

УДК 577.352

УБАИН В НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ИЗМЕНЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ, НЕ ВЛИЯЯ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ НАТРИЯ И КАЛИЯ В НЕЙРОНАХ МОЗГА КРЫСЫ

© 2019 г. Л. В. Смольянинова^{a, b, *}, А. А. Шиян^a, Т. С. Клементьева^c, А. А. Московцев^c,
А. А. Кубатиев^c, С. Н. Орлов^{a, b, **}

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119992, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 12

^bНациональный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

^cНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии,
Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*e-mail: smolyaninovalarisa1@gmail.com

**e-mail: sergeinorlov@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.02.2019 г.

После доработки 12.02.2019 г.

Принята к публикации 15.02.2019 г.

Ингибирование универсальной $\alpha 1$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы сопровождается резкими изменениями транскриптома клеток ряда тканей, опосредованными диссипацией градиента одновалентных катионов. В данном исследовании мы использовали резкое отличие сродства $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -АТФ-азы к убаину для изучения участия $\alpha 3$ -изоформы в регуляции внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ и экспрессии генов в первичной культуре гранулярных клеток мозжечка крыс. Добавление 100 нМ убаина снижает активность Na^+, K^+ -АТФ-азы на 20%, что обусловлено ингибированием $\alpha 3$ -изоформы фермента. В этой концентрации убаин изменяет транскрипцию 17 генов с максимальным уровнем активации и ингибирования в ~2 и 1.5 раза соответственно. Полномасштабное ингибирование $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -АТФ-азы 1 мМ убаином сопровождалось 50-кратным увеличением соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ и изменением содержания мРНК 673 генов с максимальным уровнем активации и ингибирования в 20 и 3 раза соответственно. В отличие от 1 мМ убаина, добавление 100 нМ убаина не влияло на фосфорилирование Ca^{2+} -чувствительного регулятора транскрипции CREB. Таким образом, изменение экспрессии генов в нейронах при ингибировании $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -АТФ-азы низкими дозами убаина не связано с увеличением $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, и активацией Ca_i^{2+} -чувствительного механизма регуляции транскрипции.

Ключевые слова: гранулярные клетки мозжечка, убаин, Na^+, K^+ -АТФ-аза, $\alpha 3$ -изоформа, натрий, калий, кальций, транскриптом

DOI: 10.1134/S0233475519030071

ВВЕДЕНИЕ

Na^+, K^+ -АТФ-аза — трансмембранный белок состоящий из ~110 кДа α -субъединицы, ~35 кДа β -субъединицы и 8 кДа γ -субъединицы. Гидролиз АТФ приводит к фосфорилированию Asp369 α -субъединицы, что обеспечивает электрогенный транспорт ионов (3Na^+ vs. 2K^+) со скоростью 60–80 циклов в секунду. В дополнение к универсальной $\alpha 1$ -изоформе нейроны обогащены $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -АТФ-азой, в то время как астроциты, кардиомиоциты и клетки скелетной мускулатуры содержат $\alpha 2$ -изоформу этого фермента. Четыре

изоформы β -субъединиц сильно гликозилированы и необходимы для ферментативной активности α -субъединицы и ее встраивания в плазматическую мембрану клеток. Функциональная значимость семи γ -субъединиц, содержащих мотив Pro-Phe-X-Tyr-Asp (FX_YD), остается плохо изученной [1, 2].

Кардиотонические стероиды (КТС) известны как селективные ингибиторы Na^+, K^+ -АТФ-азы, обнаруженные как в растениях (карденолиды), так и у некоторых представителей животного царства (буфадиенолиды). Механизм ингибирования

ния Na^+ , K^+ -АТФ-азы кардиотоническими стероидами лучше всего изучен на примере водорасстворимого карденолида убаина, выделенного из *Strophanthus gratus*. Как и предполагалось, убаин воздействует на большое количество клеточных функций, связанных с поддержанием трансмембранного градиента Na^+ и K^+ , таких как электрический мембранный потенциал (E_m), клеточный объем, трансэпителиальное движение солей и осмотически связанной воды, обмен Na^+/H^+ и $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{Ca}^{2+}$, симпорт Na^+ с неорганическим фосфатом, глюкозой, аминокислотами, нуклеотидами и т.д. За последние 20 лет показано, что вместе с ранее перечисленными каноническими $[\text{Na}^+]_i$ -, $[\text{K}^+]_i$ -, E_m -опосредуемыми клеточными ответами, кардиотонические стероиды могут воздействовать на экспрессию генов, мембранный транспорт, клеточную адгезию, пролиферацию и гибель клеток. Роль вклада Na_i^+ , K_i^+ -зависимой и независимой сигнализации и этих неканонических клеточных ответах, запускаемых кардиотоническими стероидами, широко обсуждается [3–7].

