



Экспрессия пальмитилтрансфераз в структурах мозга мышей с генетически детерминированной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению

Е.М. Кондаурова^{1,2}, Т.В. Ильчибаева¹, А.С. Цыбко¹, Е.Г. Понимаскин³, В.С. Науменко¹✉

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт клеточной нейрофизиологии, Высшая медицинская школа Ганновера, Германия, Ганновер

Большинство сопряженных с G-белками мембранных рецепторов подвергается различным посттрансляционным модификациям. Среди таких модификаций – осуществляемое специализированными ферментами пальмитилтрансферазами S-пальмитилирование. Оно представляет собой ковалентное присоединение длинной цепи жирной кислоты пальмитата к цистеиновым аминокислотным остаткам. Пальмитилирование может существенно влиять на функцию рецепторов, сопряженных с G-белками, модифицируя их стабильность, транспортировку и функциональную активность. Очевидно, что нарушения в работе этого класса рецепторов могут приводить к возникновению самых разнообразных психопатологий, включая депрессию. Тем не менее в настоящее время связи между пальмитилтрансферазами и депрессивно-подобным поведением не установлено. Нет данных и о регион-специфических особенностях экспрессии пальмитилтрансфераз в структурах мозга. В настоящей работе исследована экспрессия пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21 в структурах мозга мышей линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению по сравнению с мышами родительской линии CBA, у которых не наблюдается депрессивно-подобного поведения. Продемонстрированы регион-специфические особенности при иммунодетекции белков пальмитилтрансфераз. При детекции белка ZDHHC5 в среднем мозге выявлено две полосы массой 75 и 55 кДа. При иммунодетекции белка ZDHHC21 обнаружено две полосы: первая массой 27 кДа во фронтальной коре и среднем мозге, тогда как в гиппокампе антитела визуализировали полосу белка массой 32 кДа. При иммунодетекции белка ZDHHC9 выявлено по две полосы белка в среднем мозге и гиппокампе: первая полоса массой 46 кДа, вторая – 41 кДа. Однако мыши линии ASC практически не отличались от мышей CBA по экспрессии исследуемых пальмитилтрансфераз. Таким образом, нами впервые показаны регион-специфические особенности экспрессии исследованных пальмитилтрансфераз в структурах мозга. В то же время установлено, что генетически детерминированное депрессивно-подобное поведение у мышей линии ASC не связано с изменениями экспрессии пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21.

Ключевые слова: ZDHHC5; ZDHHC9 и ZDHHC21 пальмитилтрансферазы; гены *Zdhhc5*, *Zdhhc9*, *Zdhhc21*; экспрессия генов; уровень белка; мыши ASC; депрессивно-подобное поведение.

Expression of palmitoyl transferases in brain structures of mice genetically predisposed to depressive-like behavior

E.M. Kondaurova^{1,2}, T.V. Ilchibaeva¹, A.S. Tsybko¹, E.G. Ponimaskin³, V.S. Naumenko¹✉

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Cellular Neurophysiology, Hannover Medical High School, Hannover, Germany

Most G-coupled receptors undergo posttranslational modifications. Among these modifications is S-palmitoylation, carried out by specialized enzymes palmitoyl transferases. Palmitoylation is the covalent attachment of a long-chain fatty acid, palmitate, to cysteine residues. It can influence receptor stability, transportation, and function. Obviously, malfunction of G-protein coupled receptors can cause various psychic disorders, including depression. However, no association between palmitoyl transferases and depressive-like behavior has been found hitherto. There is no information on brain structure specific features of palmitoyl transferase expression either. Here we investigate the expression of ZDHHC5, ZDHHC9, and ZDHHC21 palmitoyl transferases in brain structures of ASC mice with genetic predisposition to depressive-like behavior in comparison with “nondepressive” CBA mice. Several brain region-specific features were detected in the immunodetection of palmitoyl transferase proteins. Western blot of the ZDHHC5 protein in the midbrain revealed two bands at 75 kDa and 55 kDa. Immunodetection of ZDHHC21 palmitoyl transferase revealed two bands. One of them was visualized at 27 kDa in the frontal cortex and midbrain. The other, at 32 kDa in the hippocampus. Probing for ZDHHC9 also showed two bands in each of the midbrain and hippocampus, at 46 and 41 kDa. However, the expression of all investigated palmitoyl transferases in ASC mice with depressive-like behavior was almost identical to those in CBA mice. Thus, it was the first detection of brain region-specific features of the expression of investigated palmitoyl transferases. However, the study demonstrates that

the genetic predisposition to depression-like behavior in ASC mice is not associated with changes in ZDHHC5, ZDHHC9, or ZDHHC21 palmitoyl transferase expression.

