

Сухарева Екатерина Викторовна

**ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ
КЛЮЧЕВОГО ФЕРМЕНТА СИНТЕЗА КАТЕХОЛАМИНОВ -
ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ МОЗГА КРЫС
В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

03.03.01 - физиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в лаборатории функциональной нейрогеномики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск).

Научный руководитель – Татьяна Сергеевна Калинина, доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск)

Официальные оппоненты: Алевтина Юрьевна Гришанова, доктор биологических наук, заведующая лабораторией биохимии чужеродных соединений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» (НИИМББ, г. Новосибирск)

Татьяна Викторовна Липина, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальных моделей патологии когнитивной деятельности Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (НИИФФМ, г. Новосибирск)

Ведущая организация – ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН, г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.014.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4, тел. (383)335-98-01, факс (383)335-97-54, эл. почта: dissovet@physiol.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИФФМ» и на сайте <http://www.physiol.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

В.Н. Мельников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Неблагоприятные условия протекания перинатального онтогенеза вызывают долговременные, и даже постоянные изменения нейрохимических систем мозга и регулируемых ими разных форм поведения (Harris, Seckl, 2011; Entringer, Wadhwa, 2013; Barella et al., 2014). Однако механизмы «онтогенетического программирования» (Barker, 1998; Li et al., 2012) остаются во многом неясными. Ключевая роль в программировании функций взрослого организма принадлежит глюкокортикоидам, уровень которых повышается при стрессе или гормональной терапии (Moisiadis, Matthews, 2014). Глюкокортикоиды, безусловно, необходимы для нормального формирования физиологических функций (Reynolds, 2013), полноценных связей между нейронами (Harris, Seckl, 2011), развития нейромедиаторных систем (Wyrwoll, Holmes, 2012) и сурфактанта (Fowden et al., 1998). Вместе с тем их избыток в критический период перинатального развития нарушает ход нормального онтогенеза, вызывая перманентное репрограммирование физиологических систем, прежде всего связанных с реакцией на стресс, кардио-метаболическим статусом, иммунным ответом, изменением нейромедиаторных систем, аффективными расстройствами (Harris, Seckl, 2011; Li et al., 2012; de Kloet et al., 2014).

Свое действие глюкокортикоиды реализуют через изменение экспрессии гормон-зависимых генов. Классический механизм действия гормонов осуществляется через собственные рецепторы (GR), которые являясь транскрипционными факторами, взаимодействуют со специфическими гормон-отвечающими элементами (GRE) генома (So et al., 2008; Surjit et al., 2011; Hudson et al., 2013). Однако среди генов, меняющих свою экспрессию под действием глюкокортикоидов, имеются и гены, не имеющие GRE. В этом случае возможен неканонический механизм действия гормонов – в результате взаимодействия с другими транскрипционными факторами (Sapolsky et al., 2000; Kassel, Herrlich, 2007; Ratman et al., 2013). Одним из таких факторов является AP-1 комплекс, который образуется взаимодействием гомодимеров белков Jun или гетеродимеров Jun/Fos с гептамерной консенсусной последовательностью промоторов многих генов (Reddy, Mossman, 2002; Eferl, Wagner, 2003). Известно, что при взаимодействии GR с гомодимером Jun/Jun AP-1 комплекса глюкокортикоиды активируют, а при взаимодействии с гетеродимером Jun/Fos, напротив, подавляют транскрипцию генов (Kassel et al., 2001; Healy et al., 2013). Неканонический механизм расширяет список генов, регулируемых глюкокортикоидами, но не имеющих в своих промоторах гормон-зависимых элементов. Одним из таких генов может быть ген ключевого фермента синтеза катехоламинов – тирозингидроксилаза (ТГ) (Kvetnansky et al., 2009).

Ген ТГ является потенциальной мишенью программирующего действия глюкокортикоидов. Экспрессия гена ТГ в мозге 20-21-дневных плодов крыс повышается уже через 6 часов после введения гормонов, что сопровождается

увеличением *in vitro* и *in vivo* активности фермента, а также повышением уровня норадреналина (Kalinina et al., 2012). Изменение активности ТГ после введения гормона во время беременности сохраняется и в мозге взрослых животных (Калинина, Дыгало, 2013). Аналогичное гормональное воздействие на 8 день жизни не приводит к каким-либо изменениям экспрессии гена фермента (Kalinina et al., 2012). Зависимость проявления индуцирующего действия гормона от возраста предполагает вовлечение дополнительных регуляторных факторов. Поскольку промотор гена ТГ не имеет функционально-активных глюкокортикоид-отвечающих элементов (Kvetnansky et al., 2009), действие гормона может быть обусловлено неканоническим механизмом взаимодействия GR с белками AP-1 комплекса (Kassel, Herrlich, 2007). В этом случае возможность глюкокортикоидов менять экспрессию ТГ будет определяться соотношением белков Jun/Fos в мозге животных разного возраста. Промотор гена ТГ содержит два AP-1 элемента, один из которых вовлечен в гормональную индукцию гена в культуре феохромоцитомы (Rani et al., 2009). Функционирование неканонического механизма действия глюкокортикоидов *in vivo* в раннем онтогенезе не установлено.

Поскольку изменение гормоном экспрессии ТГ и других генов, лишенных GRE, за счет белок-белкового взаимодействия GR с AP-1 транскрипционным фактором, может быть возможным путем их вовлечения в глюкокортикоид-зависимое «онтогенетическое программирование», то планируемый в работе анализ до сих пор неясного функционирования этого механизма в критические сроки формирования мозга представляется крайне необходимым.

Целью работы явилось выявление роли белков транскрипционного комплекса AP-1 в регуляции глюкокортикоидами экспрессии ключевого фермента синтеза катехоламинов - тирозингидроксилазы (ТГ) в головном мозге крыс в раннем онтогенезе.

Задачи:

1. Определить соотношение базальной экспрессии генов и белков AP-1 транскрипционного комплекса: Jun (c-Jun, JunB, JunD) и Fos (c-Fos, FosB) в стволе головного мозга в перинатальном онтогенезе для выявления особенностей этого соотношения в период зависимости экспрессии гена ТГ от глюкокортикоидов, а также для оценки наличия подобного «гормон-чувствительного» соотношения Jun/Fos в раннем постнатальном периоде развития.

2. В случае обнаружения потенциального «гормон-чувствительного» соотношения Jun/Fos в раннем постнатальном периоде развития, в срок его проявления исследовать эффекты глюкокортикоида дексаметазона на экспрессию белков AP-1 транскрипционного комплекса (c-Fos и c-Jun) в отделах неонатального головного мозга.

3. Оценить взаимодействие белков AP-1 транскрипционного комплекса с промотором гена ТГ в период проявления глюкокортикоидной индукции этого гена, а также в период его нечувствительности к гормону в раннем онтогенезе.

4. Исследовать эффекты введения дексаметазона в потенциально «гормон-чувствительный» период постнатального онтогенеза на экспрессию ТГ в стволовой части головного мозга через 6-24 часов, а также спустя 25 и 70 дней после гормонального воздействия.

Научная новизна. В результате исследования впервые установлено, что в основе зависимой от возраста регуляции глюкокортикоидами экспрессии тирозингидроксилазы, ключевого фермента синтеза катехоламинов, лежит активация неканонического механизма действия гормона, что обеспечивается преобладанием количества транскриптов и белков Jun над Fos, а также большей степенью взаимодействия белков JunB с AP-1 элементом промотора гена ТГ в перинатальном онтогенезе.

