

# Изменение экспрессии актин-связывающих белков в почке при дегидратации

И.И. Хегай

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Актин относится к основным структурным белкам эукариотов. В отличие от мышечного альфа-актина бета-актин экспрессируется во всех типах клеток. В немышечных клетках наблюдается постоянная реорганизация актинового цитоскелета. Фибриллярный актин, собранный из глобулярных мономеров, взаимодействует с актин-связывающими белками. Альфа-актинин формирует поперечные шивки в актиновой фибриллярной сети, а также концентрируется в области фокальных контактов. Тропомиозин относится к регуляторным компонентам бета-актина и за счет продольной укладки молекулы в бороздку актинового микрофиламента стереохимически экранирует сайты других актин-связывающих белков. Важнейшей функцией актинового цитоскелета рассматривается участие в транспортировке везикул с аквапоринами второго типа в главных клетках эпителия собирательных трубок мозгового вещества почки. Вазопрессин стимулирует выход тетрамеров аквапоринов из цитоплазматических депо в апикальную плазматическую мембрану. Участие и роль отдельных белков цитоскелета в процессе встраивания аквапоринов и организации дополнительных пор для воды слабо изучено в молекулярной физиологии почки. Исследована реактивность белков актинового цитоскелета на осморегулирующее действие продолжительной гидратации и дегидратации у крыс в зависимости от наличия или отсутствия в геноме активно экспрессирующегося гена вазопрессина. Нами установлено, что эффективность концентрирующей системы почки, регулируемой вазопрессином, зависит от экспрессии актин-связывающих белков в мозговом веществе почки. На фоне стабильного уровня внутриклеточного бета-актина наблюдается изменение экспрессии альфа-актинина и тропомиозина. Дегидратация организма сопровождается существенным снижением альфа-актинина. В отсутствие вазопрессина снижение альфа-актинина имеет меньшую амплитуду. Наличие в геноме нормального гена вазопрессина, независимо от транзитного уровня экспрессии и секреции гормона, является фактором более низкого тропомиозина в почке. Наиболее вероятным молекулярным механизмом изменения экспрессии генов альфа-актинина и тропомиозина может быть трансдукция V2-опосредованного гормонального сигнала вазопрессина на протеинкиназу A, фосфорилирование цАМФ-респонсивного транскрипционного фактора CREB и внутриядерное взаимодействие CREB с генными CRE-сайтами чувствительности к нему.

Ключевые слова: вазопрессин; почка; концентрирующая система; дегидратация; актиновый цитоскелет; вестерн-иммуноблоттинг; бета-актин; альфа-актинин; тропомиозин.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хегай И.И. Изменение экспрессии актин-связывающих белков в почке при дегидратации. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):261-264. DOI 10.18699/VJ18.357

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khgay I.I. Changing of expression actin-binding proteins in the kidney under dehydration. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):261-264. DOI 10.18699/VJ18.357 (in Russian)

УДК 547.96:(611.61+542.934.8)  
Поступила в редакцию 16.08.2017  
Принята к публикации 24.10.2017  
© АВТОР, 2018

✉ e-mail: khgay@bionet.nsc.ru

## Changing of expression actin-binding proteins in the kidney under dehydration

I.I. Khgay

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Actin is related to main structural proteins in eukaryotes. In opposite to muscle alpha-actin, beta-actin is expressing in all types of cells. The constant reorganization of actin cytoskeleton takes place in non-muscle cells. Fibrillar actin, organized by globular monomers, interacts with the actin-binding proteins. Alpha-actinin forms a transverse links in actin fibrillar network, as well as concentrates in the fields of focal contacts. Tropomyosin is related to regulatory components of beta-actin, and due to the expense of longitudinal localization of the molecule in the groove of actin microfilament, stereochemically shields the sites of other actin-binding proteins. The most important function of actin cytoskeleton is the participation in the transportation of vesicles with aquaporins of second type in principal cells of an epithelium of collecting ducts in renal medulla. Vasopressin is stimulating the release of aquaporin tetramers from cytoplasmic store to apical plasmatic membrane. The participation and role of separate cytoskeleton proteins in the process of aquaporin trafficking and forming additional pores for water stays a poorly studied place in the molecular physiology of kidney. We explored the osmoregulatory action of prolonged hydration and dehydration on the protein composition of actin cytoskeleton in rats depending on the presence or absence of the actively expressing vasopressin gene in the genome. We found that the efficiency of the renal concentrating system, controlled by vasopressin, depends on expression of actin-binding proteins in the renal medulla. On the background of a stable level of inner cellular beta-actin, a change of expression an alpha-actinin and tropomyosin is observed. Dehydration of the organism is accompanied by essential reducing of alpha-actinin. In the absence of vasopressin, reduction of alpha-actinin has a smaller amplitude. The presence of the normal vasopressin gene in the genome, regardless of transitory expression level and secretion of hormone, is a factor of lower tropomyosin in the kidney. The most probable molecular mechanism of changing the expression of the genes for alpha-actinin and tropomyosin is transduction of the V2-mediated vasopressin hormonal signal to protein kinase A, phosphorylation of the cAMP-responsible transcriptional factor CREB, and nuclear CREB interaction with gene CRE sites sensitive to it.

