам дисперсионного анализа в программе MS-Excel. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ . Все данные в работе представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

#### **Результаты исследований и их обсуждение.**

*Исследование активностей САМКП и ПКА в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ и крыс Вистар.*

Сравнительный анализ активностей САМКП и ПКА в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ и Вистар показал:

1. Максимальная активность САМКП достоверно не отличалась от таковой в неокортексе ( $87 \pm 12\%$ ,  $n = 7$ ) и незначительно снижена в гиппокампе ( $80 \pm 7\%$ ,  $n = 7$ ) КМ по сравнению с Вистар (Рис. 1. А).
2. Функциональная,  $\text{Ca}^{2+}$  - независимая активность САМКП снижена в неокортексе ( $62 \pm 5\%$ ,  $n = 7$ ) и существенно увеличена в гиппокампе ( $207 \pm 26\%$ ,  $n = 7$ ) КМ по сравнению с Вистар (Рис. 1. Б).
- 3 Максимальная активность ПКА увеличена в неокортексе ( $152 \pm 9\%$ ,  $n = 7$ ) и гиппокампе ( $228 \pm 14\%$ ,  $n = 7$ ) КМ по сравнению с Вистар (Рис. 2.).

По данным литературы, высокая  $\text{Ca}^{2+}$  - независимая активность САМКП характерна для структур мозга, предрасположенных к появлению судорожной активности (Perlin et al., 1992). Таким образом, увеличение активности функциональной ( $\text{Ca}^{2+}$  - независимой) формы САМКП в гиппокампе КМ (по сравнению с Вистар) могут говорить о высокой степени предрасположенности к развитию судорожной активности в этой структуре мозга КМ Увеличение нейрональной возбудимости, наблюдаемое после киндлинга (модель эпилептогенеза), приводит к снижению активности САМКП (Blair et al., 1999). Таким образом, снижение функциональной активности САМКП в неокортексе КМ по сравнению с Вистар

может свидетельствовать о сложившемся повышенном уровне нейрональной возбудимости в неокортексе КМ.

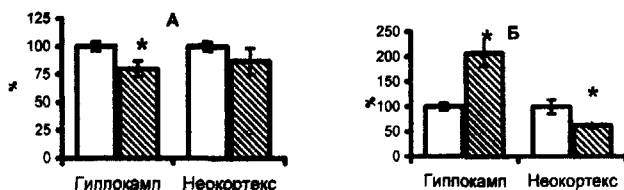


Рис 1 Сравнение максимальной (А) и функциональной,  $Ca^{2+}$  - независимой (Б) активности САМКП в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ (n = 7) и Вистар (n = 7) □ - Вистар (100%), ▨ - КМ \* - p < 0.05

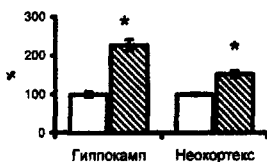


Рис 2 Сравнение максимальной активности PKA в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ (n = 7) и Вистар (n = 7) □ - Вистар (100%), ▨ - КМ \* - p < 0 05

Наблюдаемые различия функциональной активности САМКП между исследуемыми группами крыс, видимо, являются результатом особенностей внутриклеточной системы регуляции активности САМКП (уровень внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , активность фосфатаз). В пользу этого предположения свидетельствует отсутствие значительных различий максимальной активности САМКП, что отражает уровень фермента в мозге экспериментальных групп. Обнаруженное нами увеличение максимальной активности PKA в неокортексе и гиппокампе КМ по сравнению с Вистар может говорить о повышенном содержании этой протеинкиназы в ткани мозга крыс КМ.

*Исследование активностей PKA и САМКП в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ и КМ после выработки аудиогенного киндлинга*

Результаты исследования показали:

1. Максимальная активность САМКП незначительно увеличивалась после аудиогенного киндлинга в неокортексе ( $125 \pm 5\%$ , n = 7), и оставалась неизменной в гиппокампе КМ (Рис. 3 А)
2. Аудиогенный киндлинг вызывал снижение  $Ca^{2+}$  - независимой активности САМКП только в гиппокампе ( $64 \pm 3\%$ , n = 7) (Рис. 3. Б).

3. Аудиогенный киндлинг приводил к росту максимальной активности ПКА в неокортексе КМ ( $129 \pm 8\%$ ,  $n = 7$ ), в гиппокампе достоверных изменений обнаружено не было (Рис. 4).

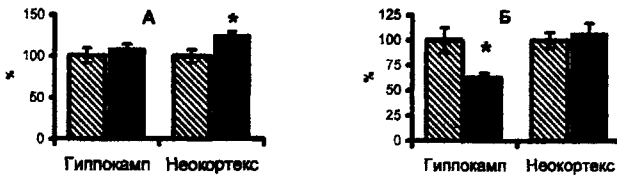


Рис 3 Сравнение максимальной (А) и функциональной,  $\text{Ca}^{2+}$  - независимой (Б) активности САМКП в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ ( $n = 7$ ) и КМ после выработки аудиогенного киндлинга ( $n = 7$ ) ▨ - нативные КМ (100%), ■ - КМ после аудиогенного киндлинга \* -  $p < 0.05$



Рис 4 Сравнение максимальной активности ПКА в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ ( $n = 7$ ) и КМ после выработки аудиогенного киндлинга ( $n = 7$ ). ▨ - нативные КМ (100%), ■ - КМ после аудиогенного киндлинга. \* -  $p < 0.05$ .