В отличие от большинства других клеток пирамидные и зубчатые нейроны в коре головного мозга и в гиппокампе [8, 9], как и культивируемые гранулярные клетки [10, 11] обогащены $\alpha 3$ -изоформой Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Munzег и соавт. показали, что при высокой внутриклеточной концентрации K^+ и насыщающей концентрации внеклеточного K^+ полумаксимальная активация убаин-чувствительного входа ^{86}Rb $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформами Na^+ , K^+ -АТФ-азы наблюдалась при концентрации цитоплазматического Na^+ (Na_i^+) ~18, 20 и 64 мМ соответственно [12]. Более низкая аффинность $\alpha 3$ -изоформы к Na_i^+ подтверждена в исследовании кинетики выхода Na^+ из $\alpha 1$ - $\alpha 3$ -трансфицированных клеток HeLa, заполненных Na^+ -чувствительной флуоресцентной краской SBFI [13]. Исходя из этих данных предположили, что $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -АТФ-аза играет важную роль в поддержании низкого отношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в базальных условиях, в то время как $\alpha 3$ -изоформы участвуют в нормализации прироста $[\text{Na}^+]_i$, вызванного длительным возбуждением нейронов [13–15].

Несколько исследовательских команд [16–18] показали, что у грызунов сродство $\alpha 3$ - Na^+ , K^+ -АТФ-азы к КТС на 3 порядка выше, чем у $\alpha 1$ -изоформы. Так, используя трансфицированные фибробласты NIH3T3, O'Vrien и соавт. показали, что стандартная аффинность $\alpha 3$ -, $\alpha 2$ - и $\alpha 1$ -изоформ крысы к убаину, посчитанная по связыванию [^3H]-убаина, составляет ~2, 115 и 48000 нМ соответственно [16]. В клетках BALB/c 3T3, трансфицированных $\alpha 3$ - и $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -АТФ-азами крысы, полумаксимальное ингибирование входа ^{86}Rb на-

блюдалась при концентрациях убаина 8×10^{-8} и 4.5×10^{-5} М соответственно [17]. Эти резкие различия подтверждены сравнительным анализом дозозависимого действия убаина на активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы в мозге крыс [18] и культивируемых нейронах из мозжечка крысы [19].

Ранее было установлено, что ингибирование $\alpha 1$ - Na^+ , K^+ -АТФ-азы сопровождается резкими изменениями транскрипта клеток ряда тканей, опосредованными диссипацией градиента одновалентных катионов и последующей активацией как Ca^{2+} -опосредованных, так и Ca^{2+} -независимых сигнальных систем [20]. В данном исследовании мы использовали резкое отличие сродства к убаину $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ - Na^+ , K^+ -АТФ-азы для изучения участия $\alpha 3$ -изоформы в регуляции внутриклеточной концентрации Na^+ и K^+ и экспрессии генов в первичной культуре гранулярных клеток мозжечка крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичное культивирование гранулярных клеток мозжечка. Для приготовления первичной культуры гранулярных клеток мозжечка использовали 5–7-дневных крыс линии Wistar Kyoto. Животных содержали в стандартных условиях в виварии при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и еде. Для получения первичной культуры клеток мозжечка проводили декапитацию животных, далее в стерильных условиях извлекали мозжечок, как описано ранее [21]. Диссоциацию клеток мозжечка производили с помощью 0.25% раствора трипсин-EDTA (ПанЭко, Россия) в течение 15 мин при 37°C. После инкубации клетки на 2–3 мин помещали в 2–3 мл 10% бычьей сыворотки для остановки реакции (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали в нейробазальной среде (Gibco, США) содержащей 2% Supplement B-27 (Gibco, США), 0.5 мМ GlutaMax (Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 20 мМ KCl и с плотностью 1.2×10^5 клеток/см² в шести-луночных плашках, обработанных поли-L-орнитин (Sigma, США). Клетки культивировали при 37°C, 90% влажности, 5% CO₂ в течение 7 дней. Цитозин β -D-арабинофуранозид (Sigma, США) добавляли до конечной концентрации 10 мкМ после 24 ч нахождения клеток в культуральных плашках для ингибирования пролиферации астроцитов.

