

УДК 577.218

ПРИ ИНИЦИАЦИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПОТЕНЦИАЦИИ В НЕЙРОНАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ СУБЪЕДИНИЦА RNF10 РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА PBAF МЕНЯЕТ СВОЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ И ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С c-FOS

© 2021 г. А. М. Азиева^{a, b, *}, А. А. Шейнов^a, Д. А. Кириллова^b,
Е. В. Татарский^a, С. Г. Георгиева^{a, c}, Н. В. Сошникова^a

^aИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

^cИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: so2615nat@gmail.com

Поступила в редакцию 16.10.2020 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 19.05.2021 г.

Комплекс PBAF, ремоделирующий хроматин, взаимодействует со многими активаторами транскрипции и рекрутируется на таргетные участки хроматина. PBAF играет важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина в клетках нервной системы млекопитающих. Субъединица комплекса PBAF – транскрипционный фактор RNF10 – необходим для пролиферации нейрональных предшественников на ранних стадиях развития головного мозга мышей и экспрессии генов в дифференцированных нейронах. Мы показали, что RNF10 взаимодействует с белковым продуктом гена раннего ответа *c-Fos*, транскрипционным активатором c-FOS, который экспрессируется в ответ на индукцию долговременной потенциации (ДВП). Индукция ДВП запускает транскрипцию генов и синтез белков, обеспечивающих изменения, приводящие к установлению долговременных контактов между нейронами. После индукции ДВП в клетках дифференцированной нейрональной культуры начинает экспрессироваться c-FOS, который первоначально локализуется в цитоплазме, а далее перемещается в ядро. RNF10 экспрессируется в нейрональных клетках до индукции ДВП и имеет ядерную локализацию. Однако через 1 ч после индукции RNF10 детектируется в цитоплазме вместе с c-FOS, а затем вместе с ним перемещается в ядро. Важно, что такое поведение RNF10 в ответ на стимуляцию KCl специфично для нейрональных культур. Предполагается, что в процессе ДВП RNF10 совместно с c-FOS участвует в активации генов вторичного ответа, регулирующих поддержание пластических модификаций и гомеостаза синапсов нейронов. Экспорт RNF10 из ядра и его быстрое возвращение вместе с c-FOS в ядро, возможно, необходимо для быстрой модуляции экспрессии таргетных генов вторичного ответа в процессе ДВП.

Ключевые слова: RNF10, PBAF, c-FOS, нейрональные культуры, долговременная потенция

DOI: 10.31857/S0026898421060033

ВВЕДЕНИЕ

Долговременная потенция (ДВП) – это стабильное усиление синаптической передачи между двумя нейронами, возникающее при повторяющейся передаче сигнала. ДВП лежит в основе установления нейрональных связей в процессе дифференцировки головного мозга млекопитающих, обеспечивает пластичность нейрональных

связей и считается одним из основных механизмов, важных для обучения и памяти. Нарушения в ДВП активно изучаются в связи с болезнью Альцгеймера и другими заболеваниями нервной системы.

Хотя сам эффект ДВП был открыт на нейронах гиппокампа кролика, в настоящее время понятно, что он существует во всех отделах головного

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДВП – долговременная потенция; ДВР – долговременная репрессия; ПААГ – полиакриламидный гель; DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (4',6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорид); DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (среда Игла, модифицированная Дюльбекко); FBS – fetal bovine serum (фетальная сыворотка крупного рогатого скота); HEK293T – Human Embryonic Kidney 293T (линия клеток эмбриональной почки человека 293T); PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate форболмиристатацетат, форболовый эфир; PBS – фосфатно-солевой буфер.

мозга млекопитающих. Молекулярные механизмы, лежащие в основе ДВП, пока недостаточно изучены. Известно, что ДВП у млекопитающих стимулируется стрессом, факторами роста, нейротрансмиттерами, увеличением концентрации глутаминовой кислоты. Эти факторы приводят к росту концентрации внутрицитоплазматического кальция и активации Ca^{2+} -зависимого киназного каскада, который ведет к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB [1, 2]. В лабораторных условиях при работе со срезами мозга или культурами клеток ДВП и активацию CREB можно вызвать высокочастотной стимуляцией (тетанизацией) или кратковременным увеличением концентрации внеклеточного калия [3].

Активация CREB запускает экспрессию многих генов, в том числе генов раннего ответа *c-Fos*, *Arc*, *Egr1* [4] — мощных активаторов транскрипции, которые инициируют вторую волну экспрессии генов, включающую эффекторные гены, регулирующие поддержание пластических модификаций и гомеостаза синапса [5, 6]. Экспрессия *c-FOS* служит маркером активности нейронов, представляющей ключевой этап изменения фенотипа клетки, лежащего в основе нейропластичности [7].

Изменение экспрессии генов всегда происходит при участии дополнительных факторов транскрипции, важнейшие из которых — комплексы, ремоделирующие хроматин. Некоторые субъединицы ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF взаимодействуют с *c-FOS* [8]. Мультибелковый комплекс SWI/SNF (2 МДа) подразделяется на два подсемейства (BAF и PBAF) и состоит из коровых и специфических модульных субъединиц. Коровые субъединицы выполняют ремоделирующую функцию, а модульные определяют специфичность работы комплекса на генах. Субъединичный состав комплексов SWI/SNF непостоянен и зависит от типа клеток и их функции. Гетерогенные и высокоспецифичные клетки мозга млекопитающего содержат большое количество специфичных субъединиц комплекса SWI/SNF, входящих в его состав на разных этапах нейродифференцировки. Показано, что коровые субъединицы BRG1, BAF155, BAF170 важны на всех стадиях нейрогенеза: при эмбриональном и взрослом нейрогенезе, при созревании нейронов, при формировании астроцитов, олигодендроцитов и Шванновских клеток [9]. Специфические субъединицы, например, BAF53b необходимы для формирования долговременной памяти [10], а Crest/SS18L1 участвует в корректном образовании дендритов [11, 12].

