

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623268>

«Временные окна» для переключения киназно-фосфатазного баланса во время угнетения долговременной потенциации гиппокампальных синапсов амилоидными агрегатами

А.В. Мальцев*, П.М. Балабан

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Фосфорилирование таргетных белков, осуществляемое протеинкиназами, так же, как и обратный ему процесс дефосфорилирования, опосредуемый фосфатазами, являются важнейшими механизмами регуляции всех клеточных функций в живых клетках. Изменения киназно-фосфатазного баланса (К-Ф баланс) во время прогрессии амилоидозов хорошо известно. В действительности, гиперфосфорилирование структурного тау-белка, ответственное за формирование фибриллярных клубочков по сути представляет собой гиперактивацию каких-либо протеинкиназ и/или сниженную активность каких-либо фосфатаз. Накопленные к настоящему времени данные показывают двунаправленную регуляцию процессов фосфорилирования/дефосфорилирования во время развития амилоидоз-связанных состояний у разных моделей животных в разных исследовательских протоколах. Поэтому чрезвычайно важной задачей представляется идентификация «временных окон», в которых К-Ф баланс может переключаться.

Полевые постсинаптические потенциалы (фПСП) были записаны от *stratum radiatum* в CA1 поле гиппокампа с использованием стеклянных микроэлектродов (1–2 МΩ), заполненных регистрирующим раствором. Базальные синаптические ответы вызывались парной стимуляцией с 50 мс интервалом коллатералей Шафера биполярным электродом на частоте 0,033 Гц. Интенсивность тестовой стимуляции была такой, чтобы вызывать фПСП амплитудой 50% от максимальной, и сохранялась на протяжении каждого эксперимента. ДВП вызывалось четырьмя 100 Гц пачками через каждые 5 минут (тетаническая стимуляция). Серин/треониновая фосфатазная активность была измерена с помощью нерадиоактивного индивидуального комплекта (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя. Методика основана на формировании окрашенного комплекса фосфатов с молибденсодержащим красителем, с последующим измерением оптической плотности инкубированных супернатантов против контроля на 640 нм. Прямое измерение активности протеинкиназы С (ПКС) было проведено иммуноферментным анализом на планшетном ридере с помощью коммерческого набора (Abscam, США). Методика основана на связывании рекомбинантных антител с активированной ПКС и измерении оптической плотности инкубированных супернатантов против контроля на 450 нм.

В данной работе мы обнаружили два критических «временных окна» при действии агрегатов амилоидного пептида $A\beta_{25-35}$ на пластичность CA3-CA1 синапсов в срезах гиппокампа крыс. В течение старта $A\beta_{25-35}$ -вызванных нейрхимических изменений (0–20 минут инкубации срезов в присутствии агрегатов $A\beta_{25-35}$) происходит активация изоформ ПКС. Если гиппокампальные CA3-CA1 синапсы тетанизовать в этот момент, в дальнейшем не обнаруживается никакого ингибирования долговременной потенциации ни в ранней, ни в поздней фазе её развития. Биохимический анализ показывает индукции ПКС активности в срезах, предобработанных агрегатами $A\beta_{25-35}$ в течение 20–30 минут, но не после часовой инкубации. В то же время инкубация гиппокампальных срезов в присутствии $A\beta_{25-35}$ агрегатов в течение часа всегда приводила к исчезновению долговременной потенциации в поздней фазе её развития (спустя 3 часа после индукции тетануса). Ингибиторный анализ показал, что сильное увеличение активности стресс-индуцируемой фосфатазы 1 α (PP1 α), которая интерферирует киназо-опосредуемые сигналы после индукции долговременной потенциации, ответственно за подавление синаптической пластичности в CA3-CA1 синапсов после инкубации с агрегатами $A\beta_{25-35}$. Совместно, эти данные указывают на то, что после 20–30-минутной инкубации срезов гиппокампа в присутствии агрегатов $A\beta_{25-35}$ киназно-фосфатазный баланс смещается в сторону усиления киназной активности за счёт активации изоформ ПКС. Большинство изоформ ПКС характеризуются способностью десенситизироваться после активации. Вероятно, истощение пула неактивированных ПКС, которое случается в течение 20–30 минут после старта инкубации срезов гиппокампа с агрегатами $A\beta_{25-35}$, а также существенное увеличение активности стресс-индуцируемой фосфатазы PP1 α ответственны за второе «временное окно» переключения киназно-фосфатазного баланса в CA3-CA1 синапсах, которое стабильно детектируется после 60-минутной инкубации срезов с агрегатами $A\beta_{25-35}$.

Рукопись получена: 29.03.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

Таким образом, инкубация срезов гиппокампа в присутствии агрегатов $A\beta_{25-35}$ (0–30 минут) сначала смещает К-Ф баланс в сторону усиления киназной активности за счёт активации ПКС, а через 60 минут после старта инкубации срезов с амилоидом наблюдается переключение К-Ф баланса в сторону процессов дефосфорилирования за счёт активации стресс-индуцируемой PP1 α и, по-видимому, за счёт истощения пула неактивированных ПКС изоформ.