По данным литературы, аудиогенный киндлинг приводит к распространению судорожной активности в гиппокамп крыс линии КМ. В полном соответствии с этим феноменом, мы наблюдали снижение функциональной активности САМКП в гиппокампе КМ, что свидетельствует об увеличении возбудимости нейронов гиппокампа после аудиогенного киндлинга. Следует отметить, что наблюдаемое нами снижение функциональной активности САМКП в гиппокампе не было вызвано изменением содержания САМКП в ткани, так как мы не обнаружили изменения общей активности САМКП. Несмотря на стволовую природу аудиогенной эпилепсии, сниженная  $\text{Ca}^{2+}$  - независимая активность САМКП в неокортексе КМ по сравнению с таковой в мозге Вистар, а также отсутствие значительных изменений как общей, так и функциональной активностей этой протеинкиназы после аудиогенного киндлинга, позволяют нам предположить, что у нативных КМ возможна частичная «эпилептизация» ткани неокортекса. Наблюдаемое нами увеличение максимальной активности ПКА в неокортексе крыс группы АКМ может быть вызвано периодическими эпизодами судорожной активности, приводящими к индукции синтеза этого фермента. В то же время, аудиогенный киндлинг приводит к возникновению судорожной активности в гиппокампе, что сопровождается снижением функциональной активности САМКП. Эти данные позволяют



предположить, что процессы индукции и поддержания гипервозбудимости нейронов могут иметь различные механизмы.

Полученные нами данные о вовлеченности PKA и SAMKП в процессы инициации и поддержания судорожной активности позволяют предположить, что обнаруженные особенности функционирования этих протеинкиназ в мозге крыс КМ могут иметь непосредственное отношение к механизмам наследственной предрасположенности к аудиогенным судорогам.

*Сравнительное исследование cAMФ- и Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин (CaM) - зависимого фосфорилирования белков в неокортексе и гиппокампе крыс линии КМ, КМ после аудиогенного киндлинга и крыс Вистар.*

Известно, что интенсивность включения <sup>32</sup>P в фосфопротеины при проведении post-hoc фосфорилирования зависит от соотношения активностей эндогенных протеинкиназ и фосфатаз, определяющих количество свободных акцепторных сайтов для фосфата на молекуле, а также содержания данного фосфопротеина в образце. В любом случае, метод post hoc позволяет выявить функциональную активацию фосфопротеина.

Проведенный анализ радиоавтографов не выявил различий в спектре cAMФ- и Ca<sup>++</sup>/кальмодулин- зависимого фосфорилирования белков гиппокампа и неокортекса у экспериментальных групп Вистар, КМ и АКМ. Этот факт может говорить о том, что наследственная предрасположенность к аудиогенным судорогам, а так же механизмы инициации и поддержания судорожной активности в мозге КМ не могут быть охарактеризованы фосфорилированием специфичных белковых субстратов. Однако, мы обнаружили достоверные количественные различия интенсивности включения <sup>32</sup>P в белковые полосы с молекулярной массой 270 кДа и 42 кДа после проведения CaM- зависимого фосфорилирования (Рис 5.) и в белковые полосы 270 кДа, 58 кДа и 54кДа после проведения cAMФ- зависимого фосфорилирования (Рис 6). В дополнительной серия экспериментов, мы оценили фосфорилирование белков в мозге КМ (n = 7), которых брали в эксперимент через 10 минут после однократного эпизода судорог, вызванных звуковым раздражителем. Результаты серии показали, что судорожная активность способна вызвать изменение интенсивности включения фосфата только в белок с молекулярным весом 42 кДа. Эти данные позволяют утверждать, что обнаруженные нами долговременные изменения фосфорилирования белков 270 кДа, 58 и 54 кДа не являются следствием самой судорожной активности в мозге. Включение <sup>32</sup>P в 270 кДа- белок в неокортексе и гиппокампе крыс линии КМ было достоверно снижено после проведения post hoc фосфорилирования в CaM- зависимой системе по сравнению с таковым в мозге крыс Вистар на 66 ± 6% и 39 ± 2% (n = 7) соответственно (Рис 5 А, В), что свидетельствует о снижении доступных акцепторных мест для фосфорилирования

При проведении *post hoc* фосфорилирования в цАМФ-зависимой системе различий обнаружено не было. В группе КМ после аудиогенного киндлинга мы наблюдали снижение включения  $^{32}\text{P}$  в белок 270 кДа в гиппокампе на  $17 \pm 3\%$  после проведения *post hoc* фосфорилирования в СаМ-зависимой системе (Рис. 5. Б), и на  $66 \pm 5\%$  ( $n = 7$ ) после проведения фосфорилирования в цАМФ-зависимой системе (Рис. 6. Б), по сравнению с нативными КМ.

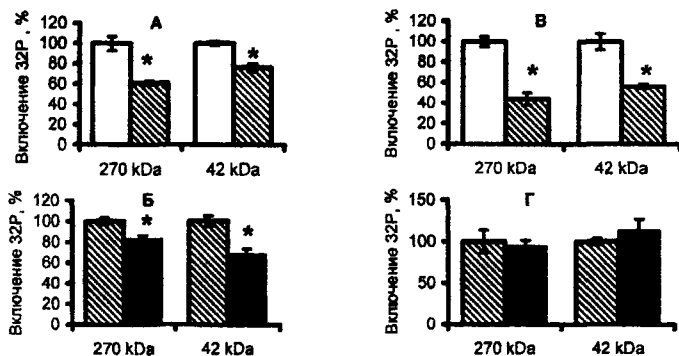


Рис 5 Включение фосфата в белки после проведения Са $^{2+}$ /кальмодулин – зависимого *post hoc* фосфорилирования в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ, КМ после аудиогенного киндлинга и крыс Вистар А, Б – гиппокамп; В, Г – неокортекс □ - Вистар ( $n = 7$ ), ▨ - нативные КМ ( $n = 7$ ), ■ - КМ после выработки аудиогенного киндлинга ( $n = 7$ ) \* -  $p < 0.05$ .