Количественный анализ содержания Na^+ и K^+ с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). Клетки культивировали в 6-луночных плашках с плотностью 1.2×10^5 клеток/см². Через 3 ч после инкубации с убаином, клетки дважды промывали холодным раствором 0.1 М MgCl₂ и лизировали в 200 мкл трихлорук-

сусной кислоты (ТХУ). Лизаты переносили в микропробирки (0.5 мл) и инкубировали в течение 12 ч при 4°C. После инкубации образцы разбавляли до 500 мкл дважды деионизированной водой и проводили измерение на Varian 820-MS (США). Концентрации выбранных элементов (мг/л) измеряли методом внешней калибровки. Данные анализировали с помощью ICP-MS Expert, version 2.1 b-107 (США). Содержание Na^+ и K^+ выражали как миллионную долю (м.д.) на образец.

Измерение активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Клетки после инкубации с убаином разрушали методом замораживания—оттаивания. Далее определение активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы проводили по накоплению неорганического фосфата, используя метод Ратбуна и Бетлах, основанный на применении хлористого олова в качестве восстановителя. Реакцию проводили в среде инкубации объемом 1 мл, содержащей 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 30 мМ имидазола, 3 мМ MgCl_2 , 3 мМ АТФ. Количество фермента и время инкубации подбирали экспериментально. Поскольку препараты белков содержали некоторое количество других АТФ-аз, таких как Mg-АТФ-аза, Ca^{2+} -активируемая АТФ-аза, H^+ -АТФ-аза и ряд других, проводили две серии измерений: измеряли общую активность и убаин-независимую активность в присутствии 1 мМ убаина; активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы рассчитывали как разность этих активностей. Реакцию начинали добавлением АТФ в пробу. Для остановки реакции использовали 3 М ацетатный буфер, содержащий 3.7% формальдегида с рН 4.3. Затем в пробу добавляли 0.1 мл 2% раствора молибдата аммония и 0.1 мл раствора хлорида олова, который готовили непосредственно перед определением (15 мг SnCl_2 , 4–5 капель концентрированной уксусной кислоты, 5 мл воды). В контрольную пробу после смешивания с ацетатным буфером добавляли белок. Окраска развивалась в течение 15 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность раствора регистрировали на приборе Ultrospec 1100 (660 нм).

Выделение суммарной РНК. Суммарную РНК выделяли с помощью набора PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, США) по протоколу производителя. Образцы суммарной РНК для предотвращения заражения геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

Анализ транскриптома методом микрочипов. Для анализа транскриптома методом микрочипов использовали образцы с показателем целостности РНК больше 7.0 (RIN). Качество РНК оценивали с помощью 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Для анализа транскриптомов контрольных и экспериментальных образцов использовали микрочипы GeneChip® Rat Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, США). Суммарное количество транскрип-

тов, определяемое данными микрочипами, составляет 28407 (по базе RefSeq). Для пробоподготовки с помощью набора GeneChip® WT PLUS Reagent kits (Affymetrix, США) использовали 500 нг РНК. Данный набор проводит реакцию обратной транскрипции с использованием праймеров, связывающих нерибосомную РНК, с получением амплифицированной и биотинилированной ДНК. Далее кДНК (5.5 мг) фрагментировали и метили с помощью набора Affymetrix GeneChipH WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix, США), и подвергали гибридизации кДНК (3.5 мг) на микрочипах, используя GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, США). Совместную обработку CEL-файлов и оценку уровня экспрессии генов осуществляли в Affymetrix Expression Console (build 1.4.1.46) стандартным для используемых микрочипов методом RMA-Sketch. Статистический анализ проводили в Affymetrix Transcriptome Analysis Console 3.0. При сравнении групп применяли парный вариант анализа Repeated Measure (paired).

Вестерн-блоттинг. Клетки после инкубации с убаином промывали дважды холодным сбалансированным раствором Хенкса и лизировали в буфере RIPA (Sigma, США), содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma, США). Общую концентрацию белка измеряли, используя набор DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, США). Для разделения белков с помощью 15% SDS-PAGE использовали 15 мкг белка, а затем осуществляли электроперенос на PVDF-мембрану методом полусухого переноса. После электропереноса белков PVDF-мембраны блокировали и инкубировали с первичными антителами в течение ночи и с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). В работе использовали первичные антитела: фосфо-CREB (Ser133) (87G3) mAb (Cell Signaling, США); β -актин (D6A8) mAb (Cell Signaling Technology, США) и вторичные антитела IgG-HRP (Cell Signaling Technology, США). Визуализацию белков осуществляли с помощью наборов SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate или SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Хемилюминесценцию измеряли, используя систему ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). Данные хемилюминесценции анализировали с помощью программного обеспечения Image Lab 3.0 (Bio-Rad, США). В каждом эксперименте контрольные значения были приняты за 100%. β -актин использовали как маркер равномерного нанесения белка.