Впервые обнаружено, что в период проявления гормональной индукции экспрессии ТГ – в стволе мозга плодов и 3-дневных крысят, экспрессия генов семейства Jun в 5-20 раз превышает уровень мРНК генов семейства Fos по сравнению с 8-дневными крысятами, у которых гормональная индукция не проявляется. Соотношение белков JunB к c-Fos в мозге 3-дневных животных также выше, чем на 8 день жизни.

Установлено, что эффекты дексаметазона на экспрессию генов раннего ответа не одинаковы в разных структурах мозга. В передних областях мозга – коре и гиппокампе, экспрессия *c-fos* повышается после введения гормона, но снижается в стволе мозга, что соответствует изменению экспрессии белка c-Fos. Выявленные закономерности приводят к дополнительному росту соотношения *c-jun/c-fos* ко второму часу после гормонального воздействия.

Впервые проведена оценка взаимодействия белков JunB и c-Fos с дистальным AP-1 элементом промотора гена ТГ *in vivo*. Связывание белков семейства Jun с AP-1 элементом промотора ТГ при введении дексаметазона в стволе мозга 3-дневных крысят (период проявления гормональной индукции гена) выше, чем у 8-дневных (период нечувствительности к гормону).

В работе впервые выявлена глюкокортикоидная индукция ТГ в мозге 3-дневных животных и продемонстрировано сохранение индукции гена фермента на протяжении 24 часов после введения дексаметазона. Гормональная индукция гена ТГ на 3ий день жизни вызывает долговременное изменение экспрессии гена фермента – уровни мРНК ТГ остаются повышенными в ювенильном и взрослом возрасте. Следовательно, последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный след на экспрессию ТГ и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

Теоретическое и практическое значение. Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание механизма регуляции глюкокортикоидами ключевого фермента синтеза катехоламинов - ТГ в критические периоды раннего онтогенеза. Подтверждено приоритетное участие

белков транскрипционного комплекса AP-1 в гормональной индукции гена ТГ, что является доказательством функционирования неканонического механизма глюкокортикоидной регуляции нейрогена. Полученные данные расширяют представление об участии глюкокортикоидов в процессах «онтогенетического программирования» медиаторных систем мозга.

Положения, выносимые на защиту:

1. Уровни мРНК генов семейства Jun (*c-jun*, *junB*, *junD*) превышают экспрессию генов семейства Fos (*c-fos*, *fosB*) в периоды глюкокортикоидной индукции гена ТГ. В период нечувствительности к гормону соотношение между этими транскриптами меняется на обратное.

2. Действие дексаметазона на соотношение экспрессии генов раннего ответа (Jun и Fos) зависит от отдела неонатального мозга. Введение гормона повышает уровень мРНК *c-fos* в передних областях мозга – коре и гиппокампе, но снижает количество транскриптов в стволе мозга. В результате соотношение транскриптов *c-jun/c-fos* в стволе мозга двукратно увеличивается.

3. Взаимодействие белка JunB с дистальным AP-1 элементом промотора гена ТГ в период выявленной глюкокортикоидной индукции гена ТГ на 3 день жизни выше, чем в период нечувствительности экспрессии гена фермента к гормону у 8-дневных животных.

4. В период преобладания транскриптов и белков семейства Jun над Fos в раннем постнатальном онтогенезе глюкокортикоиды индуцируют экспрессию гена ТГ в стволе головного мозга. Индукция экспрессии гена и белка ТГ развивается к 6 часу после введения дексаметазона и сохраняется на протяжении суток после гормонального воздействия.

5. Последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный след на экспрессию ТГ - ключевого фермента синтеза катехоламинов и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Результаты исследования были представлены: VII Сибирский физиологический съезд, Красноярск, 2012; FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic, 2013; XXII Съезд физиологов России, Волгоград, 2013; XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов – 2014, Москва, 2014; VI Съезд ВОГИС, Ростов-на-Дону, 2014; Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга, Санкт-Петербург, 2014; 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy, 2014; Седьмая Всероссийская конференция «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», Новосибирск, 2015; Eleventh symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress, Smolenice castle, Slovakia, 2015; II Международная

конференция молодых ученых: биотехнологов, молодых биологов и вирусологов – 2015, Новосибирск, 2015; IX Всероссийская конференция «Нейроэндокринология – 2015», Санкт-Петербург, 2015; 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Antibes Juan les Pins, France, 2016.

Личный вклад. Результаты, представленные в работе, получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов, изложения результатов работы, их обсуждения, выводов и списка литературы (320 источников). Работа изложена на 131 страницах, содержит 3 таблицы и иллюстрирована 17 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Работа проведена на 20-дневных плодах, 3- и 8-дневных крысятах обоего пола, а также 25- и 70-дневных самцах крыс, содержащихся в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН. День покрытия считали первым днем беременности, день родов – первым днем жизни, отсаживание от матери проводили в возрасте 22 дней. На каждую возрастную точку брали животных не менее, чем из 5 разных пометов.

Экспериментальные воздействия. На 3 день жизни крысятам подкожно однократно вводили 0,2 мг/кг дексаметазона в 20 мкл физ. раствора (Dexamethasone phosphate, KRKA, Словения) либо гидрокортизона "Hydrocortisone-Richter" (Gedeon Richter Ltd, Венгрия, 5 мг/кг в 20 мкл), контрольным однопометным животным - эквивалентный объем физ. раствора либо оставляли интактными. Взятие образцов мозга проводили через 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 и 24 часа после экспериментального воздействия. При анализе отдаленного действия глюкокортикоидов (на 25 и 70 дни жизни) самцы крыс содержались в клетках по 8 особей, с рассаживанием в индивидуальные клетки за 2 дня до забоя. При введении дексаметазона на восьмой день жизни животных забивали через 6 часов после воздействия.

Забор материала. Для определения уровней мРНК и иммунопреципитации хроматина беременных самок, плодов, 3- и 8-дневных крысят, а также 25- и 70-дневных животных забивали быстрой декапитацией. У плодов выделяли ствол мозга, которая включала в себя задний и средний мозг, а также гипоталамическую область промежуточного. У 3-, 8-, 25-, 70-дневных животных выделяли ствол, включающий продолговатый мозг и область моста – блок ткани каудальнее задних бугров четверохолмия и ростральнее овального отверстия без мозжечка. Ствол мозга – область локализации мРНК гена ТГ в перикарионах норадренергических нейронов. Также у 3-дневных крысят выделяли гиппокамп и префронтальную кору – области локализации терминалей нейронов ствола.

Для иммуногистохимического анализа 3-, 8-дневным крысам после наркотизирования авертином (150 мг/кг) проводили транскардиальную перфузию 25 мл PBS и 30 мл фиксирующим раствором 4% PFA в PBS. Мозг постфиксировали ночь в 4% PFA в PBS, затем в течение суток в 30 % сахарозе и замораживали в изопентане при температуре -40°-42°С. Коронарные срезы мозга (18 мкм) получали на криостате (-23°С), монтировали их на стекла super frost plus. Границы анатомических структур мозга крысы определяли по атласу (Paxinos, Watson, 1998).

Определение уровня мРНК генов *TG*, *c-fos*, *fosB*, *c-jun*, *junB*, *junD* методом ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли одностадийным гуанидин-изотиоцианатным методом (Chomczynski, Sacchi, 1987). Для получения кДНК 3-5 мкг РНК инкубировали 90 мин при 42°С с ревертазой MuLV ("СибЭнзим", Россия). Количественный анализ содержания мРНК генов *TG*, *c-fos*, *fosB*, *c-jun*, *junB*, *junD* относительно мРНК гена *actb* проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays (*TG*: Rn00562500_m1; *c-fos*: Rn02396759_m1, *fosB*: Rn00564121_m1; *c-jun*: Rn00572991_s1; *junB*: Rn00572994_s1; *junD*: Rn00824678_s1, *actb*: Rn00667869_m1 "Applied Biosystems", США), согласно протоколу производителя на амплификаторе ABI VIIA™ 7 ("Applied Biosystems") и рассчитывали по методу $\Delta\Delta Ct$.