Key words: vasopressin; kidney; renal concentrating system; dehydration; actin cytoskeleton; western-immunoblotting; beta-actin; alpha-actinin; tropomyosin.

В соматических клетках эукариотов актин составляет наибольшую долю в общей массе фракционируемых белков. В отличие от альфа-изоформы, характерной для мышечной ткани, бета-актин экспрессируется во всех типах клеток и относится к ключевым структурным белкам цитоскелета. Внутриклеточные процессы обычно сопровождаются реорганизацией цитоплазматического актина путем транзитного перехода глобулярных мономеров в фибриллярную форму (Dominguez, Holmes, 2011). Актиновые фибриллы собраны в молекулярную сеть с различной плотностью и протяженностью тяжей, контактирующую со всеми органеллами и внешней мембраной. В цитоплазме немускульных клеток основной формой организации актиновых фибрилл являются микрофиламенты. Помимо актина, в состав микрофиламентов входит целый ряд актин-связывающих белков, участвующих в реализации разных функций цитоскелета. Прикрепляющаяся по касательной к фибриллярному актину молекула альфа-актинина представляет собой линейный гомодимер из противоположно ориентированных первичных пептидов размером 110 кДа (Ribeiro et al., 2014; Seret et al., 2015). Своими концами альфа-актинин формирует поперечные сшивки между актиновыми фибриллами, а также концентрируется в области фокальных контактов и местах прикрепления микрофиламентов к плазматической мембране (Sjoblom et al., 2008). Альфа-актинин относится к структурным компонентам фибриллярной сети.

Молекула тропомиозина имеет форму спирали из двух скрученных одинаково ориентированных полипептидов, каждый весом около 40 кДа. Тропомиозин локализуется в бороздке, образованной двойной спиралью актина, и перекрывает в продольном направлении около семи мономеров актина. Взаимодействие тропомиозина с актином относительно слабое и осуществляется путем физического переплетения обеих цепочек (Smillie, 1996). Исходя из характера взаимодействия и локализации, тропомиозин, в отличие от альфа-актинина, выполняет функцию белка-регулятора сократительных процессов в микрофибриллах, закрывая в состоянии покоя участки взаимодействия с другими актин-связывающими белками. Сети микрофиламентов, связанных с сократительными белками, формируют стресс-фибриллы, участвующие в клеточной локомоции и перемещении органелл. Важнейшая функция актинового цитоскелета в почке – участие в транспорте везикул с аквапоринами-2 из цитоплазматического депо на апикальную мембрану в главных клетках эпителия собирательных трубок мозгового вещества почки, активируемой и регулируемой вазопрессинном (Кнеpper, 1997).

Гормональное действие вазопрессина в мозговом веществе почки сопровождается активацией рецепторов V2 типа и трансдукцией внутриклеточного сигнала на эффекторные структуры, непосредственно осуществляющие повышение водной проницаемости в собирательных трубках. Ключевой элемент эффекторного звена реакции на вазопрессин представляют аквапорины второго типа (AQP2), встраивающиеся в апикальную мембрану главных клеток собирательных трубок и контактирующие с просветом почечного канальца. В состоянии физиологического покоя молекулы AQP2 находятся преимущественно в депонированном виде в составе мембран цитоплазма-

тических везикул. Вазопрессин стимулирует быстрый выход везикул наружу, встраивание готовых тетрамеров резервных аквапоринов в апикальную клеточную мембрану и формирование дополнительных пор для воды. Участие и роль отдельных белковых компонентов актинового цитоскелета в реализации этого процесса остаются в значительной мере неисследованными в молекулярной физиологии почки. Нами предпринято исследование экспрессии альфа-актинина, тропомиозина и бета-актина в мозговом веществе почки в условиях продолжительного экспериментального ограничения потребления воды.