Одна из субъединиц комплекса подсемейства PBAF, играющая важную роль в нейрогенезе, — PNF10 (BAF45a). На разных стадиях развития головного мозга мыши PNF10 экспрессируется в

виде четырех изоформ, которые отличаются N- и C-концевыми доменами и подвергаются интенсивному фосфорилированию [13]. PNF10 необходим для поддержания пролиферации клеток-предшественников головного мозга на ранних стадиях его развития [11]. В составе комплекса PBAF PNF10 локализуется на промоторах генов сигнальных путей и способствует привлечению РНК-полимеразы II на эти промоторы [14, 15].

В рамках изучения молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов при ДВП на культуре клеток коры головного мозга новорожденных мышей мы установили, что PNF10 взаимодействует с активатором транскрипции *c-FOS*, а также изучили динамику экспрессии и локализации белков *c-FOS* и PNF10 в стимулированных KCl нейрональных культурах. Показано, что в отсутствие стимуляции PNF10 экспрессируется и локализуется в ядрах дифференцированной нейрональной культуры. Экспрессия *c-FOS* начинается после стимуляции ДВП с помощью KCl. Через 1 ч после стимуляции *c-FOS* и PNF10 локализируются в цитоплазме клеток, а через 4 ч снова перемещаются в ядро. Необычное изменение локализации PNF10 специфично для нейрональных культур.

Мы предполагаем, что PNF10 совместно с *c-FOS* участвует в активации генов вторичного ответа, регулирующих поддержание пластических модификаций и гомеостаз синапса. Экспорт PNF10 из ядра и его быстрое возвращение вместе с *c-FOS* в ядро, возможно, необходимо для быстрой модуляции экспрессии таргетных генов в процессе стимуляции ДВП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Содержание животных. Работа проведена на первичных культурах мозга новорожденных мышей линии C57BL/6. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Получение и культивирование первичной диссоциированной культуры нервных клеток. Предварительно дно чашек обработали поли-*L*-лизинном для лучшей адгезии клеток. Клетки мозга новорожденных мышей диссоциировали, обрабатывая 0.25%-ным трипсином (“Invitrogen”, США) и распределяли по 300000 клеток в чашку. Жизнеспособность нейронов поддерживали в культуральной нейробазальной среде NeurobasalTM

("Invitrogen") в комплексе с биоактивной добавкой 2% B27 ("Invitrogen"), 0.5 мМ глутамином ("Invitrogen") и пенициллином-стрептомицином ("Life Technologies", США) в инкубаторе GALAXY 170S ("New Brunswick Scientific", США) при постоянных условиях (37°C, 100%-ная влажность и 5% CO₂). Половину объема среды заменяли новой каждые 3 дня [16].

Культивирование клеток линии НЕК293Т. В качестве негативного контроля использовали линию клеток эмбриональной почки человека 293Т (НЕК293Т) [17].

Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, "GIBCO", США), содержащей 10% сыворотки FBS ("Sigma", США), 2 мМ добавки GlutaMax-I ("GIBCO") и пенициллин-стрептомицин ("Life Technologies") в инкубаторе GALAXY 170S ("New Brunswick Scientific") при постоянных условиях (37°C, 100%-ная влажность, 5% CO₂).

Для последующего иммуноцитохимического анализа из чашек Петри с клетками удаляли старую среду, промывали клетки PBS (1.7 мМ КН₂РО₄; 5.2 мМ Na₂НРО₄; 150 мМ NaCl), добавляли 0.05% трипсина ("Invitrogen") на 3 мин. Вся среду с клетками помещали в пробирку. Снова центрифугировали в течение 4 мин при 800 об./мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в чистой среде и переносили на покровные стекла, расположенные в чашках Петри.

Клетки НЕК293Т для проведения иммунопреципитации выращивали примерно до 100% монослоя, затем удаляли питательную среду и смывали клетки с чашек Петри, промывали PBS (1.7 мМ КН₂РО₄; 5.2 мМ Na₂НРО₄; 150 мМ NaCl). Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2500 об./мин. После удаления супернатанта клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ НЕРЕС-КОН (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 0.5% NP-40, 0.45 М NaCl, 1 мМ ДТТ и коктейль ингибиторов протеаз (PIC) ("Roche", Швейцария). После получасового лизиса на льду экстракт центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об./мин и температуре 4°C. Затем супернатант разводили тремя объемами буфера, содержащего 10 мМ НЕРЕС-КОН (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, PIC и ДНКазу I ("Thermo Fischer Scientific", США). Разбавленный экстракт повторно центрифугировали (12000 об./мин, 15 мин, 4°C).