Иммуногистохимическое окрашивание срезов головного мозга проводили по общепринятой методике (Whiteside, Munglani, 1998) с небольшими модификациями. Высушенные в течение ночи на воздухе срезы последовательно промывали 15 мин в PBS и дважды по 15 мин в PBS с 0.1% Triton X-100 (PBST). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией в 1.5% BSA в PBST в течение часа при комнатной температуре. Анализируемые белки выявляли инкубацией с первичными антителами, разведенными в PBS, содержащем 1.5% BSA и 0.1% Triton X-100, в течение ночи при +4°С. Далее срезы промывали дважды по 15 минут в PBST и инкубировали со вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре и снова дважды промывали в PBST. Препараты, меченные флюоресцентными вторичными антителами, заключали в мовиол, содержащий интеркалятор DAPI.

Микроскопия. Гистологические препараты исследовали с помощью светового микроскопа Carl Zeiss "Axioskop" 2 Plus с автоматической камерой AxioCam на программном обеспечении AxioVision 2.0. Уровень иммунореактивности определяли по величине средней оптической плотности клеток, измеренной с помощью программы AxioVision 4.6. Наиболее репрезентативные препараты снимали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 780 Carl Zeiss.

Иммунопреципитацию хроматина (ChIP-qPCR) проводили в соответствии с протоколами Active Motif и Ding, Kilpatrick, 2013 с модификациями. В пулированных образцах стволов мозга 3- и 8-дневных крысят фиксацию белков на хроматине проводили 37% формальдегидом, 10 мин. Фрагментацию хроматина

в ядерных лизатах проводили на ультразвуковом дезинтеграторе Covaris S2 (ЦКП «Геномика» СО РАН) в течение 2 мин с получением фрагментов 100-500 п.н.

Для одной реакции иммунопреципитации использовали 10-30 мкг хроматина. Образцы с комплексом антитело (против c-Fos, JunB, GR) - магнитный шарик (Dynabeads® Protein G) инкубировали в течение ночи при 4°C и постоянном перемешивании. С использованием магнитного штатива образцы последовательно промывали буферами в возрастающей концентрации NaCl (150mM - 500mM), 0.25M LiCl и трис-ЭДТА. Расшивку элюата проводили в 5M растворе NaCl в течение ночи при 65°C. Неспецифическое связывание оценивали реакцией с IgG, потерю материала в процессе реакции - по контрольному образцу (Input), который отбирали после стадии фрагментации. После обработки РНКазой А (10мг/мл, 30 мин, 37°C) и протеиназой К (20мг/мл, 2 ч, 65°C) ДНК из образцов очищали от белков фенол/хлороформной смесью, осаждали изопропанолом с 3M ацетатом натрия при -20°C и центрифугированием (20 мин, 14000 об/мин, 4°C). Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop2000.

Полученную ДНК использовали для ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентного красителя SYBRGreenI. Последовательности праймеров были специфичны дистальному AP-1 элементу (-5772/-5638) промотора гена ТГ крысы (Rani et al., 2009). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси с SYBRGreen I, ROX (Синтол, Россия), праймерами, 2% DMSO и 200 нг ДНК. Режим ПЦР состоял из 45 циклов (95°C – 15с, 60°C – 60с) по протоколу Applied Biosystems. Специфичность целевого продукта устанавливали с помощью аналитического плавления (60°-95°C) по завершении амплификации. Результаты нормализовали относительно IgG контроля, обогащение рассчитывали по полученным значениям Ct.

Статистическую обработку результатов проводили в пакете программ STATISTICA 8 методом дисперсионного анализа, достоверность различий между группами устанавливали согласно LSD критерию Фишера. Данные представлены в виде $M \pm m$ с уровнем достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соотношение уровней мРНК генов семейства Jun к Fos

Зависимость проявления глюкокортикоидной индукции тирозингидроксилазы от возраста предполагает вовлечение в этот процесс дополнительных регуляторных факторов, одним из которых может являться смещение в онтогенезе соотношения экспрессии белков Jun и Fos, определяющее, согласно неканоническому механизму действия гормона, направление изменения экспрессии зависимых генов.

В стволе мозга крысят разного возраста – 20-дневных плодов (период выявленной глюкокортикоидной индукции гена ТГ), 3-дневных (период неустановленной зависимости экспрессии гена ТГ от гормона) и 8-дневных крысят

(период нечувствительности к гормону) было определено соотношение между уровнями базальной экспрессии генов семейств Jun и Fos (Рис.1).

Установлено, что в стволе мозга плодов и 3-дневных животных соотношение транскриптов для всех исследуемых представителей генов семейства Jun (*junB*, *c-jun*, *junD*) к *c-fos* достоверно выше, чем в стволе мозга 8-дневных крысят: *junB/c-fos* $F(2, 49) = 38,67$; $p < 0,001$; *c-jun/c-fos* $F(2, 35) = 20,34$; $p < 0,001$; *junD/c-fos* $F(2, 43) = 30,08$; $p < 0,001$.

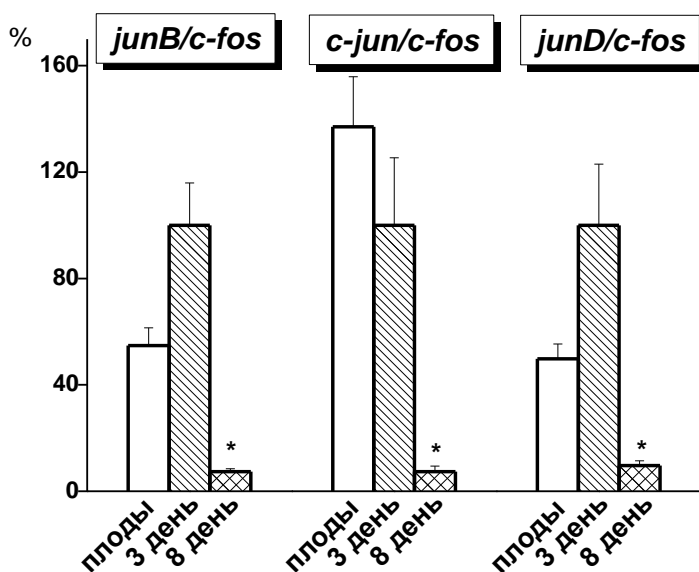


Рис.1. Соотношение уровней мРНК генов семейств Jun к *c-fos* (* $p < 0,05$ по сравнению с другими возрастными группами) в стволе мозга.

Аналогичное соотношение уровней мРНК генов семейства Jun было установлено по отношению и к другому представителю семейства Fos – *fosB*. Как в стволе

мозга плодов, так и 3-дневных крысят соотношение базальной экспрессии для всех генов семейства Jun выше по сравнению с 8-дневными животными: *junB/fosB* $F(2, 31) = 122,77$; $p < 0,001$; *c-jun/fosB* $F(2, 28) = 61,52$; $p < 0,001$; *junD/fosB* $F(2, 30) = 12,95$; $p < 0,001$.