## Материалы и методы

Эксперименты проведены на крысах линии WAG с нормальной регуляцией водно-электролитного обмена и мутантной линии Brattleboro с зафиксированным в геноме неэкспрессирующимся геном вазопрессина вследствие делеции со сдвигом рамки считывания (Schmale, Richter, 1984). В контрольной группе в течение трех суток осуществляли распаивание крыс 4 % раствором сахарозы и гидратацию организма, используя данный раствор как единственный источник энергоресурсов. Альтернативное состояние дегидратации вызывали водной депривацией крыс в течение трех суток (употребление в пищу только сухого корма). Уровень осмотического концентрирования оценивали по осмоляльности экскретируемой мочи. Мозговое вещество почки диссектировали из ткани сосочка, отделяя его от корковой зоны сверху и удаляя снизу кончик, контактирующий с почечной лоханкой. Осмоляльность (мОсм/кг H<sub>2</sub>O) измеряли криоскопическим методом, основанным на зависимости температуры кристаллизации воды от концентрации осмотически активных веществ (Гинецкий и др., 1962). Все процедуры выполняли в соответствии с принятыми «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном отношении к животным. Исследовано по шесть крыс из каждой линии. Бета-актин и актин-связывающие белки определяли методом иммуноблоттинга. Предварительно проводили электрофоретическое разделение в 10 % полиакриламидном геле по (Laemmli, 1970) белков, экстрагированных из гомогенатов мозгового вещества почки. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере следующего состава: 25 мМ трис, 192 мМ глицин, 20 % метанол, pH 8.3. Блокирование неспецифической сорбции и инкубацию с антителами делали в фосфатном буфере pH 7.2, содержащем 0.05 % твин 20, 0.1 % азид натрия, 5 % обезжиренное молоко. Для иммунодетекции использовали первичные кроличьи поликлональные антитела и, в качестве вторичных, антикроличьи антитела козы, конъюгированные с пероксидазой (Sigma-Aldrich). Количественная обработка белковых полос выполнена на базе пакета программ Band Leader 3.00. Оценка достоверности различий проведена с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты

Данные, характеризующие концентрирующую функцию почки, представлены в табл. 1. При распаивании 4 % раствором сахарозы происходит избыточное поступление

**Таблица 1.** Осмоляльность экскретируемой мочи (мОсм/кг) после трех суток распаивания 4 % раствором сахарозы (гидратация) или режима водной депривации (дегидратация)

Линия крыс	Гормон	Функциональное состояние	
		Гидратация	Дегидратация
Brattleboro	–	223 ± 18**	797 ± 27***
WAG	Вазопрессин	680 ± 73	2970 ± 136

Примечание. Достоверность различий между линиями: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

воды и гипергидратация внутренней среды. У мутантных крыс Brattleboro, не экспрессирующих ген вазопрессина, в этом состоянии выделяется гипотоничная моча. При ограничении потребления воды, наоборот, животное дегидратируется и наблюдается умеренное концентрирование мочи. У крыс WAG с нормальным геном вазопрессина распаивание сахарозой также сопровождается ослаблением индекса концентрирования, однако трое суток водной депривации действует на данный параметр в обратном направлении и резко увеличивает осмоляльность выводимой мочи до максимума, характерного для крыс. Осмоляльность мочи изменяется прямо пропорционально интенсивности процессов реабсорбции воды, которая, в свою очередь, прямо коррелирует с уровнем вазопрессина в крови. Ранее в аналогичном эксперименте нами установлено, что использованные альтернативные функциональные нагрузки противоположным образом влияют на уровень секреции вазопрессина в кровяное русло.