Статистика. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism4 с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия Даннета. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

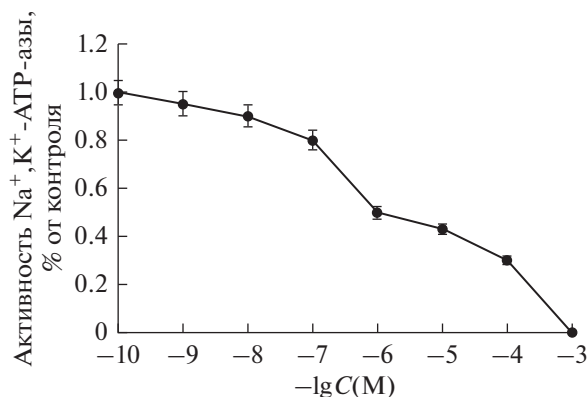


Рис. 1. Изменение активности Na^+, K^+ -АТФ-азы при действии разных концентраций убаина. Представлены среднearифметические значения и значения стандартной ошибки, полученные в трех независимых экспериментах. Исходное значение активности принято за 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сложный характер зависимости активности АТФ-азы гранулярных клеток мозжечка от концентрации убаина (рис. 1) согласуется с данными других исследований [22, 23], и указывает на наличие двух ферментов с высоким и низким сродством к этому ингибитору: высокоаффинной ($K_i \sim 10^{-7}$ М) нейрон-специфической $\alpha 3-Na^+, K^+$ -АТФ-азы и низкоаффинной ($K_i \sim 10^{-4}$ М) универсальной $\alpha 1-Na^+, K^+$ -АТФ-азы соответственно.

Рис. 2 показывает, что инкубация $\alpha 1-$ и $\alpha 3-Na^+, K^+$ -АТФ-азы гранулярных клеток мозжечка в течение 3 ч в присутствии 1 мМ убаина приводит к увеличению Na^+_i в 8 раз и снижению в 6 раз содержания внутриклеточного калия (K^+_i). Мы не наблюдали значительного изменения этих параметров при селективном ингибировании КТС-чувствительной $\alpha 3-Na^+, K^+$ -АТФ-азы в присутствии 100 нМ убаина (рис. 2). Эти результаты предполагают, что в базальных условиях ингибирование $\alpha 3-Na^+, K^+$ -АТФ-азы не влияет на внутриклеточную концентрацию Na^+ и K^+ . Эти выводы согласуются с данными, полученными с помощью Na^+ -чувствительного флуоресцентного зонда SBFI. В этой работе установлено незначительное влияние 10^{-6} М убаина на содержание натрия в культивируемых клетках гиппокампа крысы и нейронах стриатума в отличие от 7-кратного увеличения $[Na^+]_i$ при воздействии 10^{-3} М убаина [15].

Из представленных в табл. 1 данных видно, что ингибирование $\alpha 3-Na^+, K^+$ -АТФ-азы в присутствии 100 нМ убаина в течение 3 ч сопровождалось изменением содержания мРНК 17 генов с максимальным уровнем активации и ингибирования в 1.87 и 1.54 раза соответственно. Ингибирование Na^+, K^+ -АТФ-азной активности 1 мМ убаином вызывало (в отличие от низких доз) резкие изменения транскриптома, что выражалось в увеличении до 20 раз содержания тран-