Key words: ZDHHC5; ZDHHC9 and ZDHHC21 palmitoyl transferases; *Zdhhc5*, *Zdhhc9*, *Zdhhc21* genes; gene expression; protein level; ASC mice; depressive-like behavior.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кондаурова Е.М., Ильчибаева Т.В., Цыбко А.С., Понимаскин Е.Г., Науменко В.С. Экспрессия пальмитилтрансфераз в структурах мозга мышей с генетически детерминированной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(5):593-599. DOI 10.18699/VJ18.399

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kondaurova E.M., Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Ponomaskin E.G., Naumenko V.S. Expression of palmitoyl transferases in brain structures of mice genetically predisposed to depressive-like behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(5):593-599. DOI 10.18699/VJ18.399 (in Russian)

Различные посттрансляционные модификации могут существенно влиять на функцию рецепторов, сопряженных с G-белком. Например, липидные модификации служат механизмом, посредством которого нейроны обеспечивают распределение белков. Эти модификации увеличивают гидрофобность белков, облегчая их встройку во внутриклеточную или плазматическую мембрану. Миристилирование, пренилирование и пальмитилирование – наиболее широко распространенные липидные модификации. Пальмитилирование часто наблюдается у нейрональных белков. Это уникальная, зачастую обратимая, посттрансляционная модификация трансмембранных белков потенциально регулирует их процессинг и локализацию на определенных мембранных микродоменах, например липидных рафтах, или изменяет конформацию белка, что оказывает влияние на его функциональную активность и возможность взаимодействовать с другими белками (Fukata Y., Fukata M., 2010).

Участие пальмитилирования в транспортировке и/или локализации рецептора на мембранных субдоменах показано в эксперименте, продемонстрировавшем, что серотониновые 5-HT_{1A} рецепторы дикого типа остаются на липидных рафтах, тогда как количество мутантного непальмитилируемого 5-HT_{1A} рецептора в этих микродоменах было значительно снижено (Renner et al., 2007). Липидные рафты, как известно, часто выполняют роль платформы, обеспечивающей совместную локализацию GPCRs (рецепторов, сопряженных с G-белком (G-protein-coupled receptors)) с определенными G-белками. Эта особенность позволяет предположить, что зависимость от пальмитилирования локализация 5-HT_{1A} рецепторов на липидных рафтах важна для опосредованной рецептором передачи сигнала (Gorinski, Ponomaskin, 2013). Для того же серотонинового 5-HT_{1A} рецептора показано, что замена необходимых для пальмитилирования рецептора аминокислотных остатков цистеина Cys417 и Cys420 на серин приводит к нарушению взаимодействия рецептора и его G-белка (с Gαi-субъединицей). Непальмитилируемый мутантный 5-HT_{1A} рецептор демонстрировал также неспособность ингибировать продукцию цАМФ (циклический аденозинмонофосфат). Полученные результаты говорят о том, что пальмитилирование 5-HT_{1A} рецептора важно для сопряжения рецептора с G-белком и трансдукции сигнала. Более того, нарушение пальмитилирования 5-HT_{1A} рецептора приводило к нарушению рецептор-зависимой активации ERK киназ, что указывает на важность пальми-

тирования 5-HT_{1A} рецептора для трансдукции сигнала по Gβγ-опосредованному пути (Paroucheva et al., 2004).

Таким образом, пальмитилирование может существенно влиять на функциональную активность рецепторов, сопряженных с G-белками, а нарушение пальмитилирования этих рецепторов в свою очередь может привести к возникновению самого широкого спектра поведенческих и психических нарушений. Действительно, показано вовлечение пальмитилтрансфераз, ответственных за пальмитилирование различных белков, в механизмы таких психопатологий как, например, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, а также в механизмы шизофрении и умственных отклонений (Cho, Park, 2016). Так, подавление пальмитилирования белка-предшественника амилоида и белка хантингтина приводит к нарушению их процессинга (Cho, Park, 2016). Тем не менее сведения о роли пальмитилирования определенных нейрональных рецепторов в регуляции различных форм поведения крайне скудны. Однако имеются данные о вовлечении ZDHHC9 в механизмы умственной отсталости (Fukata Y., Fukata M., 2010), а ZDHHC5 – в механизмы условно-рефлекторного замирания и гиппокамп-зависимого обучения (Li et al., 2010). Показано также, что ZDHHC21 принимает участие в регуляции воспалительного ответа (Beard et al., 2016).

Многие современные гипотезы о патогенезе депрессии указывают на ключевую роль серотониновой системы мозга (Maes, Meltzer, 1995; Harro, Orelund, 1996; Duman et al., 1997). Серотониновые нейроны, локализованные в ядрах шва (raphe nuclei) среднего мозга, дают обширные проекции во многие области мозга (Jacobs, Azmitia, 1992), которые вовлечены в развитие депрессии, в том числе в кору и гиппокамп (Neumeister et al., 2005; Ressler, Mayberg, 2007).

В связи с вышесказанным целью нашей работы было изучение экспрессии пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21 как на уровне мРНК, так и на уровне белка в структурах мозга (средний мозг, кора и гиппокамп) мышей с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению (мышь линии ASC), по сравнению с мышами родительской линии CBA, не проявляющими депрессивно-подобного поведения.