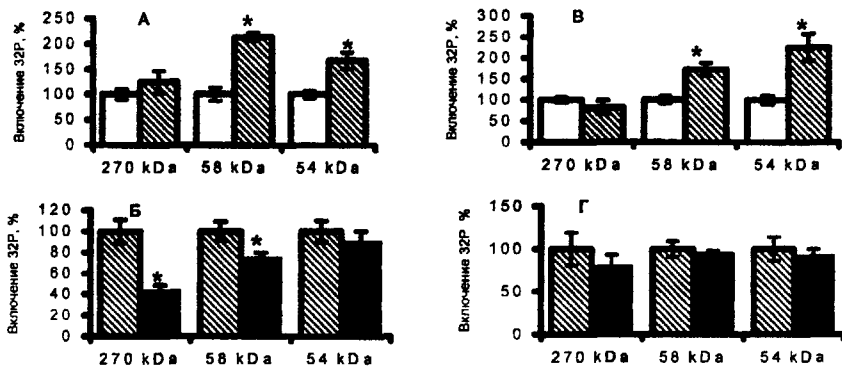


Рис 6 Включение фосфата в белки после проведения цАМФ – зависимого *post hoc* фосфорилирования в гомогенатах неокортекса и гиппокампа крыс линии КМ, КМ после аудиогенного киндлинга и крыс Вистар А, Б – гиппокамп; В, Г – неокортекс □ - Вистар ( $n = 7$ ), ▨ - нативные КМ ( $n = 7$ ), ■ - КМ после аудиогенного киндлинга ( $n = 7$ ) \* -  $p < 0.05$

На основании молекулярной массы (270 кДа) и способности фосфорилироваться как САМКК, так и ПККА, мы идентифицировали этот белок как высокомолекулярную изоформу MAP2, что в дальнейшем было подтверждено с помощью моноклональных антител. Методом

иммунодота было проведено исследование содержания MAP2 в ткани гиппокампа и неокортекса экспериментальных групп животных (Таб 1).

Таб 1 Содержание MAP2 в мозге экспериментальных групп животных

Экспериментальная группа	Неокортекс (нг/мг белка)	Гиппокамп (нг/мг белка)
Крысы Вистар	8.1 ± 1.0	7.4 ± 0.8
Крысы КМ	13.1 ± 1.4 *	18.3 ± 3.2 *
КМ после аудиогенного киндлинга	15.1 ± 0.9	22.7 ± 1.8

У всех групп n = 7 \* - достоверное отличие (p < 0.05) группы КМ от группы Вистар

Суммируя данные, полученные методами *post hoc* и иммунодота можно сделать следующее заключение: так как число свободных для фосфорилирования САМКII мест на MAP2 в образцах гомогенатов гиппокампа и неокортекса КМ ниже, чем у Вистар, а содержание MAP2 существенно увеличено, для мозга крыс линии КМ характерен повышенный уровень фосфорилирования MAP2 *in vivo* по сайтам САМКII. Отсутствие различий в числе свободных для фосфорилирования ПКА мест на MAP2 в образцах гомогенатов гиппокампа и неокортекса КМ и Вистар, совместно с данными о повышенном содержании MAP2 в мозге КМ, может свидетельствовать о том, что *in vivo* степень фосфорилирования MAP2 по сайтам ПКА увеличена в мозге КМ по сравнению с Вистар. Таким образом, наследственная предрасположенность к аудиогенным судорогам, сопровождается увеличением содержания высокомолекулярных изоформ MAP2 и повышением степени их фосфорилирования по акцепторным сайтам, специфичным для ПКА и САМКII.

Аудиогенный киндлинг не приводил к значительным изменениям фосфосостояния и экспрессии MAP2 в неокортексе КМ. Однако, вызванные повторной звуковой стимуляцией появление и распространение судорожной активности в гиппокампе КМ сопровождалось дальнейшим увеличением степени фосфорилирования этого белка САМКII и ПКА, что может служить доказательством вовлеченности процессов фосфорилирования / дефосфорилирования MAP2 в механизмы эпилептогенеза.

Белок с молекулярной массой 42 кДа, изменение фосфорилирования которого мы наблюдали в присутствии Ca<sup>2+</sup>, предположительно, представляет собой  $\alpha$ -субъединицу митохондриальной пируватдегидрогеназы. Эти данные позволяют предположить, что наследственная предрасположенность к аудиогенным судорогам сопровождается изменением функций митохондрий.

Предрасположенность к эпилепсии и ее развитие подразумевает модификацию функций синаптической передачи. Для того, чтобы выявить возможный вклад системы вторичных посредников в модуляцию синаптических функций в мозге крыс КМ нами было предпринято

исследование фосфорилирования белков в синаптических окончаниях (препарат синаптосом), выделенных из неокортекса и гиппокампа.

После проведения *post hoc* фосфорилирования мы обнаружили снижение суммарной интенсивности включения  $^{32}\text{P}$  в белковые полосы с молекулярной массой 86 и 80 кДа в гиппокампе крыс групп АКМ (на  $35 \pm 5\%$  в цАМФ-зависимой системе и на  $22 \pm 2\%$  в СаМ-зависимой системе,  $n = 7$ ) по сравнению с КМ, что может свидетельствовать об увеличении степени фосфорилирования этих белков *in vivo*. Их субклеточная локализация (синаптические окончания), молекулярный вес, а так же способность фосфорилироваться как ПКА, так и САМКП, позволили предположить, что эти фосфопротеины представляют собой белки семейства синапсина – изоформы 1a и 1b, соответственно. Увеличение *in vivo* степени фосфорилирования синапсина служит маркером активного транспорта синаптических везикул к активной зоне и повышенной нейрональной активности. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что вызванное процедурой аудиогенного киндлинга развитие судорожной активности в гиппокампе крыс КМ сопровождается изменениями в механизмах транспорта синаптических везикул к активной зоне.