Транфекция клеток НЕК293Т. Для временной совместной экспрессии рекомбинантных белков НА-с-FOS и FL-PHF10-PI/SI клетки линии НЕК293Т рассаживали на 60 мм чашки Петри с 50% монослоя. На следующий день к клеткам добавляли смесь ДНК и полиэтиленimina в среде Optimem ("Gibco"). На каждую чашку суммарно

брали 9 мкг плазмид: НА-с-FOS-pcDNA (6 мкг) и одну из FL-PHF10-PI-pcDNA (3 мкг) или FL-PHF10-SI-pcDNA (3 мкг), или контрольной FL-pcDNA-MCS (3 мкг), 20 мкл (20 мкг) полиэтиленimina ("Polysciences", ФРГ) и 450 мкл Optimem. На следующий день среду меняли на свежую, спустя 48 ч после трансфекции клетки собирали для последующей иммунопреципитации. Клетки снимали с помощью версена ("Панэко", Россия), осаждали центрифугированием при 2500 об./мин и лизировали с помощью FLB-буфера (40 мМ Трис-НCl, pH 7.8; 100 мМ NaCl; 2.5 мМ MgCl₂; PIC ("Roche"); PhIC ("Sigma")) на льду. Затем растирали в гомогенизаторе Даунса с пестиком А, центрифугировали в течение 1 мин, супернатант использовали как цитоплазматическую фракцию для последующей иммунопреципитации.

Иммунопреципитация. Иммунопреципитацию проводили с помощью НА-агарозы ("Sigma") или белок А-сефарозы ("Sigma"), предварительно обогащенной антителами к PNF10 (получены ранее в нашей лаборатории [15]).

К сефарозе, связанной с антителами, добавляли суммарный клеточный лизат (2 × 10⁶ клеток), инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. После этого сефарозу последовательно промывали буфером IP500 (25 мМ Трис-НCl (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 10% глицерина, 100 мМ NaCl, 0.1% NP-40) и буфером IP100 (25 мМ Трис-НCl (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 10% глицерина, 100 мМ NaCl, 0.1% NP-40). Белки, специфически связавшиеся с антителами, элюировали нагреванием до 99°C в течение 10 мин в 1/10 объема полного клеточного экстракта SDS-содержащим буфером (50 мМ Трис-НCl (pH 6.8), 10% глицерина, 4% SDS, 4 мМ EDTA, 0.1 М ДТТ, 0.1% бромфенолового синего). Полученные образцы анализировали методом электрофореза в ПААГ.

Стимуляция ДВП. В рамках работы получено 138 культур клеток головного мозга новорожденной мыши. Стимуляцию ДВП в нейронах проводили, добавляя в культуральную среду 50 мМ раствора KCl (3 раза в течение 2 мин в CO₂ инкубаторе), между стимуляциями культуры инкубировали в течение 5 мин в чистой культуральной среде [18].

Иммуноцитохимия. После стимуляции 50 мМ раствором KCl каждую культуру перемещали на лед, чтобы максимально подавить экспрессию генов и другие процессы жизнедеятельности, сразу же отмывали от культуральной среды и фиксировали с помощью 4%-ного параформальдегида в течение 7–10 мин.

После фиксации клетки отмывали 3 раза по 5 мин в однократном растворе PBS (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.4 мМ КН₂РО₄, 4.3 мМ NaH₂РО₄, pH 7.4). Для перфорации плазматической мембраны использовали 0.03%-ный раствор Triton X100 ("Bio-Rad", США) в буфере PBS (5 мин при

комнатной температуре). Для клеток линии НЕК293Т использовали 0.3%-ный раствор Triton X100.

Неспецифическое связывание перед аппликацией антител снижали с помощью инкубации клеток с 3%-ным раствором БСА (“Sigma”) в PBS в течение 30 мин.

Клетки одновременно подвергали реакциям иммуногистохимического окрашивания на белок с-FOS, а также на клеточные ядра с помощью ДНК-специфического маркера DAPI (“Sigma”).

Клетки инкубировали в течение 12–13 ч при температуре 4°C с первичными мышинными антителами к с-FOS (“Invitrogen”) и кроличьими к РНФ10 (получены в нашей лаборатории). Раствор антител готовили в PBS в объеме 300 мкл с добавлением 3% БСА. После инкубации клетки отмывали раствором PBS (3 раза в течение 3–5 мин). После этого проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом: Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse (“Invitrogen”) и Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit (“Invitrogen”).

После инкубации клетки отмывали раствором PBS (3 раза в течение 3–5 мин). Затем ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл в течение 10 мин) и заключали в водную заливочную среду Fluoromount (“Sigma”) на предметных стеклах.

Микроскопия. Флуоресцентную микроскопию образцов выполняли при одной и той же интенсивности возбуждающего света и экспозиции на конфокальном микроскопе Olympus Fluoview 10i. Сначала создавали обзорную карту препарата для навигации путем автоматической сшивки полей зрения объектива $\times 10$. Далее детектировали флуоресцентные метки в интересующих полях зрения (объективы $\times 10$ и $\times 60$) с одновременным получением изображений по методу фазового контраста.

Фотографировали флуоресцентный сигнал красной метки Alexa Fluor 647 в каждом поле зрения, свидетельствующий об экспрессии белка РНФ10, сигнал зеленой метки Alexa Fluor 568, свидетельствующий об экспрессии белка с-FOS, флуоресцентный сигнал голубой метки DAPI, указывающий на общее количество клеточных ядер, а также вид культуры в белом свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

РНФ10 взаимодействует с с-FOS

РНФ10 входит в состав ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ и является коактиватором транскрипции, способствуя привлечению РНК-полимеразы II на целевые гены [15]. Ранее показали, что РНФ10 экспрессируется в пролиферирующих и дифференцированных нейронах в виде нескольких изоформ, играющих разную роль в активации транскрипции [13, 14]. Кроме то-

го, РНФ10 влияет на экспрессию генов многих сигнальных путей, регулируемых факторами транскрипции – продуктами генов раннего ответа, в том числе активатором транскрипции с-FOS [14].