Материалы и методы

Животные. Опыты проводили на взрослых самцах мышей линий CBA и ASC. Мыши линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) были созданы в лаборатории нейро-

геномики поведения Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН) в результате длительной селекции гибридов каталептической линии СВА и некаталептической линии АКР на повышенную предрасположенность к каталепсии (Базовкина и др., 2005; Kondaurova et al., 2006). Полученные мыши демонстрировали ряд депрессивно-подобных характеристик, включая повышенную неподвижность в тестах принудительного плавания и подвешивания за хвост (Базовкина и др., 2005), нарушения иммунной системы (Альперина и др., 2007). При этом введение экзогенного BDNF приводило у мышей ASC к нормализации поведенческих показателей и активации серотониновой системы мозга (Naumenko et al., 2012). Мышей содержали в пластиковых клетках размером 40 × 30 × 15 см в стандартных условиях (температура 20–22 °С, относительная влажность 50–60 %, регулируемый световой режим (12 ч света и 12 ч темноты)) со свободным доступом к стандартной пище и воде. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996). Количество животных в каждой группе: $n \geq 7$.

Экспрессию генов определяли с помощью количественного метода ОТ-ПЦР (ОТ – обратная транскрипция; ПЦР – полимеразная цепная реакция), разработанного в лаборатории нейрогеномики поведения ИЦиГ СО РАН (Kulikov et al., 2005; Науменко, Куликов, 2006; Naumenko et al., 2008). Использовали два типа стандартов: внутренний и внешний. Внутренний стандарт (мРНК *Gapdh* – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) применяли для контроля обратной транскрипции в качестве основы для расчета уровня мРНК исследуемых генов. В предварительных опытах не были выявлены различия в уровне мРНК *Gapdh* в исследуемых структурах мозга. Внешним стандартом служила геномная ДНК мыши известной концентрации, что позволило контролировать ПЦР и определять число копий мРНК исследуемых генов и *Gapdh* в образцах.

Выделение общей РНК осуществляли с помощью TRIzol Reagent (“Lifetechnologies”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Общую РНК обрабатывали ДНКазой без РНКазной активности (RQ1RNase-Free DNase cat. # M6101, Promega Corporation, США) в соответствии с протоколами производителей. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее (Науменко, Куликов, 2006; Naumenko et al., 2008). РНК разводили водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при –70 °С.

Реакция обратной транскрипции. Общую РНК (8 мкл, или 1 мкг) смешивали со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера – 5 мкМ) и 2.25 мкМ стерильного KCl в объеме 16 мкл, денатурировали при 94 °С в течение 5 мин на амплификаторе «БИС» М-120 (БИС-Н, Россия), после чего проводили отжиг при 41 °С в течение 15 мин, затем добавляли 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу М-MLV (200 ед.), Трис-НСl (рН = 8.3, 0.225 мкМ), смесь dNTP (0.015 мкМ каждого), DTT (0.225 мкМ) и MnCl₂ (0.03 мкМ). Полученную смесь (конечный объем – 31 мкл)

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж.}$ °С	Длина продукта ПЦР, п. н.
<i>Gapdh</i>	F5'-tttgaagacgccagggaaatg-3' R5'-tgtccagaatcaaccaccaag-3'	63	242
<i>Zdhhc21</i>	F5'-aacagatggatgggtgggacac-3' R5'-gtttcatcccaatcactgccttc-3'	63	289
<i>Zdhhc9</i>	F5'-gagtagtcccaagcccatc-3' R5'-aggatgaggaagagggtcag-3'	61	177
<i>Zdhhc5</i>	F5'-ccacacctgcacctacac-3' R5'-agggatcaaggaagggaaggtc-3'	65	217

инкубировали при 41 °С в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре –20 °С.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл. 1), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, при помощи инструментов Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyser>) и Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) и синтезированы в компании «Биосан» (Новосибирск). 1 мкл кДНК смешивали с 19 мкл Мастер Микс (R-412, «Синтол», Россия), содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green I. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 480 System (Roche, Швейцария) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 94 °С, 1 цикл; 10 с при 94 °С, 30 с при соответствующей температуре отжига (см. табл. 1), 30 с при 72 °С 40 циклов. Серию разведений геномной ДНК с концентрацией 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировали одновременно в отдельных пробирках и использовали как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах $Ct - \log P$ количества стандарта ДНК была построена автоматически программным обеспечением LightCycler 480 System. Для контроля специфичности амплификации использовали анализ кривых плавления ПЦР-продукта для каждой реакции с каждой парой праймеров. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемых генов к 100 копиям внутреннего стандарта – кДНК *Gapdh*.