Таким образом, в данной части работы мы показали, что предрасположенность к аудиогенным судорогам и развитие судорожной активности сопровождается изменениями в фосфорилировании белков различных компартментов нейрона: высокомолекулярных MAP2, ассоциированных с тубулиновыми микротрубочками цитоскелета в дендритах нейронов, синапсина 1 в пресинаптических терминалях и, предположительно,  $\alpha$ -ПДГ в митохондриях.

*Исследование активностей ПКА и САМКП во фракциях синаптических окончаний и тубулиновых микротрубочек, выделенных из неокортекса и гиппокампа нативных крыс линии КМ, КМ после выработки аудиогенного киндлинга и крыс Вистар*

Известно, что наибольший вклад в поддержание фосфосостояния белков вносят протеинкиназы и фосфатазы, ко-локализованные со своими субстратами. Для более корректной оценки вклада ПКА и САМКП в поддержание *in vivo* фосфосостояния белков-субстратов, различия в фосфорилировании которых были обнаружены нами между экспериментальными группами животных, была предпринята попытка исследовать активности вышеупомянутых протеинкиназ в компартментах нейрона, содержащих MAP2 и синапсина, то есть во фракциях тубулиновых микротрубочек и синаптических окончаний.

Мы не обнаружили достоверных различий максимальной активности ПКА в вышеупомянутых фракциях, выделенных из коры и гиппокампа, между экспериментальными группами животных, что позволило сделать несколько предположений

1. Различия в активности ПКА в гомогенате структур мозга между экспериментальными группами животных, определяются изменениями уровня ПКА, которые происходят во вне-пресинаптической и вне-микротубулярной области
2. Отсутствие корреляции между наблюдаемым нами высоким уровнем фосфорилирования MAP2 по специфическим сайтам для ПКА в мозге крыс группы КМ (сравнению с Вистар) и измеренной в компартменте микротрубочек активностью ПКА, а так же между повышением степени фосфорилирования MAP2 и синапсов I в гиппокампе крыс группы АКМ (по сравнению с КМ) и данными об активности ПКА, измеренной в компартменте микротрубочек и пресинаптических окончаний, соответственно, позволяет сделать предположение о низкой активности протеинфосфатаз в мозге КМ. По данным литературы, низкая активность фосфатаз характерна для нервной ткани с повышенной нейрональной возбудимостью.

Мы обнаружили достоверное увеличение (на  $79 \pm 18\%$ ,  $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) максимальной активности САМКII в "грубой" фракции микротрубочек, выделенной из гиппокампа крыс группы АКМ (по сравнению с КМ) (Рис. 7).

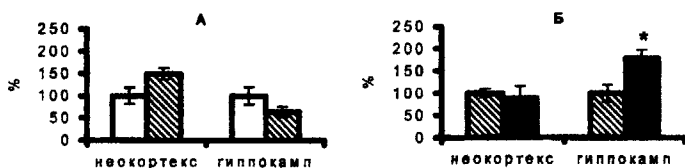


Рис. 7. Максимальная активность САМКII в грубой фракции тубулиновых микротрубочек мозга  
 А – сравнение Вистар и КМ Б – сравнение нативных КМ и КМ после аудиогенного киндлинга \* -  $p < 0.05$ .

Увеличение максимальной активности САМКII в гиппокампе КМ после аудиогенного киндлинга позволяет предположить, что развитие судорожной активности сопряжено с увеличением ассоциированной с микротрубочками цитоскелета САМКII.  $Ca^{2+}$  - независимая (функциональная) активность САМКII в синапсосамах, выделенных из ткани гиппокампа, у экспериментальных групп достоверно не различалась. Функциональная активность САМКII была увеличена на  $38 \pm 4\%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) в синапсосамах, выделенных из неокортекса КМ по сравнению с таковой в неокортексе Вистар (Рис 8) Аудиогенный киндлинг вызывал снижение  $Ca^{2+}$ -независимой активности САМКII на  $21 \pm 4\%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ) в синаптических окончаниях, выделенных из неокортекса КМ. Отсутствие различий в функциональной активности САМКII в синапсосамах, выделенных из ткани гиппокампа экспериментальных групп животных позволяет предположить, что синаптический пул САМКII, вероятно, не принимает участия в механизмах эпилептогенеза в этой структуре. Как уже обсуждалось ранее, высокая  $Ca^{2+}$  - независимая активность САМКII характерна для структур мозга,

предрасположенных к развитию судорог, а снижение активности может свидетельствовать о сложившемся повышенном уровне нейрональной возбудимости. Полученные нами данные о сниженной по сравнению с Вистар функциональной активности САМКП в гомогенате неокортекса КМ, ранее позволили нам сделать предположение о повышенной нейрональной возбудимости в этой структуре мозга КМ.

Результаты исследования активности этой протеинкиназы в синапсоммах позволяют внести коррективу в данную гипотезу. Повышенная функциональная активность САМКП в синаптических терминалях может свидетельствовать об «эпилептической готовности» синапсов, что, вероятно, является составляющей повышенной нейрональной возбудимости в неокортексе КМ.

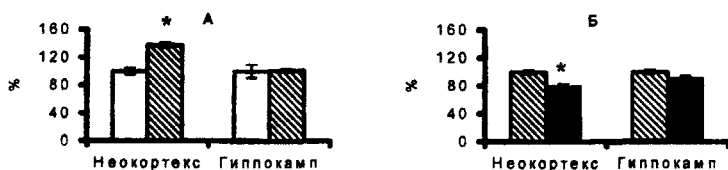


Рис 8  $Ca^{2+}$ - независимая активность САМКП во фракции синаптических окончаний неокортекса и гиппокампа А – сравнение Вистар  $\square$  и КМ  $\square/\square$  Б – сравнение нативных КМ и КМ после аудиогенного киндлинга  $\blacksquare$  \* -  $p < 0.05$ .