Соотношение белков JunB и c-Fos в раннем онтогенезе

Обнаруженные соотношения уровней мРНК генов Jun/Fos были подтверждены оценкой соотношения белков JunB к c-Fos методом иммуногистохимического окрашивания (Рис.2А). Выбор именно этих белков обусловлен их приоритетным участием в глюкокортикоидной регуляции экспрессии гена ТГ в культуре феохромоцитомы (Rani et al., 2009; Rani et al., 2013). В области синего пятна ствола мозга 3-дневных крысят соотношение экспрессии данных белков выше, чем у 8-дневных ($F(1,9) = 9,42$; $p < 0,01$) (Рис.2Б).

Установленные в работе соотношения экспрессии белков раннего ответа на уровне мРНК и белка свидетельствуют о преобладании в мозге плодов белков семейства Jun, по сравнению с Fos, что согласно неканоническому механизму действия гормона, может способствовать проявлению гормональной индукции экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов.

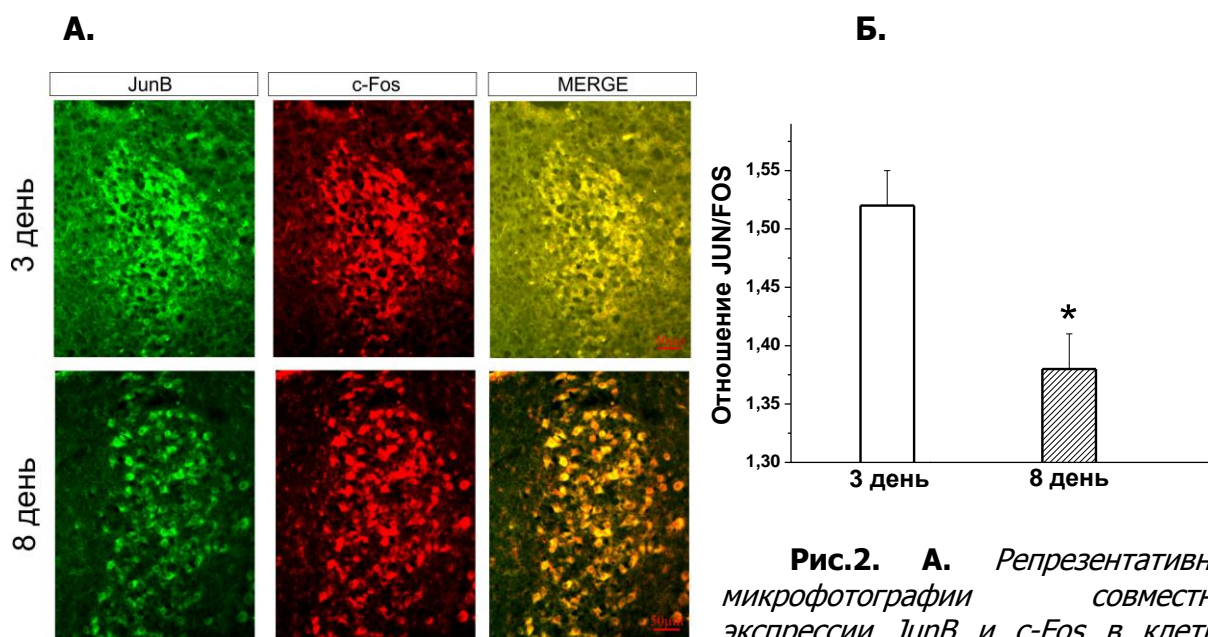


Рис.2. А. Репрезентативные микрофотографии совместной экспрессии JunB и c-Fos в клетках синего пятна ствола мозга 3- и 8-дн. крысят. **Б.** Соотношение экспрессии белков JunB к c-Fos в стволе мозга 3- и 8-дн. крысят (* $p < 0,05$ по сравнению с другим возрастом).

У 8-дневных крысят соотношение белков Jun/Fos смещено в пользу представителей семейства Fos, что, согласно неканоническому механизму, может препятствовать проявлению индукции зависимых генов. Аналогичное преобладание белков семейства Jun над белками Fos наблюдалось и у 3-дневных крысят, для которых факт зависимости экспрессии гена ТГ от уровня глюкокортикоидов до настоящего времени не был установлен.

Определение уровня мРНК ТГ под действием глюкокортикоидов на третий день жизни будет являться необходимой верификацией нашего предположения.

Действие глюкокортикоидов на уровень мРНК ТГ в стволе мозга трехдневных крысят

Введение на 3 день жизни глюкокортикоидов индуцировало экспрессию гена ТГ через шесть часов после воздействия, повысив ее до $1,73 \pm 0,18(10)$ (дексаметазон) и $2,66 \pm 0,19(10)$ (гидрокортизон) по сравнению с введением физ.раствора $0,99 \pm 0,14(12)$ ($F(2,25) = 8,74$; $p < 0,001$).

Следовательно, и на третий день жизни, с установленным преобладанием экспрессии белков Jun над Fos, глюкокортикоиды, индуцируют экспрессию гена ТГ в стволе мозга. Следовательно, чувствительность ТГ к гормональной индукции не ограничена пренатальным периодом онтогенеза и сохраняется в первые дни жизни, что расширяет гормон-зависимый период регуляции экспрессии нейрогена, определяющего активность медиаторной системы (Kvetnansky et al., 2009). Поскольку уровни транскриптов генов раннего ответа, как и их соотношение, может меняться в результате действия глюкокортикоидов, в работе анализировали уровни мРНК генов *c-fos* и *c-jun* в отделах мозга 3-дневных крысят после введения дексаметазона.

Влияние глюкокортикоидов на экспрессию генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun* в отделах неонатального мозга

Введение дексаметазона изменяло уровень экспрессии гена *c-fos* в головном мозге. При этом направление и интенсивность изменений зависели от исследуемого отдела. Так, в передних областях мозга – префронтальной коре и гиппокампе, гормон индуцировал экспрессию гена *c-fos* уже через 30 минут после введения (Рис.3).

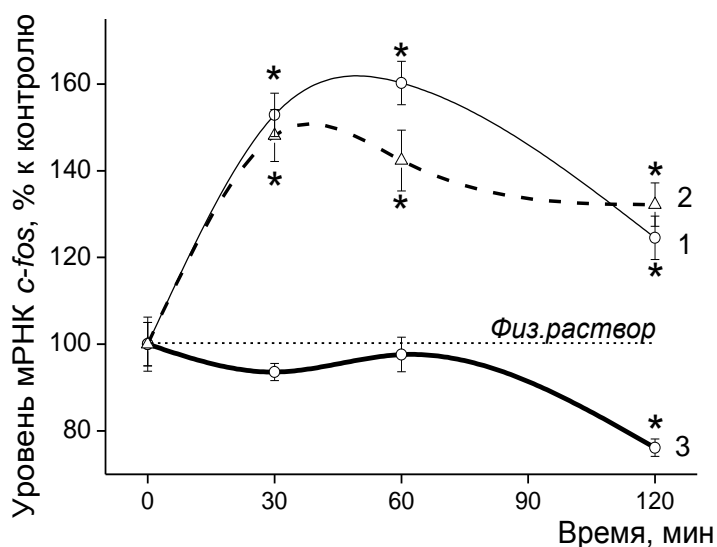


Рис.3. Уровни мРНК *c-fos* под действием дексаметазона в гиппокампе (1), префронтальной коре (2) и стволе (3) головного мозга 3-дн. крысят через 30-60-120 минут после введения гормона. * $p < 0,05$ по сравнению с уровнем животных, получавших физ.раствор (пунктирная линия).