Поэтому изучено взаимодействие эндогенного РНФ10 с активатором транскрипции с-FOS. Экспрессию с-FOS в клетках НЕК293Т индуцировали путем обработки форболовым эфиром (РМА) в течение 2 ч. Далее с помощью антител к РНФ10 проводили коиммунопреципитацию белков из экстракта клеток. Осажденные белки разделяли в SDS-ПААГ с последующим вестерн-блоттингом, мембрану окрашивали антителами к с-FOS и РНФ10.

Полученные данные показывают, что уровень изоформ РНФ10 в клетках не меняется после обработки РМА (рис. 1а, верхняя панель, inputs). Как и ранее в наших работах [13, 15, 19–21], РНФ10 был представлен несколькими полосами, соответствующими различным изоформам с разной степенью фосфорилирования. При иммунопреципитации практически весь РНФ10 осаждался антителами (рис. 1а, верхняя панель).

Обработка РМА индуцирует экспрессию с-FOS в клетках НЕК293Т (рис. 1а, нижняя панель, inputs). При этом с-FOS соосаждается антителами к РНФ10 (рис. 1а, нижняя панель). Некоторая размытость полосы, соответствующей с-FOS (рис. 1а), связана с тем, что подвижность с-FOS в ПААГ примерно совпадает с подвижностью антител.

Прямое взаимодействие между транскрипционным активатором с-FOS и РНФ10 подтвердили путем совместной экспрессии рекомбинантного белка НА-с-FOS и изоформ FI-РНФ10-PI (FI-PI) или FI-РНФ10-SI (FI-SI) с последующим осаждением НА-с-FOS из цитоплазматической фракции клеток НЕК293Т на НА-агарозу. Как показано нами ранее, рекомбинантные изоформы FI-РНФ10i при сверхэкспрессии частично локализуются в цитоплазме в несвязанном с комплексом РВАФ состоянии [20]. После осаждения на НА-агарозу изоформы FI-РНФ10-PI/SI выявили с помощью вестерн-блоттинга во фракциях, в которых экспрессируется также НА-с-FOS (рис. 1б). В контрольных фракциях НА-с-FOS и FI-РНФ10-SI (FI-SI) неспецифический сигнал не наблюдали.

Таким образом, РНФ10, субъединица ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ, взаимодействующая с активатором с-FOS и РНФ10, может участвовать в активации транскрипции с-FOS-зависимых генов.

При стимуляции ДВП в нейрональных культурах РНФ10 перемещается из ядра в цитоплазму, а затем транслоцируется в ядро вместе с с-FOS

На первой стадии ДВП наблюдается первичная однократная стимуляция нейронов и кратко-

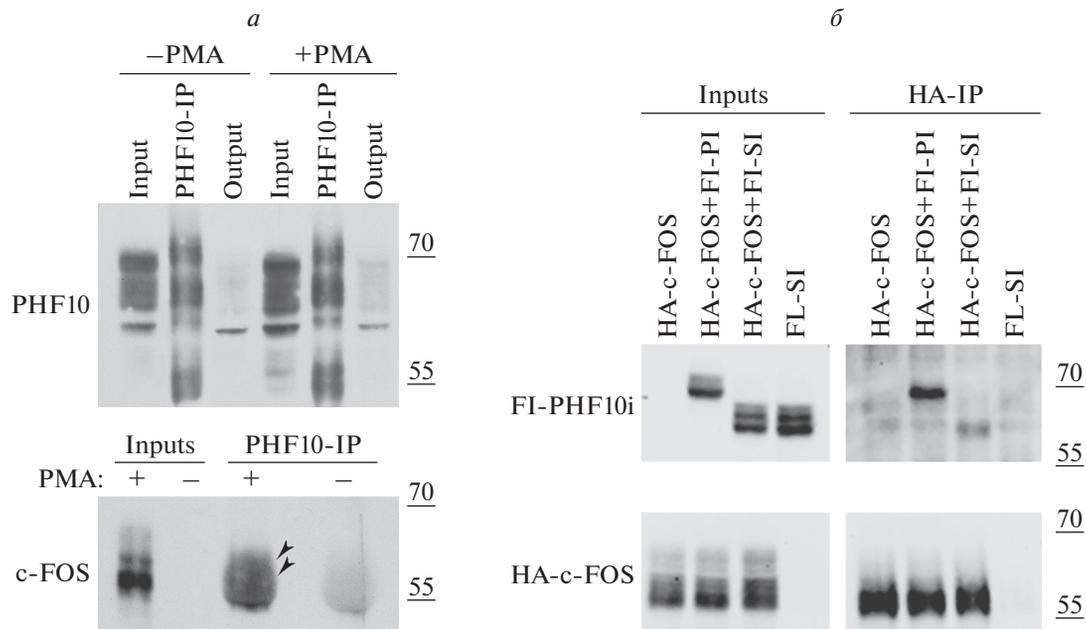


Рис. 1. *a* – Коиммунопреципитация с-FOS из лизата клеток HEK293T с помощью антител к PHF10. Верхняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к PHF10. Нижняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к с-FOS. PHF10-IP – осаждение антителами к PHF10, output – истощенный антителами лизат после осаждения. Стрелками показаны формы с-FOS, которые копреципитируются антителами к PHF10. *б* – Коиммунопреципитация FI-PHF10i/PI/SI (две изоформы PHF10 – FI-PI и FI-SI) из лизата клеток HEK293T при совместной экспрессии с HA-c-FOS с помощью антител к HA-эпиту. Верхняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к Flag-эпиту. Нижняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к HA-эпиту. HA-c-FOS и FI-PHF10-SI (FI-SI) использованы в качестве контроля неспецифического осаждения на HA-агарозу. HA-IP – осаждение HA-c-FOS-антителами к HA-эпиту. Input – исходный клеточный лизат. Справа указаны молекулярные массы (55 и 70 кДа) маркерных белков.