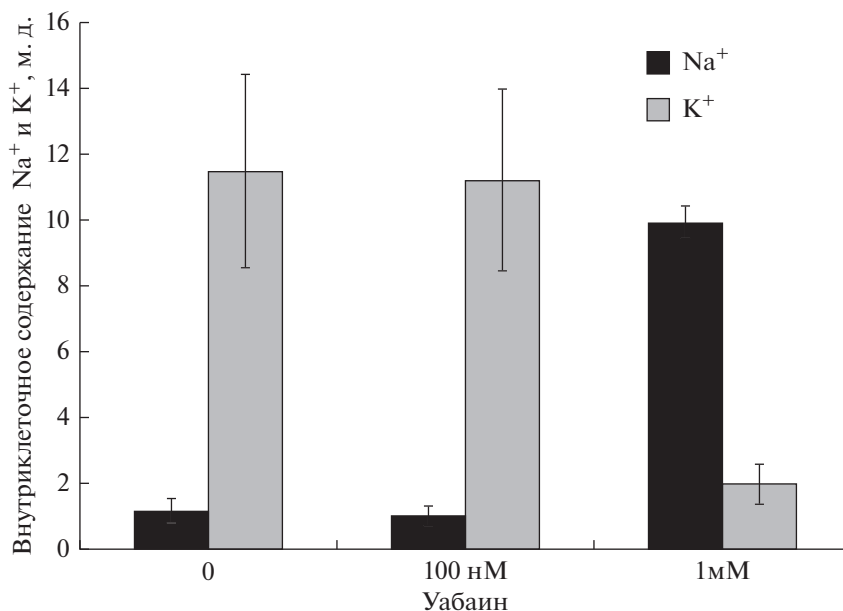


Рис. 2. Действие убаина на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ в первичной культуре нейронов мозжечка крысы. Клетки инкубировали в присутствии и в отсутствие 100 нМ и 1 мМ убаина в течение 3 ч. Внутриклеточное содержание ионов выражено в м.д. Представлены среднearифметические значения и значения стандартной ошибки, полученные в трех независимых экспериментах.

Таблица 1. Количество генов, экспрессия которых изменилась после инкубации в течение 3 ч в присутствии 100 нМ и 1 мМ убаина

Гены	Убаин, 100 нМ	Убаин, 1 мМ
Экспрессия повысилась		
Количество транскриптов	10	295
Максимальная активация, разы	1.87	18.82
Экспрессия понизилась		
Количество транскриптов	7	378
Максимальное подавление, разы	1.54	2.91

Примечание. Учитывали только транскрипты, экспрессия которых изменилась более чем в 1.4 раза ($p < 0.05$).

Таблица 2. Гены, экспрессия которых увеличилась в присутствии 100 нМ убаина более чем в 1.4 раза ($p < 0.05$)

Символ и название белковых продуктов генов	Функциональная категория*	Уровень активации/ p -значение
Olr551, olfactory receptor 551	OLFR	1.87/0.018489
SPC24, NDC80 kinetochore complex component	PSHD	1.55/0.04222
Olr1334, olfactory receptor 1334	OLFR	1.50/0.037193
RGD1310495, similar to KIAA1919 protein	MTR	1.47/0.044616
Olr397, olfactory receptor 397	OLFR	1.47/0.014367
LOC102548248, calphotin-like	UN	1.47/0.032125
Csdc2, cold shock domain containing C2, RNA binding	TR	1.45/0.033715
Olr1394, olfactory receptor 1394	OLFR	1.44/0.032407
LOC102556805, rho GTPase-activating protein 20-like	S	1.43/0.023919
Drgx, dorsal root ganglia homeobox	TR	1.41/0.044668

* Здесь и в табл. 3. Функциональные категории: MTR – мембранные транспортеры; O – другое; OLFR – обонятельные рецепторы; PSHD – синтез, сворачивание и деградация белков; S – сигналинг; TR – регуляция транскрипции; UN – не охарактеризованы.

скриптов 295 генов и уменьшении до 3 раз содержания 378 генов (табл. 1).

Функциональная классификация генов, при экспрессии которых получаемые белки зачастую многофункциональны, всегда в той или иной степени искусственна. Учитывая это, мы ограничили наш анализ только основными функциональными категориями. Из табл. 2 и 3 видно, что список генов, чья экспрессия изменялась при добавлении 100 нМ убаина, обогащен генами обонятельных рецепторов. Обонятельные рецепторы кодируются большим семейством генов, число которых в геноме крысы составляет почти 1200 [24]. Функции обонятельных рецепторов, как рецепторов, связанных с G-белками, хорошо изучена на примере эпителиальных клеток. В этих высокоспециализированных клетках связывание пахучих стимулов обонятельными рецепторами приводит к активации аденилатциклазы, увеличению внутриклеточной cAMP и активации cAMP-зависимых Ca^{2+} -каналов [25, 26]. Недавно экспрессию обонятельных рецепторов выявили в

клетках скелетной мускулатуры и других тканей, не чувствительных к запахам [27]. В скелетных мышцах мышей и крыс эктопические обонятельные рецепторы участвуют в миогенезе [28]. Нами показано что в культивируемых миотубулах C2C12 как убаин, так и электростимуляция воздействуют на экспрессию обонятельных рецепторов через Ca^{2+} -опосредованную передачу сигнала [29]. Функциональная значимость изменений экспрессии эктопических обонятельных рецепторов в нейронах, запускаемых убаином в низких дозах через Na_i^+/K_i^+ -независимые сигнальные пути, остается не изученной.