Определение количества белка. Уровни белков пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21 определяли при помощи Вестерн-блот анализа. Для получения препаратов плазматических мембран белка соответствующие структуры мозга (кора, гиппокамп, средний мозг) гомогенизировали в трис-хлоридном буфере, содержащем 300 мМ сахарозы, 10 мМ Трис HCl, рН 7.2, 1 мМ EDTA, 5 мМ β-меркаптоэтанол и ингибиторы протеаз (ThermoFisher Scientific Inc., cat. No. 88265). Ингибиторы протеаз использовали в рекомендованных производителем концентрациях. Гомогенат центрифугировали на 500 g 15 мин при 4 °С, отбирали супернатант и центрифугировали на 20000 g при 4 °С в течение одного часа. Отбирали супернатант, оставшийся в пробирке осадок ресуспен-

Таблица 2. Список использованных антител и условия иммунодетекции

Антитела, производитель	Разведение	Время инкубации, условия
Первичные антитела		
курицы к белку ZDHHC5, ProSci, cat. No. 54-211	1:400	2 ч, при комнатной температуре
кролика к белку ZDHHC9, Sigma-Aldrich, cat. No. SAB4502104 sigma	1:200	»
кролика к белку ZDHHC21, ThermoFisher Scientific Inc. cat. No. PA5-25096	1:200	На ночь при 4 °C
к GAPDH, конъюгированные с пероксидазой хрена, Santa Cruz, США, cat. No. sc 25778	1:500	2 ч, при комнатной температуре
Вторичные антитела		
кролика, направленные против иммуноглобулинов курицы, конъюгированные с пероксидазой хрена, ThermoFisher Scientific, Inc. cat. No. 31401	1:15000	1 ч, при комнатной температуре
козы, направленные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, Santa Cruz, США, cat. No. sc 2004	1:10000	»

зировали в гомогенизирующем буфере (Каткова и др., 2009). Количество общего белка оценивали, используя коммерческий набор Pierce BCA Protein Assay kit (ThermoFisher Scientific Inc., США). Образцы приводили к равной концентрации (1 мг/мл) с помощью Леммли буфера (Трис 62 мМ, сахароза 10 %, SDS 2 %, β -меркаптоэтанол 5 %) и денатурировали в течение 15 мин на 42 °C.

Белок разделяли с помощью SDS-PAGE гель-электрофореза, используя 10 %-й разделяющий гель для пальмитилтрансфераз ZDHHC5 и ZDHHC9, 12 %-й – для пальмитилтрансферазы ZDHHC21, и переносили с помощью полусухого электроблоттинга на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) в течение ночи при силе тока 50 мА. Для переноса использовали буфер, содержащий 190 мМ глицина, 25 мМ Трис pH 8.3 и 20 % метанола. В качестве маркера использовали Broad Range Markers (Santa Cruz, США, sc-2361). Для иммунодетекции белка мембрану блокировали с 5 %-м молоком, разведенным в TBS-T буфере (Tris Buffered Saline with Tween 20, Santa Cruz, США), в течение одного часа при комнатной температуре и инкубировали с первичными антителами для ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21 (табл. 2). После детекции белков (как описано ниже) все мембраны обрабатывали с помощью Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (ThermoFisher Scientific Inc., cat. No. 46430) для дальнейшей реиммунодетекции внутреннего контроля GAPDH (см. табл. 2). Для детекции всех белков мембрану отмывали 5×5 мин буфером TBS-T, добавляли вторичные поликлональные антитела (см. табл. 2). Повторяли отмывку мембраны.

Все связанные антитела визуализировали с помощью Super Signal TM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя и гельдокументирующей системы Fusion FX7-820 System (Vilber Lourmat, Франция). Полученное изображение денситометрировали, и количественно оценивали содержание белка при помощи программы Scion Image. Экспрессию белка выражали в относительных единицах и нормировали на экспрессию GAPDH, которая конститутивна для клеток мозга.

Анализ выявленных вариантов белков осуществляли при помощи сравнения с уже известными изоформами, опубликованными в базе данных <http://www.uniprot.org> (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8VDZ4>).

Статистика. Результаты представляли как $m \pm SEM$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего) и сравнивали их с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим множественным сравнением по Фишеру. Критерий значимости результатов – $p < 0.05$.

Результаты

Исследование уровня мРНК. Однофакторный дисперсионный анализ не выявил различий в экспрессии генов пальмитилтрансфераз *Zdhhc5* ($F_{1,17} = 0.50, p > 0.5$) и *Zdhhc9* ($F_{1,17} = 1.6, p > 0.2$) в гиппокампе мышей исследованных линий (рис. 1, а, б). Однако экспрессия гена *Zdhhc21* в гиппокампе у мышей линии ASC была статистически достоверно ниже по сравнению с экспрессией этого гена у мышей линии СВА ($F_{1,17} = 5.40, p < 0.05$) (рис. 1, в). Во фронтальной коре и среднем мозге мышей исследованных линий различий по экспрессии генов *Zdhhc5*, *Zdhhc9* и *Zdhhc21* не обнаружено (см. рис. 1).