временная экспрессия генов, ответственных за возникновение синапсов при последующей долговременной стимуляции. *c-Fos* – это ген раннего ответа, и белок с-FOS начинает транслироваться в цитоплазме нейронов в ответ на стимуляцию ДВП через 30–90 мин [3]. При определенных стимулах с-FOS может локализоваться не только в ядре, но и в цитоплазме и дендритах нейронов, например клеток Пуркинью [22]. Ранее мы обнаруживали и ядерную, и цитоплазматическую локализацию PHF10 в клетках [15]. Быстрое изменение локализации транскрипционных факторов – транспорт из цитоплазмы в ядро или из ядра в цитоплазму с возможной последующей деградацией или возвращением в ядро, может быть одним из вариантов регуляции экспрессии генов.

Мы предположили, что взаимодействие с-FOS и PHF10 может обуславливать их одновременное перемещение между ядром и цитоплазмой нейрона. На культуре клеток головного мозга новорожденных мышей изучена динамика экспрессии и локализации белков с-FOS и PHF10 при стимуляции ДВП с помощью KCl. Первичные нервные клетки после выделения культивировали в течение 22 дней до достижения состояния зрелых нейронов. Далее для индукции ДВП культуру обрабатывали 50 мМ KCl и последовательно фикси-

ровали с промежутком 1 ч в течение 6 ч. Иммуноокрашивание клеток антителами, специфически узнающими с-FOS, показало, что с-FOS появляется в нейрональных клетках через 1 ч после стимуляции ДВП. Первоначально с-FOS локализуется в цитоплазме, затем постепенно транслоцируется в ядро и через 5–6 ч после индукции становится полностью ядерным (рис. 2).

Интересно, что PHF10 присутствует в ядрах нейрональных клеток до индукции ДВП. Однако через 1 ч после индукции локализация PHF10 меняется на цитоплазматическую (рис. 2).

Далее локализация PHF10 и с-FOS совпадает: через 4 ч PHF10 вместе с с-FOS перемещается обратно в ядро. Полностью PHF10 и с-FOS находились в ядрах через 5 ч после обработки нейрональной культуры KCl (рис. 2).

Таким образом, с-FOS начинает интенсивно экспрессироваться в ответ на стимуляцию нейрональных культур KCl и в течение 5 ч транслоцируется из цитоплазмы в ядро. PHF10 после стимуляции KCl быстро (в течение 1 ч) перемещается в цитоплазму, но затем через 5 ч возвращается вместе с с-FOS в ядро.

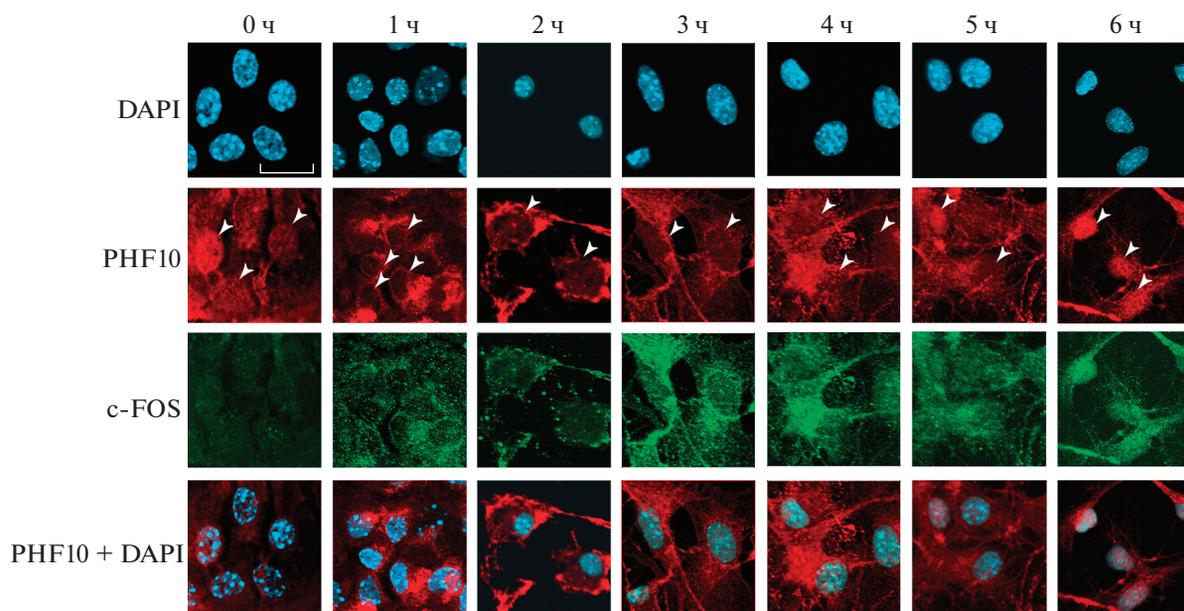


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ экспрессии и локализации транскрипционных активаторов PHF10 и c-FOS в первичных диссоциированных нейрональных культурах в ответ на стимуляцию 50 мМ KCl. Белыми стрелками обозначены ядра (иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к PHF10). Белая шкала в секторе DAPI, 0 ч обозначает масштаб, равный 20 мкм. PHF10 + DAPI – наложение двух каналов – PHF10 и DAPI.