Реабсорбция воды, регулируемая вазопрессином, локализуется преимущественно в мозговом веществе почки. Основной морфологический элемент мозгового вещества – собирательные трубки. Трансэпителиальный ток воды в собирательных трубках усиливается за счет перераспределения молекул AQP2 из цитоплазмы на апикальную мембрану. Работу по транспортировке аквапоринов выполняют белки актинового цитоскелета. Паттерны экспрессии альфа-актина, тропомиозина и бета-актина продемонстрированы на рисунке. Общий уровень внутриклеточного бета-актина остается стабильным и примерно одинаковым во всех группах исследованных крыс. На этом фоне экспрессия альфа-актина характеризуется большей вариабельностью, в обеих линиях после водной депривации у дегидратированных крыс наблюдается снижение количества этого актин-связывающего белка. Изменение экспрессии в большей степени выражено у крыс линии WAG. Экспрессия тропомиозина имеет более динамичный и отчетливо разнонаправленный характер



Иммунохимическая детекция актина и актин-связывающих белков в мозговом веществе почки у крыс линий Brattleboro и WAG после различных осморегулирующих воздействий.

различий между линиями. У крыс Brattleboro в состоянии дегидратации уровень тропомиозина выше, чем у гипергидратированных крыс. У крыс WAG, наоборот, дегидратация сопровождается снижением тропомиозина относительно уровня белка, зафиксированного у гидратированных животных.

Количественные данные по альфа-актину и тропомиозину, полученные в перерасчете относительно бета-актина, представлены в табл. 2. Наиболее достоверные различия между линиями наблюдаются по количеству тропомиозина как у гидратированных, так и у дегидратированных животных. При этом собственно реакция на дегидратацию и гидратацию уступает по амплитуде межлинейным различиям по тропомиозину.

## Обсуждение

В тканях, экспрессирующих рецепторы вазопрессина, реализуются два типа различающихся по скорости молекулярных процессов. Физиологическое изменение проницаемости для воды, развивающееся в мозговом веществе почки в течение нескольких минут, происходит вследствие мобилизации предварительно синтезирован-

**Таблица 2.** Относительное содержание альфа-актина и тропомиозина в мозговом веществе почки у крыс линий Brattleboro и WAG при различном состоянии осморегулирующей системы

Белок	Гидратация		Дегидратация	
	Brattleboro	WAG	Brattleboro	WAG
Альфа-актинин	1.19 ± 0.04 <sup>#</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>###</sup>	1.03 ± 0.03	0.39 ± 0.07 <sup>**</sup>
Тропомиозин	1.98 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.82 ± 0.04 <sup>***#</sup>	2.31 ± 0.11	0.66 ± 0.03 <sup>***</sup>

Примечание. Данные получены в перерасчете на бета-актин. Достоверность различий между линиями: \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Достоверность отличий гидратированного и дегидратированного состояния: <sup>#</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>###</sup>  $p < 0.001$ .



ных депонированных аквапоринов и составляет быстрый компонент гормонального эффекта вазопрессина. При продолжительном действии вазопрессина изменяется уровень экспрессии генов для наработки дополнительных тканеспецифических белков, задействованных в поддержании оптимального функционального состояния почки (DiGiovanni et al., 1994). Сравнительный анализ белковых спектров, формирующихся при различной интенсивности экспрессии гена вазопрессина – один из подходов для выявления внутриклеточных механизмов реагирования на вазопрессин. Нами показано, что у крыс WAG, находящихся в альтернативных состояниях гипергидратации и дегидратации, на порядок изменяется уровень секреции вазопрессина из нейрогипофиза в кровь. Вследствие мутации в гене вазопрессина, независимо от использования осморегулирующих воздействий, у крыс Brattleboro вазопрессин не синтезируется и тем более не определяется в крови (Khagai, 2003). Умеренное осмотическое концентрирование, наблюдаемое у крыс Brattleboro в состоянии дегидратации, по-видимому, имеет в своей основе гормональные эффекты окситоцина и минералокортикоидов. У крыс WAG вследствие контроля и регуляции вазопрессином эффективность концентрирующей системы почки в несколько раз выше. Как видно на рисунке и в табл. 2, амплитуда изменений по уровню альфа-актина и тропомиозина у крыс Brattleboro также ниже, чем у WAG. У генетически нормальных крыс WAG сильнее выражена реакция альфа-актина на дегидратацию и существенно снижен уровень тропомиозина. Более низкий тропомиозин наблюдается как у дегидратированных, так и у гидратированных крыс WAG. Эти различия по актин-связывающим белкам устойчиво коррелируют с функциональным состоянием нейросекреторной системы вазопрессина. Одним из наиболее вероятных механизмов изменения экспрессии альфа-актина и тропомиозина под действием вазопрессина является трансляция гормонального сигнала в клеточное ядро через V2-цАМФ-зависимый путь и фосфорилирование протеинкиназой А цАМФ-респонсивного транскрипционного фактора CREB (Mayr, Montminy, 2001). Гены с сайтами чувствительности к нему (CRE-элементы) в регуляторных областях попадают под вазопрессиновый контроль экспрессии. В геноме высших позвоночных зафиксированы сотни тысяч CRE-элементов, в среднем по несколько сайтов на отдельный ген. Однако большинство из них обычно находится в метилированном по цитозину состоянии (Altarejos, Montminy, 2011). Молекулярный анализ регуляторной зоны альфа-актина и тропомиозина является самостоятельной задачей и требует дальнейшего развития экспериментальной базы и методического обоснования.