В гиппокампе гормональная индукция *c-fos* наблюдалась на протяжении 120 минут по сравнению с уровнем животных, получавших физиологический раствор (влияние гормона $F(1, 55)=14,88$; $p < 0,001$; времени $F(3, 55)=9,05$; $p < 0,001$; взаимодействие факторов $F(3, 55)=2,91$; $p < 0,05$). В префронтальной коре мозга максимум индукции наблюдался в первые полчаса после введения гормона, незначительно снижаясь к 120 минуте, превышая, как и в гиппокампе, уровень контрольных животных (влияние гормона $F(1, 54)=13,32$; $p < 0,001$; времени $F(3, 54)=3,36$; $p < 0,05$; взаимодействие факторов $F(3, 54)=2,35$; $p > 0,05$).

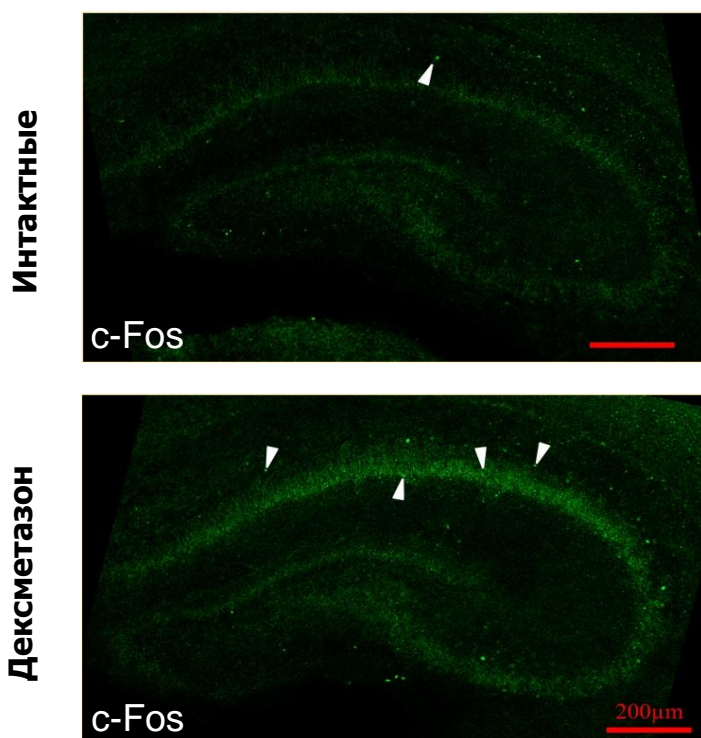
В стволе мозга выявлен принципиально иной профиль изменения экспрессии гена *c-fos*. Экспрессия гена не повышалась ни через 30, ни через 60 минут после введения дексаметазона, значительно снижаясь через 2 часа после воздействия (влияние гормона $F(1, 54)=1,18$; $p > 0,05$; времени $F(3, 54)=9,36$; $p < 0,001$; взаимодействие факторов $F(3, 54)=0,43$; $p > 0,05$). Известное подавление дексаметазоном активности каскада ERK/MAPK, стимулирующего экспрессию *c-fos* (Kassel et al., 2001), может быть причиной наблюдаемых нами изменений.

Введение дексаметазона не изменяло уровень экспрессии гена *c-jun* ни в одной из исследованных областей мозга 3-дневных крысят ни в одной из рассмотренных временных точек ($F=0,02 - 1,03$; $p > 0,1$).

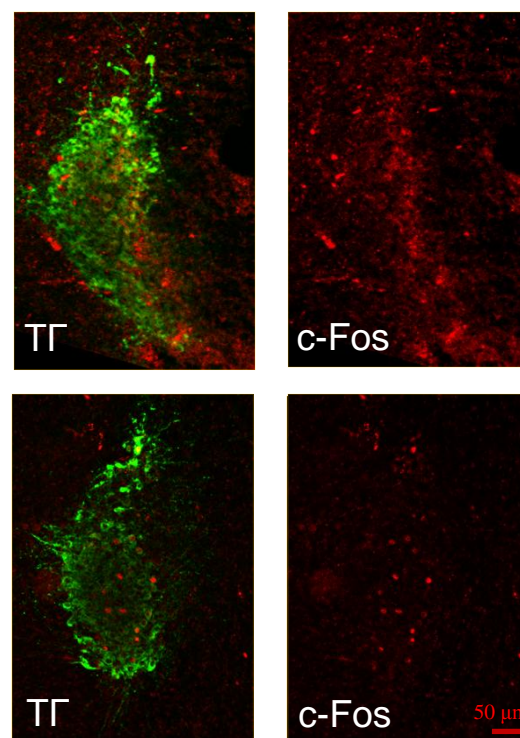
Обнаруженные на уровне мРНК изменения гена *c-fos* согласовались с оценкой экспрессии его белка в отделах мозга методом иммуногистохимического окрашивания (Рис.4А). Если в гиппокампе выявлено увеличение флуоресценции

через час после введения дексаметазона ($F(1, 6)=10,60$; $p<0,05$), то в области синего пятна ствола мозга наблюдалась тенденция к снижению экспрессии *c-Fos* ($F(2, 8)=3,87$; $p<0,1$) (Рис. 4Б).

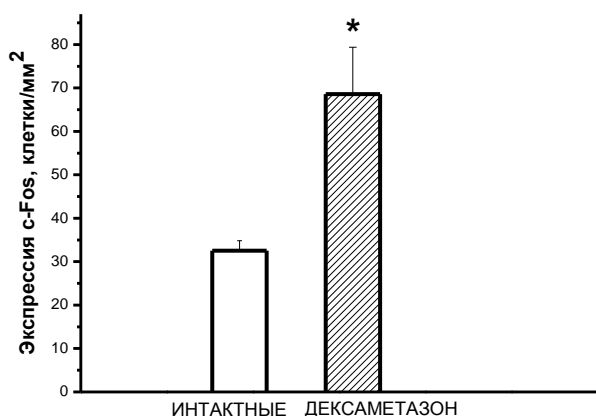
А. Гиппокамп



Синее пятно ствола мозга



Б. Гиппокамп



Синее пятно ствола мозга

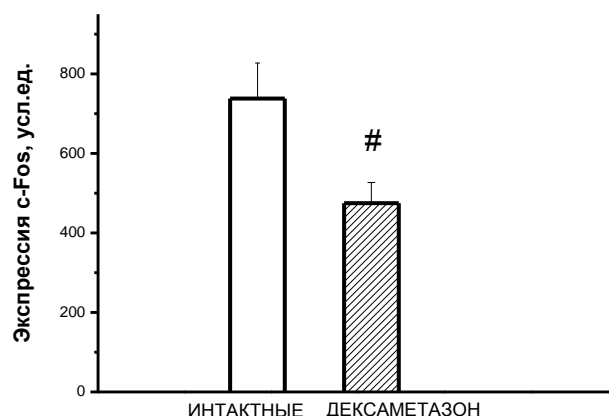


Рис. 4. А. Репрезентативные микрофотографии экспрессии *c-Fos* в клетках гиппокампа и синего пятна ствола мозга 3-дн. крысят после введения дексаметазона. **Б.** Экспрессия *c-Fos* под действием дексаметазона в гиппокампе (* $p<0,05$ относительно контроля) и стволе мозга (# $p<0,1$ относительно контроля) 3-дн. крысят.