*Ультраструктурное исследование тубулиновых микротрубочек цитоскелета в апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа нативных крыс линии КМ, КМ после выработки аудиогенного киндлинга и крыс Вистар*

Обнаруженные нами аномалии фосфорилирования и увеличение содержания MAP2 в гиппокампе крыс линии КМ позволили нам предположить, что состояние динамического равновесия процессов сборки-разборки тубулиновых микротрубочек у крыс с аудиогенной эпилепсией отличается от такового у устойчивых к звуковому воздействию Вистар. Изменение параметров процесса сборки/разборки микротрубочек, несомненно, находит свое отражение в состоянии цитоскелета дендритов нейронов. Для оценки состояния микротрубочек нами было проведено ультраструктурное исследование тубулиновых микротрубочек цитоскелета в апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа у всех экспериментальных групп животных.

Морфометрический анализ показал, что плотность микротрубочек на продольных срезах дендритов пирамидных нейронов гиппокампа крыс Вистар и КМ не различалась. После киндлинга в гиппокампе крыс линии КМ данный параметр достоверно увеличивался в 1.1 раза и наблюдался сдвиг в сторону большего количества дендритов с высокой плотностью микротрубочек (Таб 3). Анализ поперечных срезов дендритов показал, что только в проксимальных участках дендритов гиппокампа крыс КМ после аудиогенного киндлинга

наблюдалось изменение плотности микротрубочек – она достоверно увеличивалась в 1.3-1.4 раза по сравнению с нативными КМ, в то время как различий между Вистар и КМ для разных участков дендритов не обнаружено (Таб. 2.). Микротрубочки располагаются в апикальных дендритах исследуемых групп животных в виде фрагментов длиной от 0.1 до 3.5 мкм. Выявлено, что средняя длина фрагментов микротрубочек в поле СА3 гиппокампа крыс линии КМ была достоверно ниже, чем у Вистар и еще более снижалась после аудиогенного киндлинга (Таб.3.).

Таб 2. Плотность микротрубочек на поперечных срезах апикальных дендритах поля СА3 гиппокампа

Диаметр дендритов, мкм	Вистар	КМ	КМ после аудиогенного киндлинга
D < 3	67.4 ± 4.4 (n = 23)	65.6 ± 2.0 (n = 46)	61.7 ± 1.8 (n = 42)
3 < D < 6	54.5 ± 1.9 (n = 96)	58.7 ± 1.1 (n = 134)	57.9 ± 1.0 (n = 196)
D > 6	33.3 ± 1.4 (n = 28)	35.4 ± 1.9 (n = 18)	47.3 ± 1.6* (n = 31)

Данные представлены как среднее число микротрубочек на 1 мкм<sup>2</sup> поперечного сечения дендрита ± стандартная ошибка среднего \* - достоверное отличие группы КМ от КМ после аудиогенного киндлинга (p < 0.05)

Таб 3. Параметры микротрубочек, измеренные на продольных срезах апикальных дендритов пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа.

Параметр измерения	Вистар	КМ	КМ после аудиогенного киндлинга
Плотность МТ	10,50 ± 0,10	10,40 ± 0,10	11,20 ± 0,10**
Длина фрагментов МТ, мкм	0,84 ± 0,04	0,73 ± 0,04*	0,49 ± 0,03**
Суммарная длина фрагментов МТ, мкм	27,76 ± 0,72	26,75 ± 0,92	27,23 ± 1,91

Плотность микротрубочек представлена как число микротрубочек, пересекающих 1 мкм отрезка, проведенного перпендикулярно оси дендрита \* - достоверное отличие группы Вистар от КМ (p < 0.05) \*\* - достоверное отличие группы КМ от КМ после аудиогенного киндлинга (p < 0.05) Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего

Известно, что *in vitro* и *in vivo* микротрубочки подвержены динамической нестабильности и распадаются на фрагменты, длина которых составляет 0.5-5 мкм. Обнаруженное нами снижение средней длины фрагментов МТ в гиппокампе КМ по сравнению с Вистар может свидетельствовать о том, что состояние динамического равновесия процессов сборки-разборки микротрубочек в мозге крыс с аудиогенной эпилепсией отличается от такового у устойчивых к звуковому воздействию Вистар. В гиппокампе КМ после аудиогенного киндлинга наблюдалось значительное снижение длины фрагментов микротрубочек, сопровождающееся увеличением плотности их фрагментов в проксимальных отделах апикальных дендритов пирамид поля СА3 гиппокампа по сравнению с нативными КМ, не подвергавшимся звуковому воздействию. Можно предположить, что наблюдаемые нами в гиппокампе КМ после аудиогенного киндлинга изменения плотности микротрубочек являются следствием их усиленного фрагментирования в неизменном объеме волокна.

Данные электронной микроскопии, совместно с результатами биохимических исследований, позволяют сделать нам следующие заключения. Во-первых, несмотря на то, что