Исследование уровня белка. При оценке уровня белка ZDHHC5 в гиппокампе различий между изучаемыми линиями животных не установлено ($F_{1,14} = 0.14, p = 0.72$) (рис. 2). Интересно отметить, что в среднем мозге при иммунодетекции этой пальмитилтрансферазы было обнаружено две полосы массой 75 и 55 кДа (см. рис. 2, в). Тем не менее достоверной разницы между линиями ASC и СВА не выявлено как для полосы массой 75 кДа ($F_{1,14} = 0.03, p = 0.86$) (см. рис. 2, а), так и для второй полосы массой 55 кДа ($F_{1,13} = 1.36, p = 0.26$) (см. рис. 2, б). Во фронтальной коре различий по уровню белка ZDHHC5 между мышами ASC и СВА также не обнаружено (см. рис. 2).

При иммунодетекции белка ZDHHC21 также было выявлено две полосы, детектируемые антителами: первая полоса массой 27 кДа (рис. 3, б) во фронтальной коре и среднем мозге, а вторая – массой 32 кДа в гиппокампе (см. рис. 3, б). Однако уровень экспрессии этих бэндов не отличался между исследованными линиями мышей во всех структурах мозга (фронтальная кора – $F_{1,14} = 0.01, p = 0.98$, средний мозг – $F_{1,15} = 0.43, 4.38 p = 0.54$ и гиппокамп – $F_{1,16} = 2.00, p = 0.18$) (см. рис. 3, а).

Определение количества белка ZDHHC9 не выявило различий между мышами линий ASC и СВА во всех исследованных структурах мозга. Однако при иммунодетекции

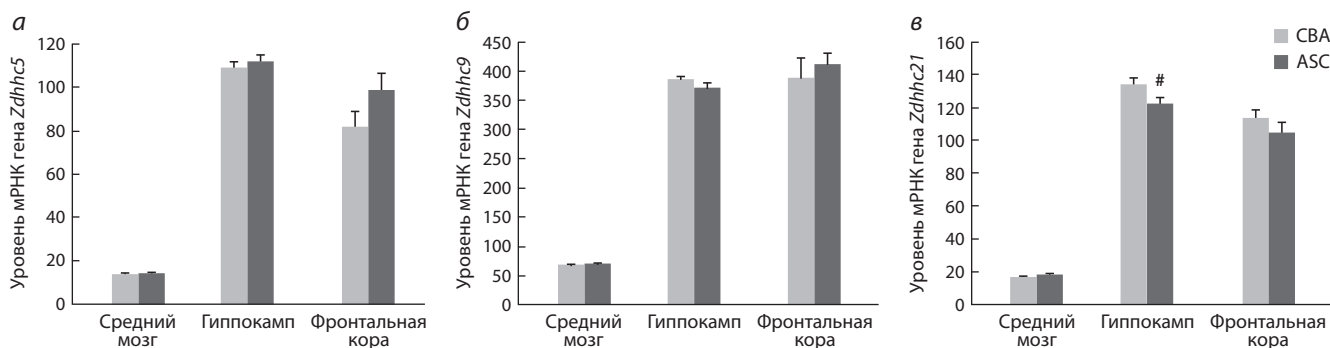


Рис. 1. Уровень мРНК генов: а – *Zdhhc5*; б – *Zdhhc9*; в – *Zdhhc21* в структурах мозга мышей CBA и ASC.

Экспрессия генов представлена как число копий кДНК соответствующего гена на 100 копий кДНК *Gapdh*.

$p < 0.05$ по сравнению с CBA. В каждой группе число образцов $n \geq 9$.