Установленные закономерности изменения экспрессии генов раннего ответа под действием дексаметазона в отделах мозга 3-дневных крысят привели к зависимой от исследуемой области мозга динамике соотношения уровней экспрессии *c-jun* к *c-fos* (Рис.5). Величина соотношения нативной экспрессии мРНК этих белков уменьшалась в ряду: гиппокамп – кора – ствол ($F(2, 19)=22,93$;

$p < 0,001$). Введение дексаметазона, существенно не повлияв на соотношение *c-jun/c-fos* по времени в гиппокампе и коре ($p > 0,05$), привело к двукратному росту соотношения транскриптов в стволе мозга ко второму часу после воздействия ($F(3, 43) = 11,81$; $p < 0,001$). Следовательно, введение дексаметазона способно приводить к дополнительному смещению соотношения *c-jun/c-fos* в сторону преобладания белков Jun в области основной экспрессии гена ТГ - стволе мозга.

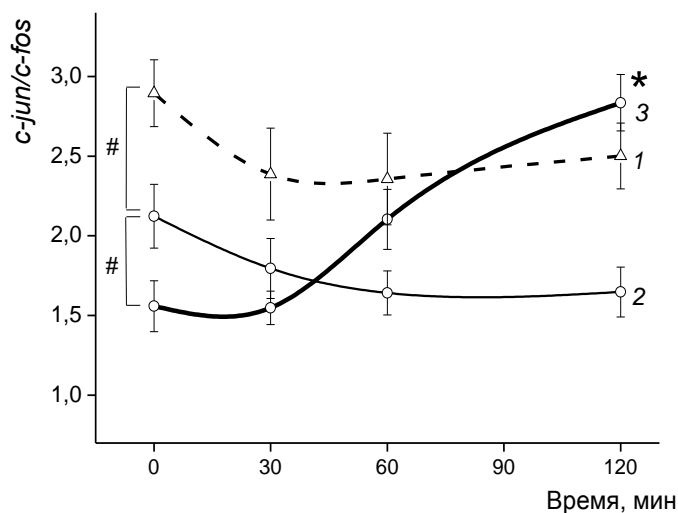


Рис.5. Соотношение уровней мРНК генов *c-jun* к *c-fos* в гиппокампе (1), префронтальной коре (2) и стволе (3) головного мозга 3-дн. крысят под действием дексаметазона. * $p < 0,05$ – по сравнению со стволом мозга интактных крысят (нулевая точка); # $p < 0,05$ – между структурами мозга интактных животных.

В целом, полученные результаты свидетельствуют, что в период проявления гормональной индукции гена ТГ экспрессия генов и белков семейства Jun выше уровня экспрессии генов и белков семейства Fos как в исходном состоянии, так и при действии дексаметазона. Именно такое соотношение между экспрессией этих белков, согласно неканоническому механизму действия глюкокортикоидов, приводит к индукции гормон-зависимых генов (Ratman et al., 2013). Увеличение экспрессии Fos к 8 дню жизни может являться основной причиной независимости ТГ от уровня глюкокортикоидов в этом возрасте.

Определение степени непосредственного взаимодействия белков Jun и Fos с AP-1 элементом промотора гена ТГ в периоды разной чувствительности к гормону будет являться весомым подтверждением участия неканонического механизма глюкокортикоидов в регуляции ключевого фермента синтеза катехоламинов, участвующего в долговременной гормональной модификации нейрохимии мозга.

Взаимодействие белков AP-1 комплекса с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ при введении дексаметазона в раннем онтогенезе

Исходя из полученных закономерностей, можно ожидать разный уровень взаимодействия белков Jun и Fos с дистальным AP-1 элементом (-5728/-5734) промотора ТГ, основным участником гормональной индукции гена ТГ *in vitro* (Rani et al., 2009), в период глюкокортикоидной индукции (3 день жизни) и вне его (8 день жизни). Если на третий день жизни – в период индукции ТГ количество белков Jun превышает число белков Fos, что способствует образованию

гомодимеров Jun/Jun, то и взаимодействие белков Jun с AP-1 элементов будет выше, чем на 8 день развития – период нечувствительности к гормону.

Для доказательства предположения был проведен анализ иммунопреципитации хроматина с использованием антител к белкам JunB, c-Fos и GR в пулированных образцах ствола мозга 3- и 8-дневных крысят через шесть часов после введения дексаметазона с последующей ПЦР в реальном времени (ChIP-qPCR) участка промотора гена ТГ, содержавшего дистальный AP-1 элемент.

Связывание антител к JunB на участке промотора ТГ, содержащем дистальный AP-1 элемент, у 3-дн. крысят было достоверно выше, чем на 8 день жизни ($F(1, 2)=43,07$; $p<0,05$) (Рис.6.). При этом взаимодействие антител к c-Fos с этим же участком промотора гена фермента не достигало уровня статистической значимости у животных разного возраста ($F(1, 2)=2,88$; $p>0,1$), а взаимодействие антител к GR на 3 и 8 дни жизни было сопоставимо между собой.

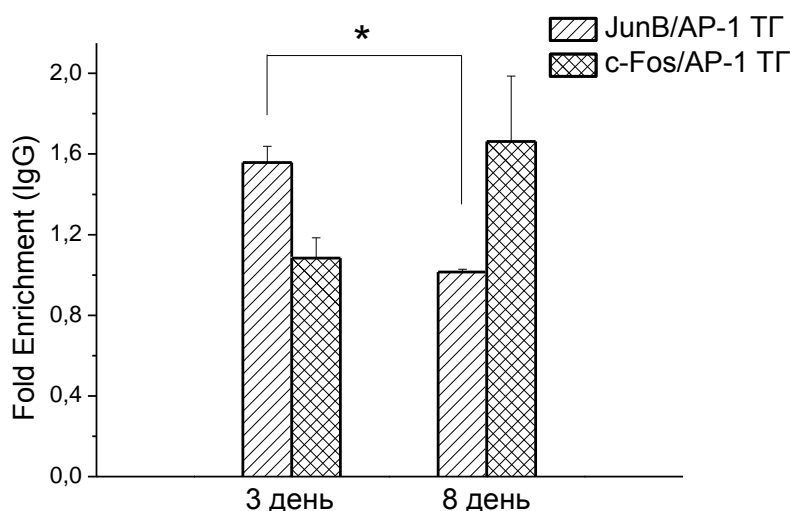


Рис.6. Связывание белков JunB и c-Fos с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ (-5728/-5734) (* $p<0,05$ между животными разного возраста).

Таким образом, глюкокортикоидная индукция ТГ осуществляется через белок-белковое взаимодействие активированного гормоном рецептора с транскрипционным фактором AP-1,

образованным преобладающими в мозге 3-дневных крысят белками семейства Jun, что способствует связыванию гомодимеров Jun/Jun с AP-1 элементом промотора ТГ, активируя экспрессию гена фермента.

Важность глюкокортикоидной индукции гена ТГ в период внутриутробного развития для долговременной модификации функции норадренергической системы мозга и регулируемых ею форм поведения известна (Дыгало, Калинина, 1993; Калинина, Дыгало, 2013). Результаты нашей работы расширили период индуцирующего действия гормона и на первые дни после рождения. Для определения продолжительности глюкокортикоидной индукции ТГ определяли уровень мРНК и белка фермента после введения дексаметазона на 3 день жизни.

Экспрессия гена и белка ТГ после введения дексаметазона на 3 день жизни

Экспрессия гена ТГ нарастала к шестому часу после введения дексаметазона 3-дневным крысятам (Рис.7), и этот эффект сохранялся через 8, 10 и 24 часа после воздействия ($F(7, 138)=9,92$; $p<0,001$).