суммарная длина микротрубочек в апикальных дендритах пирамид поля СА3 гиппокампа КМ и Вистар не различается, в дендритах КМ микротрубочки представлены в виде более коротких фрагментов, чем у Вистар; при этом содержание MAP2 и степень его фосфорилирования *in vivo* по акцепторным сайтам, специфически фосфорилируемых PKA и САМК2 в гиппокампе КМ выше, чем у Вистар. Не исключено, что выявленные нами изменения фосфоросостояния MAP2 являются генетической особенностью крыс линии КМ, способствующей снижению стабильности микротрубочек в гиппокампе крыс этой линии. Вероятно, именно такие модификации фосфорилирования MAP2 в гиппокампе КМ могут являться одной из составляющих патологической пластичности, определяющей предрасположенность к распространению эпилептиформной активности в гиппокампе крыс линии КМ при выработке аудиогенного киндлинга. Во-вторых, нами выявлено дальнейшее снижение средней длины фрагментов микротрубочек и увеличение их плотности в проксимальных участках дендритов пирамидных нейронов гиппокампа крыс КМ после аудиогенного киндлинга, что сопровождалось дальнейшим увеличением степени фосфорилирования MAP2 вышеуказанными протеинкиназами. Изложенные результаты дают, на наш взгляд, убедительные доказательства того, что модификация системы протеинкиназы-MAP2 в гиппокампе КМ могут влиять на кинетические параметры динамического равновесия тубулиновых полимеров и определять наблюдаемую нами частичную дестабилизацию микротрубочек. Не исключено, что подобные изменения являются одним из механизмов патологической перестройки структурных компонентов цитоскелета, приводящих к снижению порога развития судорожной активности.

**Заключение.** На основании полученных результатов мы предлагаем следующую гипотетическую схему роли цАМФ- и  $Ca^{2+}$ /кальмодулин- зависимых систем фосфорилирования и белка MAP2 в механизмах, определяющих гипервозбудимость нейронов мозга крыс линии КМ (Рис. 9.). Основными особенностями, обнаруженными нами в мозге нативных крыс КМ являются высокая активность PKA и САМКII, а так же увеличение уровня и степени фосфорилирования ассоциированного с микротрубочками белка 2 Не исключено, что увеличение активности PKA приводит к фосфорилированию и функциональной активации ингибитора протеинфосфатаз типа 1 (P1) Снижение активности протеинфосфатазы типа 1 (PP1), обладающей широкой субстратной специфичностью, может приводить к общему повышению уровня фосфорилирования белков в нейроне Показано, что PKA и САМКII фосфорилируют GluR1 и GluR6 субъединицы глутаматных рецепторов AMPA подтипа, что приводит к увеличению  $Na^+$  тока через AMPA рецепторно-канальный комплекс и сопровождается увеличением эффективности возбуждающей глутаматергической синаптической передачи (Barria et al , 1997; Mammen et al , 1997; Wang et al , 1993) Известно,



что фосфорилирование вышеупомянутыми киназами  $\beta 1$  субъединицы ГАМК-а рецептора вызывает снижение  $Cl^-$  тока через канал, связанный с ГАМК-а рецептором (McDonald and Moss, 1994; McDonald et al., 1998). Наблюдаемая нами частичная дестабилизация тубулиновых микротрубочек в дендритах КМ, вызванная увеличенным уровнем фосфорилирования MAP2, может приводить к нарушению кластеризации и закоривания ГАМК-а рецепторов в области активной зоны, что приводит к снижению эффективности тормозной ГАМК-ергической синаптической передачи (Whatley et al., 1994; Wang and Olsen, 2000). Необходимо отметить, что частичная дестабилизация тубулинового цитоскелета в дендритах может приводить к нарушению транспорта субъединиц каналов и рецепторов к местам их локализации, как это было продемонстрировано Kim и Но для субъединиц ГАМК-а и AMPA рецепторов (Kim and Lisman, 2001; Ho et al., 2001). По данным литературы, одним из механизмов снижения судорожного порога является создание деполяризационного сдвига мембранного потенциала, обусловленного  $Ca^{2+}$  токами. Предполагается, что L-тип высокопороговых  $Ca^{2+}$  каналов играет существенную роль в этом механизме (Semyanov and Godukhin, 2001). Показано, что дестабилизация микротрубочек вызывает изменение параметров инактивации этого канала (Beck et al., 1999). Увеличение активности PKA может приводить к усилению фосфорилирования  $\alpha 1$  субъединицы  $Ca^{2+}$  канала L-типа и увеличению входящих  $Ca^{2+}$  токов (Sculptoreanu et al., 1993). Известно, что увеличение фосфорилирования рианодиновых рецепторов по сайтам SAMKII и PKA вызывает их сенситизацию (Suko et al., 1993; Takasago et al., 1989). Повышенная чувствительность этих рецепторов на мембране эндоплазматического ретикулума, который является основным депо  $Ca^{2+}$  в клетке, может приводить к повышению концентрации свободного  $Ca^{2+}$  в цитоплазме нейрона. Таким образом, выявленные нами особенности функционирования протеинкиназ и фосфорилирования MAP2 в мозге КМ могут вызывать снижение эффективности торможения и увеличение деполяризационных токов, а также участвовать в создании деполяризующего  $Ca^{2+}$  плато, что является электрофизиологическим базисом создания гипервозбудимости нейрона.

Несомненно, взаимосвязь биохимических и электрофизиологических механизмов создания гипервозбудимости нейронов требует дальнейшего пристального изучения. Эти исследования дают ключ к пониманию механизмов реализации нарушений внутриклеточных регуляторных процессов, которые могут быть универсальными для всех типов эпилепсий.