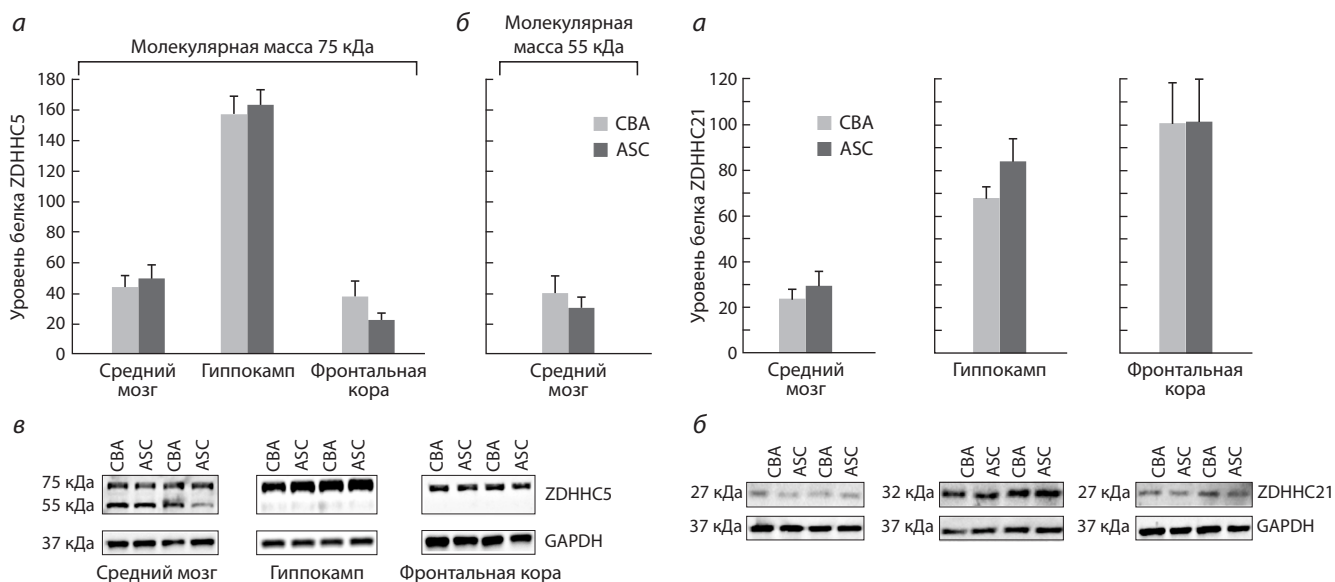


Рис. 2. Уровень белка ZDHHC5 в структурах мозга у мышей CBA и ASC.

Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала: а – полосы массой 75 кДа и б – полосы массой 55 кДа в среднем мозге мышей CBA и ASC. Уровень белка ZDHHC5 представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH; в – результат иммуноблота на мембране. В каждой группе число образцов $n \geq 7$.

Рис. 3. Уровень белка ZDHHC21 в структурах мозга у мышей CBA и ASC.

а – количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала полосы массой 27 кДа в среднем мозге и во фронтальной коре и 32 кДа в гиппокампе. Уровень белка ZDHHC21 представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH; б – результат иммуноблота на мембране. В каждой группе число образцов $n \geq 7$.

этой пальмитилтрансферазы было обнаружено по две полосы белка в среднем мозге и гиппокампе: первая полоса массой 46 кДа (рис. 4, в) и вторая, которой не наблюдалось во фронтальной коре, массой 41 кДа (см. рис. 4, в). Следует отметить, что в среднем мозге интенсивность нижней полосы (41 кДа) намного сильнее целевой полосы массой 46 кДа (см. рис. 4, в). Разницы по уровню белка как массы 46 кДа (средний мозг – $F_{1,15} = 0.22$, $p = 0.64$ и гиппокамп – $F_{1,16} = 2.17$, $p = 0.16$) (см. рис. 4, а), так и массы 41 кДа (средний мозг – $F_{1,16} = 0.39$, и гиппокамп – $F_{1,13} = 0.02$, $p = 0.89$) (см. рис. 4, б) обнаружено не было.

Обсуждение

В настоящей работе впервые исследована экспрессия пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21 на уровне мРНК и белка во фронтальной коре, гиппокампе

и среднем мозге двух линий мышей: не предрасположенной к депрессивно-подобному поведению CBA и ASC, характеризующейся генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению. Показано, что в гиппокампе мышей обеих линий белок ZDHHC21 визуализировался в виде полосы массой 32 кДа, что отличает ее от основной полосы массой 27 кДа, определяемой как основной бэнд белка ZDHHC21, экспрессируемый во фронтальной коре и среднем мозге. Можно предположить, что в гиппокампе происходят пространственные модификации ZDHHC21, что может играть существенную роль в регуляции функции белка (Varki, 1993; Dutta et al., 2017). В базе данных <http://www.uniprot.org> есть информация о посттрансляционных модификациях только для пальмитилтрансферазы ZDHHC5 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8VDZ4>). Для двух других исследованных в на-

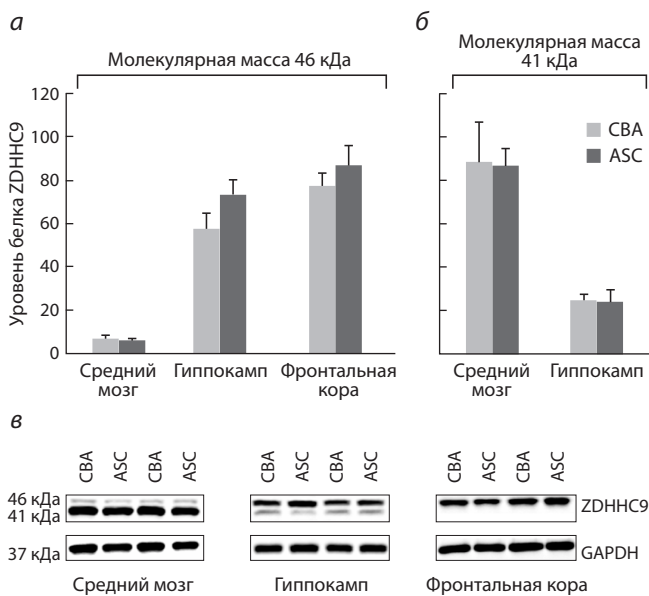


Рис. 4. Уровень белка ZDHHC9 в структурах мозга у мышей CBA и ASC. Количественная оценка интенсивности хемилюминесцентного сигнала: *а* – полосы массой 46 кДа и *б* – полосы массой 41 кДа в среднем мозге и гиппокампе мышей CBA и ASC. Уровень белка ZDHHC9 представлен в относительных единицах, нормализованных на соответствующий уровень GAPDH; *в* – результат иммуноблота на мембране. В каждой группе число образцов $n \geq 7$.