Резкие изменения транскриптома в гранулярных клетках мозжечка в ответ на воздействие 1 мМ убаина охарактеризованы нами ранее [30]. Эти изменения, по-видимому, опосредованы увеличением соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ как следствие полномасштабного ингибирования Na^+,K^+ -АТФ-азы (рис. 1, 2). Этот вывод подтверждается сравнительным анализом дозовой и временной зависимостей действия убаина и другого кардиотонического

Таблица 3. Гены, экспрессия которых уменьшилась в присутствии 100 нМ убаина в более чем 1.4 раза ($p < 0.05$)

Символ и название белковых продуктов генов	Функциональная категория	Уровень подавления/ p -значение
Olr1875, olfactory receptor 1875	OLFR	-1.4/0.039398
Cdk15, cyclin-dependent kinase-like 5	S	-1.41/0.008764
Olr687, olfactory receptor 687	OLFR	-1.42/0.015524
Olr639, olfactory receptor 639	OLFR	-1.44/0.03603
Olr1065, olfactory receptor 1065	OLFR	-1.44/0.033742
RGD1566085, similar to pyridoxal kinase	O	-1.47/0.044618
Olr1246, olfactory receptor 1246	OLFR	-1.54/0.015191
Slc6a12, solute carrier family 6 neurotransmitter transporter	MTR	-1.56/0.015467

стероида маринобуфагенина на внутриклеточное содержание Na^+ и K^+ и экспрессию генов в эндотелиальных клетках человека, обогащенных универсальной $\alpha 1$ -изоформой Na^+, K^+ -АТФ-азы [31].

Изменения транскрипции небольшого числа генов, отмеченные при воздействии 100 нМ убаина, предполагают участие $\alpha 3$ -изоформы Na^+, K^+ -АТФ-азы как первоначального звена сигнального каскада. Важно отметить, что в этой концентрации, убаин не оказывал достоверного влияния на

внутриклеточное содержание одновалентных катионов (рис. 2). В большинстве типов клеток увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ приводит к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ через активацию $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника и/или потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию регулятора транскрипции CREB Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназой [20, 32–34]. В самом деле, инкубация гранулярных клетках мозжечка в течение 3 ч в присутствии 1 мМ убаина сопровождалась 20-кратным увеличением фосфорилирования CREB (рис. 3). Однако нам не удалось обнаружить статистически значимого увеличения фосфорилирования этого белка в ответ на добавление 100 нМ убаина. Таким образом, изменение экспрессии генов в нейронах головного мозга под действием убаина в низких дозах, при которых ингибируется $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -АТФ-аза, вызвано активацией $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -независимого сигнального каскада, не связанного с известным Ca^{2+} -зависимым механизмом регуляции транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (16-15-10026) и РФФИ (18-04-00063).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheiner-Bobis G. 2003. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2424–2433.
2. Blanco G. 2015. Subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Sem. Nephrology.* **25**, 292–303.
3. Xie Z., Askari A. 2002. Na^+/K^+ -ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2434–2439.
4. Aperia A. 2007. New roles for an old Na, K -ATPase emerges as an interesting drug target. *J. Intern. Med.* **261**, 44–52.
5. Liu J., Xie Z. 2010. The sodium pump and cardiotoxic steroids-induced signal transduction protein kinases and calcium-signaling microdomain in regulation of transporter trafficking. *Biochim. Biophys. Acta.* **1802**, 1237–1245.