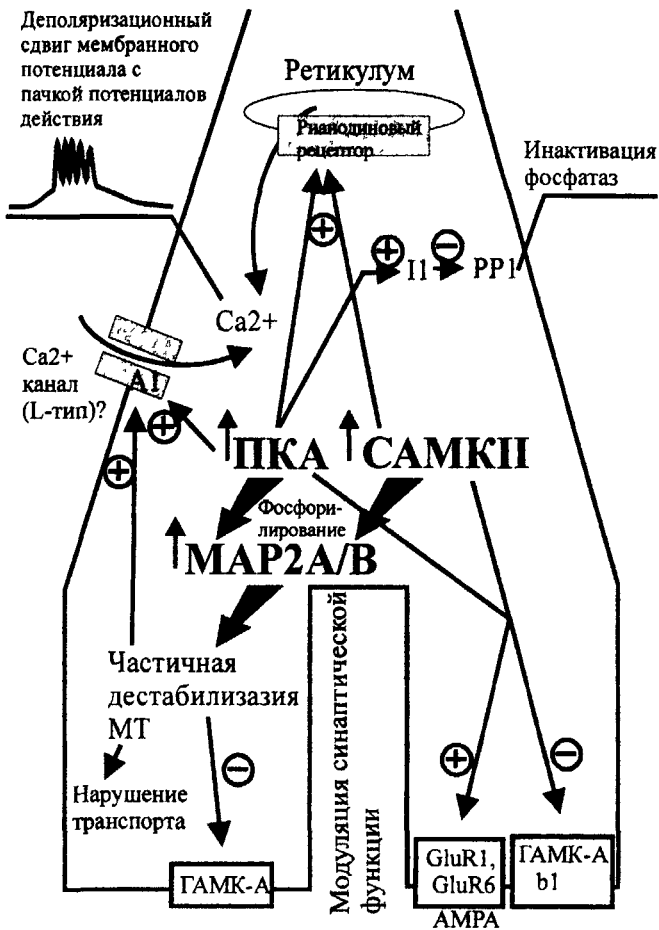


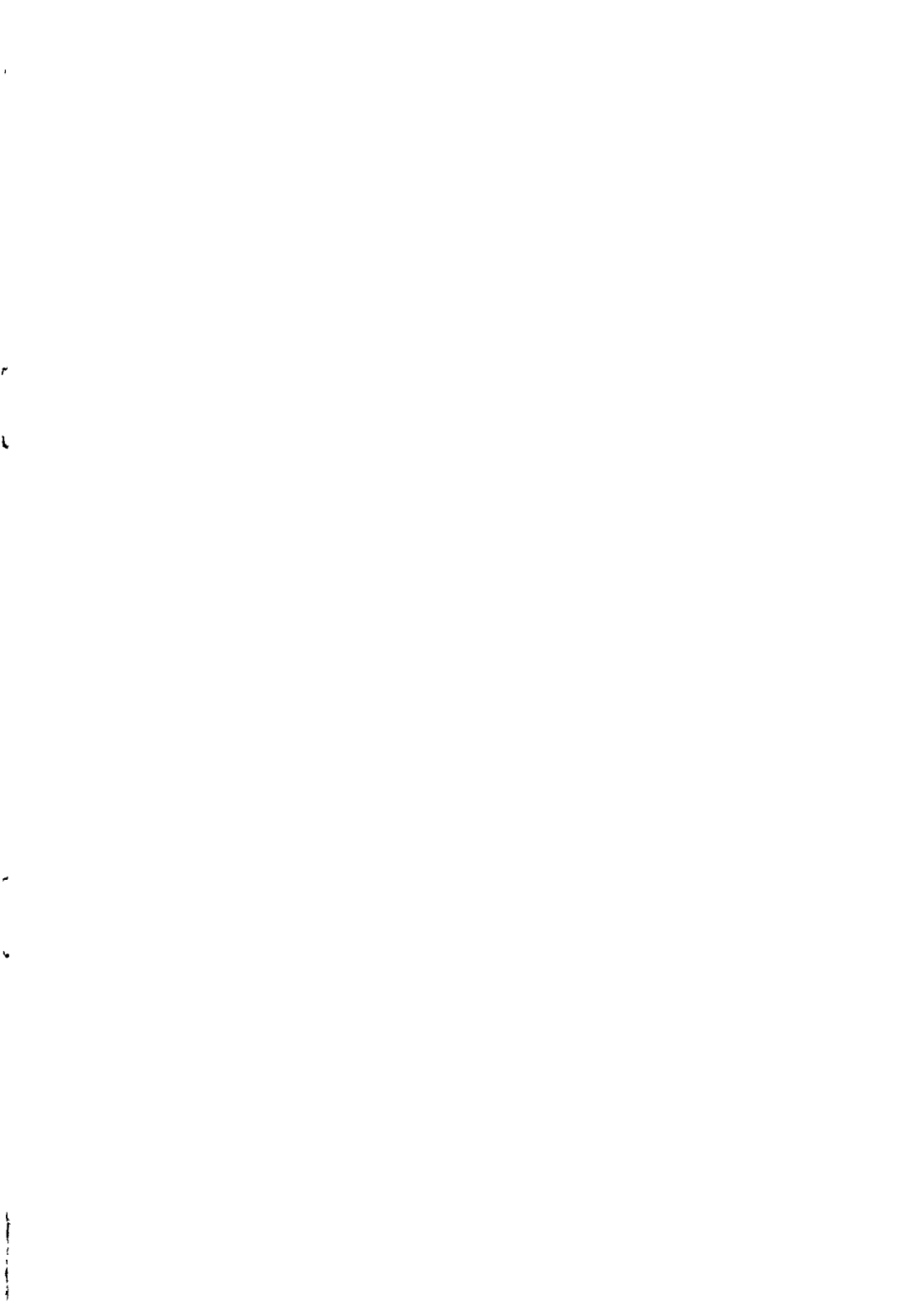
Рис 9 Предполагаемая схема участия цАМФ- и  $Ca^{2+}$ /кальмодулин- зависимых протеинкиназ, а также MAP2 в механизмы predisposedности к развитию аудиогенной судорожной активности нейронов мозга крыс линии КМ