шей работе пальмитилтрансфераз таких данных нет. Тем не менее, основываясь на наблюдаемых нами регион-специфических различиях массы исследуемых белков в сравнении с заявленными производителем антител, можно предположить, что пальмитилтрансферазы ZDHHC21 и ZDHHC9, как и пальмитилтрансфераза ZDHHC5, могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Нельзя также исключать и возможность существования регион-специфических вариантов исследуемых ферментов, однако эта гипотеза требует дальнейших исследований с использованием целевого белка или нокаутных животных.

При иммунодетекции белка ZDHHC5 в среднем мозге мышей обеих линий обнаружено две полосы массой 75 кДа (ожидаемая масса) и 55 кДа, тогда как в коре и гиппокампе вторая полоса не обнаружена. В работе по изучению этой пальмитилтрансферазы в среднем мозге мышей линии 129/Ola (Li et al., 2010), как и в исследованиях, выполненных на культурах клеток (Brigidi et al., 2015; Wadawu et al., 2017), полосу ZDHHC5 весом 55 кДа не обнаружили.

Однако аналогичная выявленной для белка ZDHHC5 картина наблюдалась и при визуализации пальмитилтрансферазы ZDHHC9 в среднем мозге и гиппокампе. При иммунодетекции белка ZDHHC9 в этих структурах мозга также наблюдалось по две полосы. В среднем мозге полоса массой 41 кДа намного ярче, чем полоса с заявленным производителем антител массой 46 кДа. В гиппокампе нижняя полоса, наоборот, менее интенсивна. Интересно, что для этой пальмитилтрансферазы расчетная масса составляет именно 41 кДа (<http://www.uniprot.org/>

uniprot/P59268), тогда как ожидаемая, согласно описанию производителя антител, – 46 кДа. Следовательно, можно предположить, что более тяжелая полоса – это посттрансляционно модифицированная форма пальмитилтрансферазы ZDHHC9.

Нужно отметить крайне интересный факт, заключающийся в отсутствии во фронтальной коре мышей обеих линий альтернативных бэндов, исследуемых пальмитилтрансфераз, кроме ожидаемых. В первую очередь, это указывает на особенность этой структуры мозга для функции исследованных пальмитилтрансфераз. Кроме того, принимая во внимание выявленный факт, можно сделать вывод, что наблюдаемые нами в гиппокампе и среднем мозге дополнительные полосы для всех исследуемых пальмитилтрансфераз не являются артефактом иммунодетекции.

Таким образом, можно предположить, что наблюдаемая нами при иммунодетекции пальмитилтрансферазы ZDHHC5 легкая дополнительная полоса – изоформа фермента, экспрессирующаяся только в определенных структурах мозга. Для ZDHHC9 более вероятно, что дополнительная легкая полоса может представлять собой посттрансляционно немодифицированную форму фермента. В то же время тяжелая дополнительная полоса для пальмитилтрансферазы ZDHHC21 может быть как регион-специфической изоформой фермента, так и посттрансляционно модифицированным ферментом. Однако для подтверждения или опровержения таких предположений требуются дальнейшие исследования.

Следует отметить, что существенных различий по экспрессии исследованных пальмитилтрансфераз между мышами линии ASC с генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению и мышами родительской линии CBA обнаружено не было.