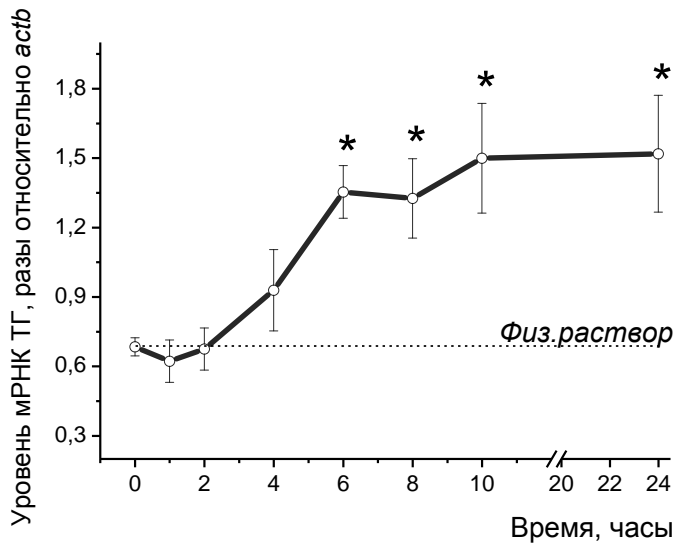
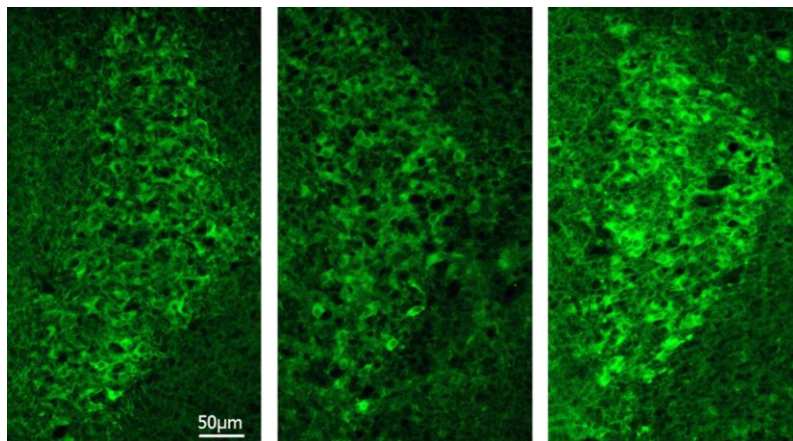


Рис.7. Уровень мРНК ТГ в стволе мозга 3-дневных крысят после введения дексаметазона (* $p < 0,05$ по сравнению с физ. раствором, пунктирная линия).

Дексаметазон индуцировал не только мРНК гена ТГ, но и уровень белка фермента (Рис.8А). Было установлено, что через шесть часов после введения дексаметазона иммунореактивность белка ТГ в клетках синего пятна ствола мозга 3-дневных крысят повышалась по сравнению с контрольными группами ($F(2,31) = 5,22; p < 0,01$) (Рис.8Б).

А. Интактные Физ. раствор Дексаметазон



Б.

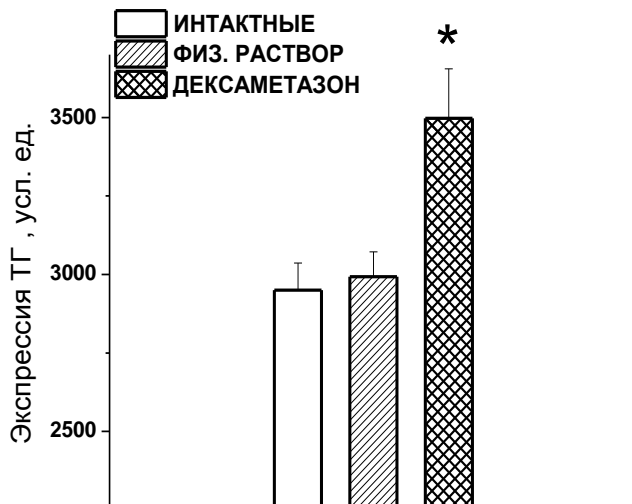


Рис.8. А. Репрезентативные микрофотографии экспрессии ТГ в клетках синего пятна ствола мозга 3-дн. крысят после введения дексаметазона.

Б. Экспрессия ТГ в стволе мозга 3-дн. крысят после введения дексаметазона (* $p < 0,05$ по сравнению с контрольными группами).

Введение дексаметазона на 3 день жизни приводит к изменению экспрессии гена ТГ на протяжении длительного периода онтогенеза. Самцы крыс, после введения дексаметазона на 3 день жизни, имели достоверно повышенный уровень мРНК ТГ в стволе мозга в ювенильном (25й день жизни) ($F(1, 14)=10,40$; $p<0,01$) и взрослом (70й день жизни) возрасте ($F(1, 9)=9,31$; $p<0,05$) (Рис.9).

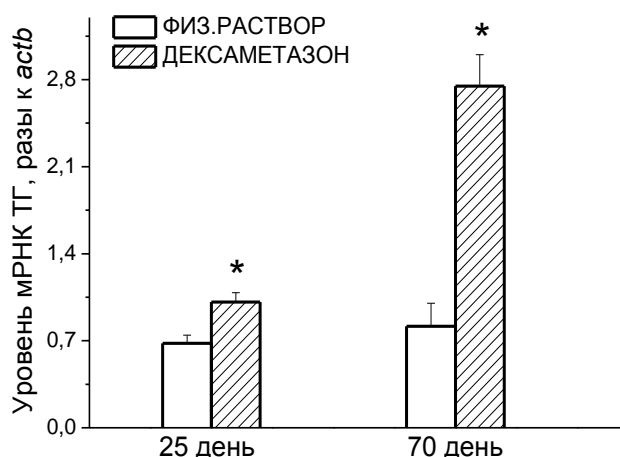


Рис.9. Уровни мРНК ТГ в стволе мозга ювенильных и взрослых животных после введения дексаметазона на 3 день жизни (* $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой).

Следовательно, гормональная индукция в чувствительный период раннего постнатального онтогенеза способна долговременно модифицировать активность нейромедиаторной

системы, обеспечивая изменения в регуляции медиаторной системой функций взрослого организма.

Таким образом, индукция глюкокортикоидами тирозингидроксилазы в перинатальном онтогенезе осуществляется по неканоническому действию гормонов при участии транскрипционного комплекса AP-1. Функциональные элементы этого комплекса определяют эффект глюкокортикоидов – повышенное число белков Jun и, как следствие, большее образование гомодимеров Jun/Jun, которые связываются с дистальным AP-1 элементом промотора ТГ, приводит к индуцирующему действию глюкокортикоидов. Индукция фермента, определяющего функцию медиаторной системы, в чувствительный период онтогенеза способна изменить активность и функционирование медиаторной системы мозга на протяжении длительного периода развития.

ВЫВОДЫ

1. Уровни мРНК генов семейств Jun (*c-jun, junB, junD*) и Fos (*c-fos, fosB*) существенно изменяются в стволе головного мозга в ходе перинатального онтогенеза. Для периода чувствительности ТГ мозга плодов крыс к глюкокортикоидной индукции характерно существенное превышение количества транскриптов Jun над Fos. Похожее соотношение экспрессии Jun и Fos выявлено в стволе мозга 3-дневных, но не 8-дневных крысят. В головном мозге последних, в отличие от плодов, экспрессия ТГ не индуцируется глюкокортикоидами.

2. Действие дексаметазона на соотношение экспрессии генов раннего ответа (Jun и Fos) зависит от отдела неонатального мозга. У 3-дневных крысят гормон повышает уровень мРНК *c-fos* в передних областях мозга – коре и

гиппокампе, но снижает количество транскриптов в стволе мозга, что согласуется с изменением экспрессии белка *c-Fos*. В результате действия гормона соотношение транскриптов *c-jun/c-fos* в стволе мозга двукратно увеличивается.