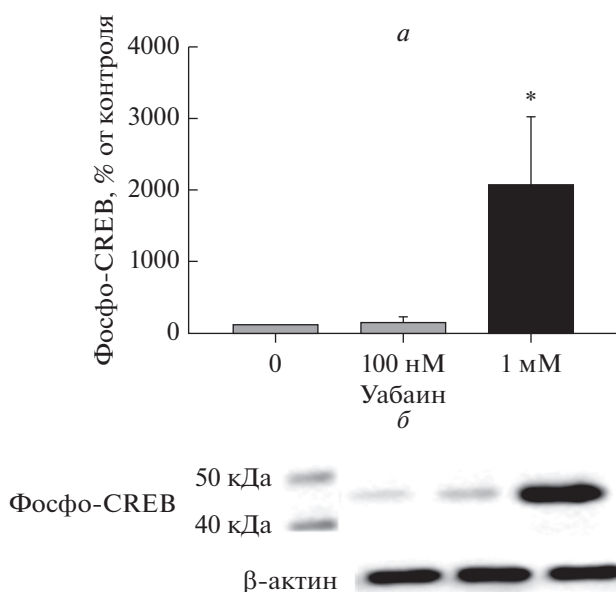


Рис. 3. *а* – Влияние убаина на активацию CREB в клетках первичной культуры нейронов мозжечка крысы. К культуре клеток добавляли убаин в концентрации 100 нМ или 1 мМ и инкубировали в течение 3 ч. Исходный уровень фосфорилирования CREB в клетках принят за 100%, данные представлены как среднеарифметические значения и значения стандартной ошибки, полученные в четырех независимых экспериментах. *б* – Вестерн-блот фосфо-CREB (Ser133) и β -актина в образцах после 3 ч инкубации нейронов с убаином.

6. Riganti C., Campia I., Kopecka J., Gazzano E., Doublier S., Aldieri E., Bosia A., Ghigo D. 2011. Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. *Curr. Med. Chem.* **18**, 872–885.
7. Orlov S.N., Klimanova E.A., Tverskoi A.M., Vladychenskaya E.A., Smolyaninova L.V., Lopina O.D. 2017. Na_i^+ , K_i^+ -dependent and -independent signaling triggered by cardiotoxic steroids, facts and artifacts. *Molecules*. **22**, E635.
8. Hieber V., Siegel G.J., Fink D.J., Beaty M.V., Mata M. 1991. Differential distribution of (Na,K)-ATPase alpha isoforms in the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**, 253–262.
9. McGrail K.M., Phillips J.M., Sweadner K.J. 1991. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in rat central nervous system, both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J. Neurosci.* **11**, 381–391.
10. Peng L., Martin-Vasallo P., Sweadner K.J. 1997. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and granule cell cultures. *J. Neurosci.* **17**, 3488–3502.
11. Akkuratov E.E., Lopacheva O.M., Kruusmagi M., Lopachev A.V., Shah Z.A., Boldyrev A.A., Liu L. 2015. Functional interaction between Na/K-ATPase and NMDA receptor in cerebellar neurons. *Mol. Neurobiol.* **52**, 1726–1734.
12. Munzer J.S., Daly S.E., Jewell-Motz E.A., Lingrel J.B., Blostien R. 1994. Tissue- and isoform-specific behavior of the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**, 16668–16676.
13. Zahler R., Zhang Z.-T., Manor M., Boron W.F. 1997. Sodium kinetics of Na,K-ATPase α isoforms in intact transfected HeLa cells. *J. Gen. Physiol.* **110**, 201–213.
14. Dobretsov M., Stimers J.R. 2005. Neuronal function of alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front. Biosci.* **10**, 2372–2396.
15. Azarias G., Kruusmagi M., Connor S., Akkuratov E.E., Liu X.L., Lyons D., Brismar H., Broberger C., Aperia A.A. 2013. Specific and essential role for Na,K-ATPase $\alpha 3$ in neurons co-expressing $\alpha 1$ and $\alpha 3$. *J. Biol. Chem.* **288**, 2734–2743.
16. O'Brien W.J., Lingrel J.B., Wallick E.T. 1994. Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 32–39.
17. Hara Y., Nikamoto A., Kojima T., Matsumoto A., Nakao M. 1980. Expression of sodium pump activities in BALB/c 3T3 cells transfected with cDNA encoding alpha 3-subunits of rat brain Na^+ , K^+ -ATPase. *FEBS Lett.* **26**, 27–30.
18. Berrebi-Bertrand I., Maixent J.M., Christe G., Lelièvre L.G. 1990. Two active Na^+ / K^+ -ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1021**, 148–156.
19. Atterwill C.K., Cunningham V.J., Balazs R. 1984. Characterization of Na^+ , K^+ -ATPase in cultured and separated neuronal and glial cells from rat cerebellum. *J. Neurochem.* **43**, 8–18.
20. Orlov S.N., Hamet P. 2015. Salt and gene expression: Evidence for Na_i^+ , K_i^+ -mediated signaling pathways. *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* **467**, 475–487.
21. Lopachev A.V., Lopacheva O.M., Osipova E.A., Vladychenskaya E.A., Smolyaninova L.V., Fedorova T.N., Koroleva O.V., Akkuratov E.E. 2016. Ouabain-induced changes in MAP kinase phosphorylation in primary culture of rat cerebellar cells. *Cell. Biochem. Funct.* **34**, 367–377.
22. Marks M.J., Seeds N.W. 1978. A heterogeneous ouabain – ATPase interaction in mouse brain. *Life Sci.* **23**, 2735–2744.
23. Berrebi-Bertrand I., Maixent J.M., Christe G., Lelièvre L.G. 1990. Two active Na^+ / K^+ -ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1021**, 148–156.
24. Touhara K., Niimura Y., Ihara S. 2016. *Chemosensory Transduction*. Elsevier Inc., p. 49–66.
25. Lowe G., Nakamura T., Gold G.H. 1989. Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 5641–5645.
26. Nakamura T., Gold G.H. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor glia. *Nature.* **325**, 442–444.
27. Kang N., Koo J. 2012. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB Rep.* **45**, 612–622.
28. Griffin C.A., Kafadar K.A., Pavlath G.K. 2009. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Developmental Cell.* **17**, 649–661.
29. Sidorenko S.V., Klimanova E.A., Milovanova K., Lopina O.D., Kapilevich L.V., Chibalin A.V., Orlov S.N. 2018. Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation, role of Ca_i^{2+} -mediated and Ca_i^{2+} -independent signaling and elevated $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio. *Cell Calcium.* **76**, 72–86.
30. Klimanova E.A., Sidorenko S.V., Smolyaninova L.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Lopina O.D., Orlov S.N. 2019. Ubiquitous and cell type-specific transcriptomic changes triggered by dissipation of monovalent cation gradients in rodent cells: Physiological and pathophysiological implications. *Curr. Topics Membranes.* **83**. Accepted for print.
31. Klimanova E.A., Tverskoi A.M., Koltsova S.V., Sidorenko S.V., Lopina O.D., Tremblay J., Hamet P., Kapilevich L.V., Orlov S.N. 2017. Time- and dose-dependent actions of cardiotoxic steroids on transcriptome and intracellular content of Na^+ and K^+ , a comparative analysis. *Sci. Rep.* **7**, 45403.
32. Santana L.F. 2008. NFAT-dependent excitation-transcription coupling in heart. *Circ. Res.* **103**, 681–683.
33. Gundersen K. 2011. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle, the molecular pathways of exercise. *Biol. Rev.* **86**, 564–600.
34. Ma H., Groth R.D., Wheeler D.G., Barrett C.F., Tsien R.W. 2011. Excitation-transcription coupling in sympathetic neurons and the molecular mechanism of its initiation. *Neurosci. Res.* **70**, 2–8.