## **Выводы.**

1. Результаты анализа, проведенного в ткани гиппокампа и неокортекса, указывают на существенные различия максимальной активности ПКА и функциональной активности САМКП между крысами линии КМ и крысами Вистар. Характер изменения активностей этих протеинкиназ после аудиогенного киндлинга позволяет сделать предположение о вовлеченности цАМФ- и  $Ca^{2+}$ /кальмодулин- зависимых систем фосфорилирования в механизмы создания и реализации наследственной предрасположенности к аудиогенным судорогам.
2. Продемонстрировано, что создание и реализация наследственной предрасположенности к аудиогенным судорогам сопровождается изменениями фосфорилирования белков 42 кДа (предположительно -  $\alpha$ - субъединица митохондриальной пируватдегидрогеназы), 80 и 86 кДа (предположительно - синапсина типа 1, локализованные в пресинаптических окончаниях) и 270 кДа (MAP2, расположенного на тубулиновых микротрубочках тела и дендритов нейронов).
3. Установлено, что во фракциях синаптических окончаний и тубулиновых микротрубочек выделенных из мозга крыс групп КМ и АКМ, в большинстве случаев, степень фосфорилирования белков по специфическим сайтам для ПКА и САМКП не коррелирует с обнаруженным нами уровнем активности этих протеинкиназ в данных субклеточных фракциях. Эти результаты могут свидетельствовать в пользу предположения о низком уровне активности протеинфосфатаз в мозге крыс линии КМ.
4. Анализ функционального состояния MAP2 в гиппокампе и неокортексе крыс групп КМ и АКМ позволяет предположить, что повышенное содержание и увеличение степени фосфорилирования высокомолекулярных изоформ MAP2 по специфическим сайтам САМКП и ПКА могут быть вовлечены в механизмы создания и реализации наследственной предрасположенности к аудиогенным судорогам.
5. Морфометрический анализ цитоскелета апикальных дендритов пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа крыс групп КМ и АКМ позволил выявить корреляцию между снижением длины фрагментов тубулиновых микротрубочек и увеличением степени фосфорилирования MAP2. Эти данные позволяют заключить, что функциональное состояние MAP2 ответственно за изменение кинетических параметров динамического равновесия тубулиновых микротрубочек в мозге крыс КМ.
6. Полученные результаты позволяют заключить, что наследственная предрасположенность к аудиогенным судорогам крыс КМ имеет не только стволовую природу.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Ечиков С.Н., Щипакина Т.Г., Архипов В.И. Сапонин в системе фосфорилирования *in vitro* Бюлл Эксперим. Биол. и Мед., 1996, т 122, № 10, стр. 453-456
- 2 Ечиков С.Н., Щипакина Т.Г., Чуланова Т.А., Годухин О.В. Эндогенное цАМФ- и Ca(2+)/кальмодулин- зависимое фосфорилирование белков гиппокампа и неокортекса крыс линии Крушинского-Молодкиной и Вистар Нейрохимия, 1998, т 15 (4), 389-394
- 3 Т А Чуланова, С Н.Ечиков, В.Б.Садовников, Т.Г.Щипакина. Функциональные особенности MAP2 у мышей имбредной линии DBA/2J как составляющая генетической предрасположенности к судорогам. Бюлл. Эксп. Биол Мед, 2001, т 132, № 11, с 522-526
- 4 Yechikhov S N, Morenkov E D, Chulanova T A., Godukhin O V and Shchepakina T G Involvement of cAMP - and Ca<sup>2+</sup> / calmodulin - dependent neuronal protein phosphorylation in mechanisms underlying genetic predisposition to audiogenic seizures in rats Epilepsy Research, 2001, v 46, p 15-25.
- 5 Ечиков С.Н., Чуланова Т.А., Моренков Э.Д., Щипакина Т.Г. Участие Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимого фосфорилирования MAP2 в механизмах наследственной эпилепсии Тезисы докладов конференции "Цитоскелет и клеточная регуляция", Пушкино, 2000, с. 20.
6. Чуланова Т.А., Ечиков С.Н., Моренков Э.Д., Годухин О.В., Щипакина Т.Г. Модификация фосфорилирования ассоциированного с микротрубочками белка 2 (MAP2) как один из механизмов патологической пластичности мозга при аудиогенной эпилепсии. Тезисы докладов VII Всероссийской школы молодых ученых "Актуальные проблемы нейробиологии", Казань, 2000, с. 100.
- 7 Ечиков С.Н., Щипакина Т.Г., Годухин О.В. Эндогенное цАМФ- и Ca(2+)/кальмодулин-зависимое фосфорилирование белков гиппокампа и неокортекса крыс линии Крушинского-Молодкиной и Вистар. Тезисы докладов 2 съезда биофизиков России, 1999, Москва, с 235
8. Ечиков С.Н., Щипакина Т.Г., Чуланова Т.А., Годухин О.В. Эндогенное сАМФ- и Ca (2+) / кальмодулин-зависимое фосфорилирование белков гиппокампа и неокортекса крыс линии Крушинского-Молодкиной и Вистар Тезисы III конференции молодых ученых, Пушкино, 1998, с.150.
- 9 Годухин О.В., Щипакина Т.Г., Архипов В.И., Калемев С.В., Ечиков С.Н., Семьянов А.В., Капустина Е.А. Фосфорилирование синаптических белков при моделировании эпилептиформной активности мозга. Научная конференция по функциональной нейробиологии, Пушкино, 1996, с. 6.
- 10 Godukhin O V , Yechikhov S N , Semyanov A.V. Epileptiform activity and EPSP-spike potentiation induced in rat hippocampal CA1 slices by repeated high-K<sup>+</sup> involvement of ionotropic glutamate receptors and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin - dependent protein kinase II Europ. J of Neuroscience, 2000, v 12, suppl. 11, p 210.



Издательство ООО "МАКС Пресс".  
Лицензия ИД № 00510 от 01.12.99 г.  
Подписано к печати 03.06.2002 г.  
Усл.печ.л. 1,25. Тираж 80 экз. Заказ 462  
Тел. 939-3890, 928-2227, 928-1042 Факс 939-3891.  
119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ

1

2

3

4

5

6

7

2002-A  
12431

■12431