Ключевые слова: гиппокамп; долговременная потенция; серин/треониновые киназы; фосфатазы; амилоидные агрегаты; синаптическая пластичность.

Как цитировать:

Мальцев А.В., Балабан П.М. «Временные окна» для переключения киназно-фосфатазного баланса во время угнетения долговременной потенции гиппокампальных синапсов амилоидными агрегатами // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 713–715. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623268>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* А.В. Мальцев; адрес: Российская Федерация, 117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А; e-mail: malat_88@mail.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623268>

“Time windows” for switching kinase-phosphatase balance during inhibition of long-term potentiation of hippocampal synapses by amyloid aggregates

A.V. Maltsev*, P.M. Balaban

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Phosphorylation and dephosphorylation of target proteins are crucial mechanisms for regulating cellular functions. These processes are mediated by protein kinases and phosphatases, respectively. Changes in the kinase-phosphatase balance, known as K-P balance, are well documented during the progression of amyloidosis. The overactivation of kinases or the failed activity of phosphatases is the root cause of hyperphosphorylation of the structural tau protein leading to the formation of fibrillar tangles. The data suggests bidirectional regulation of phosphorylation/dephosphorylation processes during amyloidosis-related states is consistent across different animal models and many protocols. Therefore, it is crucial to identify the “time windows” during which the K-P balance can be altered.

Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded from the *stratum radiatum* located in area CA1. Baseline synaptic responses were generated by paired-pulse stimulation of the Schaffer collaterals at a frequency of 0.033 Hz using a bipolar electrode. Four 100 Hz trains were delivered 5 minutes apart to induce long-term potentiation (LTP). Serine and threonine phosphatase activity was assessed using a non-radioactive molybdate dye-based assay kit (Promega, USA) based on the manufacturer’s instructions. The procedure relies on the creation of a colored complex of phosphates with a dye containing molybdenum, followed by the measurement of optical densities of supernatants that were incubated against a control at 640 nm. The activity of protein kinase C (PKC) will be measured directly via an enzyme immunoassay (ELISA) on a plate reader, using a commercial Abcam kit (Abcam, USA). The technique relies on the binding of engineered antibodies to activated PKC, and optical densities of incubated supernatants are measured against a control at 450 nm.

In this study, we identified two important time periods during the application of amyloid $A\beta_{25-35}$ aggregates that affect plasticity in the CA3-CA1 synapses. Specifically, the PKC isoforms are activated during early neurochemical events (0–20 min of incubation of slices in the presence of $A\beta_{25-35}$ aggregates). If the hippocampal CA3-CA1 synapses are tetanized during this period, we did not observe any inhibition of synaptic plasticity either in the early or late phase development of LTP. Biochemical analysis indicates that hippocampal slices pretreated with $A\beta_{25-35}$ aggregates for 20–30 minutes exhibit increased PKC activity, whereas no such effect is observed after one hour of incubation. Simultaneously, the hour-long incubation of hippocampal slices in the presence of $A\beta_{25-35}$ aggregates resulted in the disappearance of long-term potentiation and the return of responses to the pre-tetanic level of synaptic transmission during the late-LTP phase (3 hours after tetanus induction). Inhibitory analysis revealed that an abrupt rise in the activity of stress-induced phosphatase 1 α (PP1 α) interrupts kinase-mediated signals after LTP induction, leading to the suppression of fEPSPs in the CA3-CA1 synapses. These findings suggest that exposing hippocampal slices to $A\beta_{25-35}$ aggregates for 20–30 minutes may alter the K-P balance and enhance kinase activity through PKC isoform induction. The majority of PKC isoforms exhibit a tendency to desensitize following activation. Probably, the depletion of the pool of PKCs, which occurs within the first 20–30 minutes after incubation of hippocampal slices with $A\beta_{25-35}$ aggregates, along with a notable elevation in the activity of stress-induced phosphatase PP1 α , is accountable for the second time window for switching the kinase-phosphatase balance, stabilized after an hour of incubation of hippocampal slices in the presence of $A\beta_{25-35}$ aggregates.

Incubating hippocampal slices with $A\beta_{25-35}$ aggregates (for 0–30 minutes) leads to a shift in the kinase-phosphatase balance towards the activity of kinases due to the activation of PKC isoforms. After this stage, there is a significant rise in phosphatase activity, resulting from the induction of PP1 α . This induces a shift in the balance between kinase and phosphatase towards dephosphorylation processes.

Keywords: hippocampus; long-term potentiation; serine/threonine protein kinases; phosphatases; amyloid aggregates; synaptic plasticity.

To cite this article:

Maltsev AV, Balaban PM. “Time windows” for switching kinase-phosphatase balance during inhibition of long-term potentiation of hippocampal synapses by amyloid aggregates. *Genes & Cells*. 2023;18(4):713–715. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623268>

AUTHORS’ CONTACT INFO

* A.V. Maltsev; address: 5A Butlerov street, 117485 Moscow, Russian Federation; e-mail: malat_88@mail.ru

Received: 29.03.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024