Изменение локализации PHF10 при стимуляции KCl специфично для нейрональной культуры

Явление ДВП, наблюдаемое в первичных диссоциированных нейрональных культурах в ответ на стимуляцию KCl, специфично для зрелых нейронов. Мы выявили изменение локализации транскрипционного коактиватора PHF10 в этих культурах и проверили специфичность этого свойства для нейронов. В качестве контроля использовали культуру клеток НЕК293Т, в которой PHF10 экспрессируется на высоком уровне.

Клетки НЕК293Т высаживали на стекла, обрабатывали KCl и фиксировали с такими же временными промежутками (в течение 6 ч с интервалом 1 ч). Мы выполнили окрашивание PHF10 антителами и выявили постоянную интенсивную локализацию PHF10 в ядре в каждой временной точке после обработки KCl (рис. 3). Ядерная локализация PHF10 не изменялась в ответ на стимуляцию клеток НЕК293Т с помощью KCl.

Таким образом, изменения локализации PHF10 специфичны для нейрональных культур. Быстрая транслокация PHF10 из ядра в цитоплазму и последующая колокализация с c-FOS может быть связана с особенностями регуляции экспрессии генов в ответ на стимуляцию ДВП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Транскрипционный фактор c-FOS является сильным активатором транскрипции. В частно-

сти, c-FOS активирует гены пролиферации, нейропластичности и гены ответа на стресс. В процессах активации генов важную роль играют также коактиваторные комплексы – ремоделеры хроматина. В частности, ремоделирующий хроматин комплекс PBAF важен для пролиферации и дифференцировки нейрональных клеток головного мозга млекопитающих [13–15]. Мы показали, что c-FOS взаимодействует с одной из специфических субъединиц комплекса PBAF – PHF10, которая отвечает за связывание комплекса с хроматином на регуляторных областях гена и за привлечение на промотор РНК-полимеразы II [15].

Транскрипция гена *FOS* характерна для недавно активированных нейронов и необходима для ДВП – усиления синаптической передачи сигнала между нейронами, сохраняющейся на протяжении длительного времени [23]. На срезах коры головного мозга крысы показано, что максимальная экспрессия c-FOS наблюдается через 1.5 ч после стимуляции [24]. А на срезах гиппокампа мыши установлено, что экспрессия c-FOS максимальна через 2 ч после стимуляции нейронов [25]. В наших экспериментах, выполненных на первичной нейрональной культуре, максимальный уровень экспрессии c-FOS наблюдали через 3 ч, а максимальную концентрацию c-FOS в ядре – через 5–6 ч. Возможно, это связано с недостаточной дифференцировкой первичной культуры нейрональных клеток, культивированных на чашках.

Также мы изучили изменение локализации PHF10. Белок PHF10, самый нестабильный из

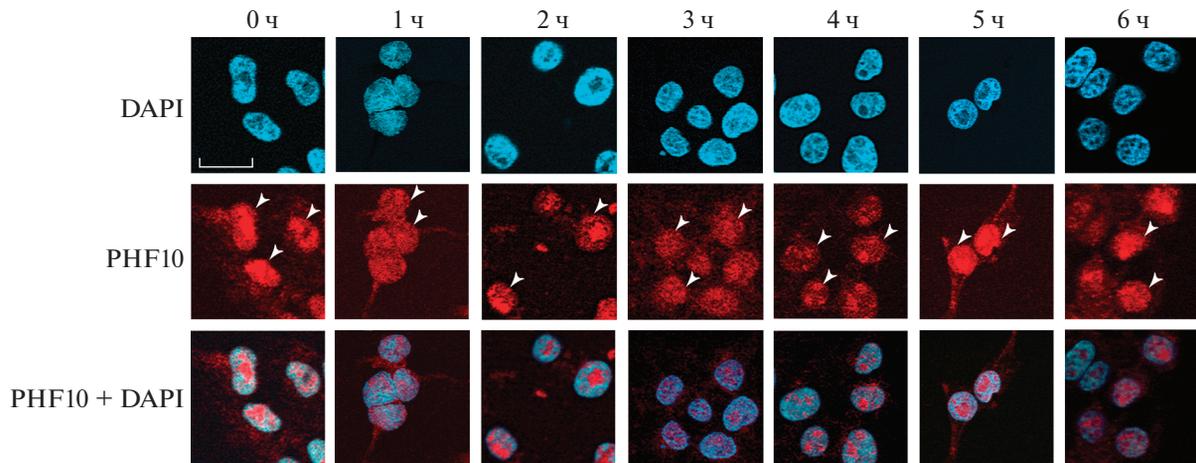


Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии и локализации PHF10 в клетках HEK293T в ответ на стимуляцию 50 мМ KCl. Белыми стрелочками обозначены ядра (иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к PHF10). Белая шкала в секторе DAPI 0 ч обозначает масштаб, равный 20 мкм. PHF10 + DAPI – наложение двух каналов – PHF10 и DAPI.