Заключение

Таким образом, полученные в настоящей работе данные указывают на то, что генетическая предрасположенность к депрессивно-подобному поведению у мышей линии ASC не связана с экспрессией пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21 во фронтальной коре, гиппокампе и среднем мозге. В то же время нами впервые были выявлены регион-специфические особенности экспрессии пальмитилтрансфераз ZDHHC5, ZDHHC9 и ZDHHC21. Результаты позволяют предположить существование нескольких изоформ или посттрансляционных модификаций исследованных ферментов, дифференциально экспрессирующихся в различных структурах мозга, однако эта гипотеза требует дальнейших исследований.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-54-12016). Разведение и содержание животных выполнялось на средства бюджетного проекта № 0324-2018-0016 с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015) и ЦКП «Виварий конвенциональных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Альперина Е.Л., Куликов А.В., Попова Н.К., Идова Г.В. Характер иммунного ответа у мышей новой линии ASC (antidepressant sensitive catalepsy). Бюл. эксперим. биол. и медицины. 2007; 144(8):188-190. [Alperina E.L., Kulikov A.V., Popova N.K., Iдова G.V. Immune response in mice of a new strain ASC (antidepressant-sensitive catalepsy). Byulleten Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2007; 144(8):188-190. (in Russian)]
- Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. Селекция на предрасположенность к катаlepsии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей. Генетика. 2005;41(9): 1222-1228. [Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Selection for the predisposition to catalepsy enhances depressive-like traits in mice. Genetika = Genetics (Moscow). 2005; 41(9):1222-1228. (in Russian)]
- Каткова Л.Е., Соленов Е.И., Иванова Л.Н. Роль протеинкиназы С в становлении механизма антидиуретического эффекта вазопрессина в почке крысы в постнатальном онтогенезе млекопитающих. Онтогенез. 2009;40(6):442-448. [Katkova L.E., Solenov E.I., Ivanova L.N. The role of protein kinase C in the formation of the mechanism of vasopressin antidiuretic action in the rat kidney during mammalian postnatal development. Ontogenez = Ontogenesis (Moscow). 2009;40(6):442-448. (in Russian)]
- Науменко В.С., Куликов А.В. Количественное определение экспрессии гена 5-HT1A серотонинового рецептора в головном мозге. Молекуляр. биология. 2006;40(1):37-44. [Naumenko V.S., Kulikov A.V. Quantitative assay of 5-HT1A receptor gene expression in the brain. Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology (Moscow). 2006;40(1):37-44. (in Russian)]
- Badawy S.M.M., Okada T., Kajimoto T., Ijuin T., Nakamura S.I. DHHC5-mediated palmitoylation of S1P receptor subtype 1 determines G-protein coupling. Sci. Rep. 2017;7(1):16552. DOI 10.1038/s41598-017-16457-4.
- Beard R.S.Jr., Yang X., Meegan J.E., Overstreet J.W., Yang C.G., Elliott J.A., Reynolds J.J., Cha B.J., Pivetti C.D., Mitchell D.A., Wu M.H., Deschenes R.J., Yuan S.Y. Palmitoyl acyltransferase DHHC21 mediates endothelial dysfunction in systemic inflammatory response syndrome. Nat. Commun. 2016;7(12823). DOI 10.1038/ncomms12823.
- Brigidi G.S., Santyr B., Shimell J., Jovellar B., Bamji S.X. Activity-regulated trafficking of the palmitoyl-acyl transferase DHHC5. Nat. Commun. 2015;6(8200). DOI 10.1038/ncomms9200.
- Cho E., Park M. Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. Pharmacol. Res. 2016;111(133-151). DOI 10.1016/j.phrs.2016.06.008.
- Duman R.S., Heninger G.R., Nestler E.J. A molecular and cellular theory of depression. Arch. Gen. Psychiatry. 1997;54(7):597-606.
- Dutta D., Mandal C., Mandal C. Unusual glycosylation of proteins: Beyond the universal sequon and other amino acids. Biochim. Biophys. Acta. 2017;1861(12):3096-3108. DOI 10.1016/j.bbagen.2017.08.025.
- Fukata Y., Fukata M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. Nat. Rev. Neurosci. 2010;11(3):161-175. DOI 10.1038/nrn2788.
- Gorinski N., Ponimaskin E. Palmitoylation of serotonin receptors. Biochem. Soc. Trans. 2013;41(1):89-94. DOI 10.1042/BST20120235.
- Harro J., Orelund L. Depression as a spreading neuronal adjustment disorder. Eur. Neuropsychopharmacol. 1996;6(3):207-223.
- Jacobs B.L., Azmitia E.C. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol. Rev. 1992;72(1):165-229.
- Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. Selective breeding for catalepsy changes the distribution of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT serotonin receptor gene in mice. Genes Brain Behav. 2006;5(8):596-601. DOI GBB212.
- Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. J. Neurosci. Meth. 2005;141(1):97-101. DOI S016502700400216X.
- Li Y., Hu J., Hofer K., Wong A.M., Cooper J.D., Birnbaum S.G., Hammer R.E., Hofmann S.L. DHHC5 interacts with PDZ domain 3 of post-synaptic density-95 (PSD-95) protein and plays a role in learning and memory. J. Biol. Chem. 2010;285(17):13022-13031. DOI 10.1074/jbc.M109.079426.
- Maes M., Meltzer H.Y. The serotonin hypothesis of major depression. Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Eds. E.E. Bloom, N.N. Kupfer. New York, 1995;933-944.
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains. Neuroscience. 2012;214:59-67. DOI S0306-4522(12)00390-9.
- Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. J. Neurosci. Meth. 2008;170(2):197-203. DOI S0165-0270(08)00044-7.
- Neumeister A., Wood S., Bonne O., Nugent A.C., Luckenbaugh D.A., Young T., Bain E.E., Charney D.S., Drevets W.C. Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects. Biol. Psychiatry. 2005;57(8):935-937. DOI 10.1016/j.biopsych.2005.01.016.
- Papoucheva E., Dumuis A., Sebben M., Richter D.W., Ponimaskin E.G. The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. J. Biol. Chem. 2004;279(5):3280-3291. DOI 10.1074/jbc.M308177200.
- Renner U., Glebov K., Lang T., Papusheva E., Balakrishnan S., Keller B., Richter D.W., Jahn R., Ponimaskin E. Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. Mol. Pharmacol. 2007;72(3):502-513. DOI 10.1124/mol.107.037085.
- Ressler K.J., Mayberg H.S. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. Nat. Neurosci. 2007;10(9):1116-1124. DOI 10.1038/nn1944.
- Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology. 1993;3(2):97-130.