3. Глюкокортикоид (дексаметазон или гидрокортизон) введенный 3-дневным крысятам, имеющим аналогичное мозгу плодов преобладание транскриптов и белков семейства Jun над Fos, индуцирует экспрессию гена ТГ в стволе головного мозга. Повышение уровня мРНК ТГ развивается к 6 часу после введения дексаметазона, что согласуется с ростом белка фермента к этому времени, и остается повышенным через 8, 10 и 24 часа после гормонального воздействия. Гормональная индукция гена ТГ на 3-ий день жизни вызывает долговременное изменение экспрессии этого гена. Уровни мРНК ТГ остаются повышенными в стволе мозга ювенильных – 25- дневных и взрослых – 70-дневных животных.

4. Взаимодействие белка JunB с дистальным AP-1 элементом промотора гена ТГ в период выявленной глюкокортикоидной индукции гена ТГ на 3 день жизни выше, чем в период нечувствительности экспрессии гена фермента к гормону у 8-дневных животных.

5. В целом, зависящая от возраста индукция глюкокортикоидами ТГ в перинатальном головном мозге ассоциирована с преобладанием количества транскриптов и белков Jun над Fos, а также большей степенью взаимодействия белка JunB с AP-1 элементом промотора гена ТГ, являющимися компонентами неканонического механизма действия гормона, активирующего экспрессию генов. Важно, что последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза оставляют длительный след на экспрессию ТГ - ключевого фермента синтеза катехоламиновых нейротрансмиттеров и, тем самым, на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сухарева Е.В.**, Дыгало Н.Н., Калинина Т.С. Влияние дексаметазона на экспрессию генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun* в различных отделах неонатального мозга. // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50. - № 2. стр. 266-271.
2. Lanshakov D.A., **Sukhareva E.V.**, Kalinina T.S., Dygalo N.N. Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain. // Neurobiol .Dis. - 2016 . – Vol. 91. – P. 1-9. doi: 10.1016/j.nbd.
3. **Сухарева Е.В.**, Калинина Т.С., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Т.20. - №2. стр. 212-219. DOI 10.18699/VJ16.156.
4. Калинина Т.С., **Сухарева Е.В.**, Дыгало Н.Н. Канонический и неканонический механизмы действия глюкокортикоидных гормонов стресса.// Успехи физиологических наук . – 2016. - Т. 47. - № 3. стр. 59-69.
5. **Сухарева Е.В.** Соотношение экспрессии белков Fos/Jun в стволе головного мозга крысят в перинатальном онтогенезе.// Материалы 50-й международной научной студенческой конференции, 2012. - стр. 259.
6. Калинина Т.С., **Сухарева Е.В.** Соотношение экспрессии белков jun/fos для проявления индукции глюкокортикоидами гена тирозингидроксилазы в онтогенезе.// Тезисы докладов VII Сибирского физиологического съезда, 27-29 июня 2012 г., г. Красноярск. – стр. 210.

7. **Сухарева Е.В.** Роль белков Jun/Fos для глюкокортикоидной индукции гена тирозингидроксилазы в раннем онтогенезе. //Материалы 51-й международной научной студенческой конференции, 2013. - стр. 152.
8. Kalinina T.S., **Sukhareva E.V.**, Bulygina V.V., Shishkina G.T., Dygalo N.N. Up-regulation of TH gene expression by glucocorticoids depends on ratio of Jun to Fos mRNA levels.// FENS Featured Regional Meeting, 11–14 September 2013, Prague, Czech Republic, p. 244.
9. Калинина Т.С., **Сухарева Е.В.**, Булыгина В.В., Ланшаков Д.А., Дыгало Н.Н. Механизм программирующего действия глюкокортикоидов на экспрессию тирозингидроксилазы головного мозга в онтогенезе. // Материалы XXII Съезда физиологов России, Волгоград 16-20 сентября 2013 г. - стр. 208.
10. **Сухарева Е.В.**, Ланшаков Д.А. Роль соотношения белков Jun/Fos для проявления глюкокортикоидной индукции тирозингидроксилазы мозга в раннем онтогенезе.// XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов – 2014 (7-11 апреля 2014г.). Секция «Биология». Тезисы докладов. – Издательство Московского университета, 2014. – стр. 276.
11. Калинина Т.С. , **Сухарева Е.В.**, Ланшаков Д.А., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Роль генов раннего ответа в гормональной регуляции экспрессии тирозингидроксилазы мозга.// VI Съезд ВОГИС, (Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014 года). Тезисы докладов. Новосибирск: ИЦИГ. Издательство СО РАН. - стр. 120.
12. **Сухарева Е.В.**, Калинина Т.С., Ланшаков Д.А., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Роль белков раннего ответа в глюкокортикоидной индукции тирозингидроксилазы мозга.// Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Всероссийская конференция с международным участием (Санкт-Петербург, 24–26 июня 2014 года). Тезисы докладов. – СПб.: Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 2014. – стр.132.
13. Kalinina T.S., **Sukhareva E.V.**, Bulygina V.V., Lanshakov D.A., Dygalo N.N. The ratio of jun/fos determines the ability of dexamethasone to induce of tyrosine hydroxylase expression in the neonatal rat brain.// 9th FENS Forum of Neuroscience, 5-9 July, Milan, Italy, 2014, Abstract Number: FENS-0906 - Poster Board Number: E012.
14. **Сухарева Е.В.**, Калинина Т.С., Ланшаков Д.А., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Белки AP-1 комплекса в индукции глюкокортикоидами тирозингидроксилазы мозга в раннем онтогенезе. // Материалы Седьмой Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов», - 2015. – стр. 271-272.
15. Kalinina T., **Sukhareva E.**, Lanshakov D., Bulygina V. V., Shishkina G., Dygalo N.N. The Ability of Glucocorticoids to Induce Tyrosine Hydroxylase Gene Expression Depends on Ratio between Jun and Fos mRNA and Protein Levels in the Rat Brain. // Eleventh symposium on catecholamines and other neurotransmitters in stress. Smolenice castle, Slovakia, June 20-25, 2015. – P. 31.
16. **Сухарева Е.В.**, Ланшаков Д.А. Экспрессия генов раннего ответа c-fos и c-jun в отделах неонатального мозга под действием дексаметазона. // II Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молодых биологов и вирусологов – 2015: Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск: РИЦ НГУ, 2015. – стр. 195.
17. **Сухарева Е.В.**, Калинина Т.С., Ланшаков Д.А., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Влияние дексаметазона на экспрессию генов раннего ответа и тирозингидроксилазы неонатального мозга. // Материалы IX Всероссийской конференции «Нейроэндокринология – 2015», посвящается 90-летию А.Л. Поленова (1925-1996). – СПб.: ИД Петрополис, 2015. – стр.136.
18. Калинина Т.С., **Сухарева Е.В.**, Шишкина Г.Т., Меньшанов П.Н., Булыгина В.В., Ланшаков Д.А., Дыгало Н.Н. Острые и отсроченные последствия гипоксии и дексаметазона на норадренергическую систему мозга крыс. // Материалы IX Всероссийской конференции «Нейроэндокринология – 2015», посвящается 90-летию А.Л. Поленова (1925-1996). – СПб.: ИД Петрополис, 2015. – стр. 73.
19. Kalinina T.S., Shishkina G.T., **Sukhareva E.V.**, Bulygina V.V., Lanshakov D. A., Dygalo N. N. Age-dependence ad varying effects of glucocorticoids on TrH2 and TH gene expression in the perinatal rat brain.// 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Antibes Juan les Pins, France, 2016, P2.080.