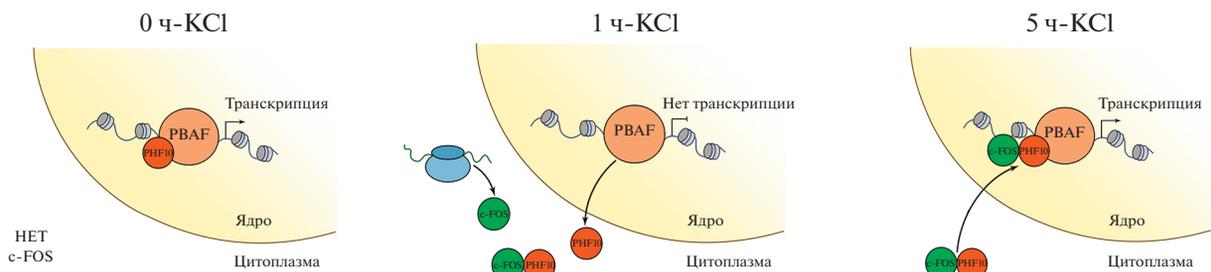


Рис. 4. Схема экспрессии и транслокации с-FOS и PHF10 в нейрональных клетках в ответ на стимуляцию ДВП с помощью KCl. До стимуляции PHF10 в составе комплекса PBAF находится в ядре, отвечая за транскрипцию некоторого набора генов (0ч-KCl). Через 1 ч после стимуляции в цитоплазме начинает экспрессироваться с-FOS, а PHF10 транслоцируется из ядра в цитоплазму. Предполагается, что экспрессия целевых генов прекращается. PHF10 взаимодействует с с-FOS (1ч-KCl). Через 5 ч после стимуляции с-FOS и PHF10 локализируются в ядре, стимулируя транскрипцию других генов – генов вторичного ответа, активируемых с-FOS (5ч-KCl). 0ч-KCl, 1ч-KCl, 5ч-KCl – время с момента обработки KCl нейрональных клеток – до обработки, 1 и 5 ч соответственно.

всех субъединиц PBAF, сильно фосфорилирован и частично локализуется в цитоплазме клеток [20]. Обычно белки, обладающие этими свойствами, интенсивно регулируются в ответ на внешние стимулы и сами действуют как активаторы различных транскрипционных процессов. Быстрая транслокация транскрипционного фактора из ядра в цитоплазму – еще один способ регуляции транскрипции. Например, FOXO1 в ответ на стимуляцию IGF-1 фосфорилируется киназой Akt1 и экспортируется из ядра. При этом активируются многие гены фазы G1/S клеточного цикла [26]. Еще один пример – онкосупрессор Rb, который при обработке миофибрилл скелетных мышц человека TNF-α фосфорилируется киназой CDK4 и также уходит из ядра, что приводит к снятию репрессии генов, отвечающих за пролиферацию клеток [27].

В ответ на обработку клеток KCl PHF10 быстро перемещается из ядра в цитоплазму, что может приводить к ингибированию ряда генов, активно транскрибирующихся и ремоделирующихся комплексом PBAF. Однако затем вместе с с-FOS, активатором PHF10, возвращается в ядро, что ведет к активации паттернов других генов, ответственных за синаптогенез и формирование пластичности нервной ткани. Возможно также, что с-FOS, взаимодействует с PHF10 в цитоплазме, и PHF10 способствует его транслокации в ядро на целевые сайты хроматина для последующей активации специфических генов (рис. 4).

Таким образом, изменение локализации PHF10 и его колокализация с активатором с-FOS может регулировать изменение паттернов экспрессирующихся генов в ответ на стимуляцию ДВП.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (18-14-00303), выданному Н.В. Сошниковой.

Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативам, указанным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ghosh A., Ginty D.D., Bading H., Greenberg M.E. (1994) Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J. Neurobiol.* **25**, 294–303.
- Mermelstein P.G., Bito H., Deisseroth K., Tsien R.W. (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J. Neurosci.* **20**, 266–273.
- Fleck M.W., Palmer A.M., Barrionuevo G. (1992) Potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* **580**, 100–105.
- Minatohara K., Akiyoshi M., Okuno H. (2016) Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 243. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>
- Gallo F.T., Kathe C., Morici J.F., Medina J.H., Weisstaub N.V. (2018) Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on *c-Fos*, *Egr1* and *Arc*. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 79.
- Sheng M., Greenberg M.E. (1990) The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* **4**, 477–485.
- Oma Y., Harata M. (2011) Actin-related proteins localized in the nucleus. *Nucleus.* **2**, 38–46.
- Li X., Wang W., Wang J., Malovannaya A., Xi Y., Li W., Guerra R., Hawke D.H., Qin J., Chen J. (2015) Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Mol. Syst. Biol.* **11**, 775.
- Sokpor G., Xie Y., Rosenbusch J., Tuoc T. (2017) Chromatin remodeling BAF (SWI/SNF) complexes in neural development and disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 78.
- Vogel-Ciernia A., Matheos D.P., Barrett R.M., Kramár E.A., Azzawi S., Chen Y., Magnan C.N., Zeller M., Sylvain A., Haettig J., Jia Y., Tran A., Dang R., Post R.J., Chabrier M., Babayan A.H., Wu J.I., Crabtree G.R., Baldi P., Baram T.Z., Lynch G., Wood M.A. (2013) The neuron-specific chromatin regulatory subunit BAF53b is necessary for synaptic plasticity and memory. *Nat. Neurosci.* **16**, 552–561.
- Qiu Z., Ghosh A. (2008) A calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron.* **60**, 775–787.
- Staaht B.T., Tang J., Wu W., Sun A., Gitler A.D., Yoo A.S., Crabtree G.R. (2013) Kinetic analysis of nPBAF to nBAF switching reveals exchange of SS18 with CREST and integration with neural developmental pathways. *J. Neurosci.* **33**, 10348–10361.
- Азиева А.М., Шейнов А.А., Галкин Ф.А., Георгиева С.Г., Сошникова Н.В. (2018). Влияние фосфорилирования субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса PBAF на их стабильность в головном мозге мыши. *ДАН.* **479**, 212–215.
- Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., Wan M., Winslow M.M., Staaht B.T., Wu H., Aebersold R., Graef I.A., Crabtree G.R. (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron.* **55**, 201–215.
- Brechalov A.V., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. (2014) Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit. *Cell Cycle.* **13**, 1970–1979.
- Sokolov I., Azieva A., Burtsev M. (2016) Patterns of spiking activity of neuronal networks *in vitro* as memory traces. In: *Advances in Intelligent Systems and Computing. Biologically Inspired Cognitive Architectures (BICA) for Young Scientists*. Cham Springer Internat. Publ., 241–247.
- Stepanenko A.A., Dmitrenko V.V. (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene.* **569**, 182–190.
- Schoenenberger P., Gerosa D., Oertner T.G. (2009) Temporal control of immediate early gene induction by light. *PLoS One.* **4**, e8185.
- Бречалов А.В., Валиева М.Е., Георгиева С.Г., Сошникова Н.В. (2016) Изоформы белка PHF10 подвергаются фосфорилированию в составе ремоделирующего хроматин комплекса PBAF млекопитающих. *Молекуляр. биология.* **50**(2), 320–326.
- Tatarskiy V.V., Simonov Y.P., Shcherbinin D.S., Brechalov A.V., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. (2017) Stability of the PHF10 subunit of PBAF signature module is regulated by phosphorylation: role of β -TrCP. *Sci. Rep.* **7**, 5645.
- Sheynov A., Feoktistov A., Georgieva S., Soshnikova N. (2019) AKT kinase phosphorylates PHF10, a subunit of PBAF chromatin remodeling complex. *FEBS Open Bio.* **9**, 124.
- Tian J.B., Bishop G.A. (2002) Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum. *J. Chem. Neuroanat.* **23**, 157–170.
- Flavell S.W., Greenberg M.E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 563–590.
- Chaudhuri A., Zangenehpour S., Rahbar-Dehgan F., Ye F. (2000) Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **60**, 403–410.
- Gandolfi D., Cerri S., Mapelli J., Polimeni M., Tritto S., Fuzzati-Armentero M.-T., Bigiani A., Blandini F., Mapelli L., D’Angelo E. (2017) Activation of the CREB/c-Fos pathway during long-term synaptic plasticity in the cerebellum granular layer. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 184.

26. Schachter T.N., Shen T., Liu Y., Schneider M.F. (2012) Kinetics of nuclear-cytoplasmic translocation of Foxo1 and Foxo3A in adult skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **303**, C977–C990.
27. Araki K., Kawauchi K., Hirata H., Yamamoto M., Taya Y. (2013) Cytoplasmic translocation of the retinoblastoma protein disrupts sarcomeric organization. *eLife*. **2**, e01228.

PHF10, A SUBUNIT OF THE PBAF CHROMATIN REMODELING COMPLEX, CHANGES ITS LOCALIZATION AND INTERACTS WITH c-FOS DURING THE INITIATION OF LONG-TERM POTENTIATION IN THE NEURONAL CULTURE

A. M. Azieva^{1, 2, *}, A. A. Sheynov¹, D. A. Kirillova², E. V. Tatarskiy¹, S. G. Georgieva^{1, 3}, and N. V. Soshnikova¹

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

² National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: so2615nat@gmail.com

The chromatin-remodeling complex PBAF interacts with many transcriptional activators and is recruited to the target chromatin regions. PBAF plays an important role in maintaining and modifying chromatin structure in mammalian cells. Transcription factor PHF10, a subunit of the PBAF complex, is required for the proliferation of neuronal progenitors during early stages of mouse brain development and gene expression in differentiated neurons. We have shown that PHF10 interacts with the protein c-FOS, a protein of the early response gene *c-fos*. The c-FOS is transcriptional activator, which is expressed in response to induction of long-term potentiation (LTP). LTP induction triggers the transcription of genes with following proteins synthesis that provide neuronal changes leading to long-term contacts between neurons. We have shown that after LTP induction, c-FOS is initially localized in the cytoplasm and then moves to the nucleus in cells of a differentiated neuronal culture. Before LTP induction PHF10 is expressed in nucleus of neuronal cells. However, 1 h after induction, PHF10 is detected in the cytoplasm together with c-FOS, and then both of them move into the nucleus. Importantly, this behavior of PHF10 in response to KCl stimulation is specific for neuronal cultures. It is assumed that during LTP, PHF10, together with c-FOS, participates in the activation of secondary response genes that regulate the maintenance of plastic modifications and homeostasis of neuronal synapses. The export of PHF10 from the nucleus and its rapid return together with c-FOS to the nucleus are possibly necessary for the rapid modulation of the expression of targeted secondary response genes during LTP.

Keywords: PHF10, PBAF, c-FOS, neuronal cultures, long-term potentiation