Таким образом, эффективность концентрирующей системы почки, регулируемой вазопрессином, зависит от состояния актинового цитоскелета. На фоне стабильного уровня внутриклеточного бета-актина наблюдается изменение экспрессии актин-связывающих белков. Дегидрата-

ция организма сопровождается существенным снижением альфа-актина. В отсутствие вазопрессина снижение альфа-актина имеет меньшую амплитуду. Наличие в геноме нормального гена вазопрессина, независимо от транзитного уровня экспрессии и секреции гормона, относится к факторам более низкого тропомиозина в мозговом веществе почки.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН (№ 0324-2018-0016).

### Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Гинецинский А.Г., Васильева В.Ф., Закс М.Г., Наточин Ю.В., Соколова М.М. Методы исследования осморегулирующей системы рыб. Руководство по методике исследований физиологии рыб. М.: АН СССР, 1962;204-216.
- Altarejos J., Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011;12(3):141-151. DOI 10.1038/nrm3072.
- DiGiovanni S.R., Nielsen S., Christensen E.L., Knepper M.A. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91(19):8984-8988.
- Dominguez R., Holmes K.C. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011;40:169-186. DOI 10.1146/annurev-biophys-042910-153559.
- Khagai I.I. Phenotypic expression of the mutant gene *diabetes insipidus* in rats and criteria of genotyping by phenotype. *Russ. J. Genet.* 2003;39(1):57-60.
- Knepper M.A. Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am. J. Physiol.* 1997;272(1):F3-F12.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
- Mayr B., Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2(8):599-609. DOI 10.1038/35085068.
- Ribeiro Ede.A., Pinotsis N., Ghisleni A., Salmazo A., Konarev P.V., Kostan J., Sjoblom B., Schreiner C., Polyansky A.A., Gkougkoulia E.A., Holt M.P., Aachmann F.L., Zagrovic B., Bordignon E., Pirker K.F., Svergun D.I., Gautel M., Djinojic-Carugo K. The structure and regulation of human muscle  $\alpha$ -actinin. *Cell.* 2014;159(6):1447-1460. DOI 10.1016/j.cell.2014.10.056.
- Schmale H., Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene is the cause of diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature.* 1984;308(5961):705-709.
- Seret G., Cañas F., Pougnet-Di Costanzo L., Hanrotel-Saliou C., Jousse-Joulin S., Le Meur Y., Saraux A., Valeri A., Putterman C., Youinou P., Rojas-Villarraga A., Anaya J.M., Renaudineau Y. Anti-alpha-actinin antibodies are part of the anti-cell membrane antibody spectrum that characterize patients with lupus nephritis. *J. Autoimmun.* 2015;61(1):54-61. DOI 10.1016/j.jaut.2015.05.009.
- Sjoblom B., Salmazo A., Djinojic-Carugo K.  $\alpha$ -Actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(17):2688-2701. DOI 10.1007/s00018-008-8080-8.
- Smillie L.B. Tropomyosin. Ed. M. Barany. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction.* San Diego: Acad. Press, 1996;63-90.