Ouabain at Low Concentrations Affects Transcription without Any Impact on Intracellular Content of Sodium and Potassium in Rat Brain Neurons

L. V. Smolyaninova^{1,2,*}, A. A. Shiyan¹, T. S. Klementieva³, A. A. Moskovtsev³,
A. A. Kubatiev³, and S. N. Orlov^{1,2,**}

¹Moscow Lomonosov State University, Biology Department, Leninskie Gory 1, build. 12, Moscow, 119992 Russia

²National Research Tomsk State University, pr. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

*e-mail: smolyaninolarisa1@gmail.com,

**e-mail: sergeinorlov@yandex.ru

In several types of cells, inhibition of ubiquitous $\alpha 1$ -isoform of the Na^+, K^+ -ATPase leads to drastic transcriptional changes mediated by dissipation of transmembrane concentration gradients of monovalent cations. In the present study, we employed the sharp differences in the affinity of $\alpha 1$ - and $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -ATPase for ouabain to examine the role of $\alpha 3$ -isoform in the regulation of intracellular Na^+ and K^+ content and gene expression in primary cultures of rat cerebellum granule cells. Addition of 100 nM ouabain decreased Na^+, K^+ -ATPase activity by 20% due to the inhibition of $\alpha 3$ isosyme. At this concentration, ouabain changed transcription of 17 genes with maximal ~ 2 -fold activation and 1.5-fold inhibition. The full-scale inhibition of $\alpha 1$ - and $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -ATPase by 1 mM ouabain was accompanied by a ~ 50 -fold elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio and altered the content of mRNA encoding 673 genes with maximal 20-fold activation and 3-fold inhibition. Unlike 1 mM ouabain, addition of 100 nM ouabain did not affect phosphorylation of Ca^{2+} -sensitive transcription regulator CREB. Our results show that transcriptomic changes in neurons subjected to inhibition of $\alpha 3$ - Na^+, K^+ -ATPase by low doses of ouabain are not mediated by elevation of the $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ratio and activation of Ca_i^{2+} -sensitive mechanisms of excitation-transcription coupling.

Keywords: cerebellum granule cells, ouabain, Na,K-ATPase, alpha3 isoform, sodium, potassium, calcium, transcriptome