

Лисачев Павел Дмитриевич

Нейропластичность и экспрессия генов
(нейро-глиальное взаимодействие и формирование долговременной
потенциации синаптической передачи)

03.03.01 – Физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского Отделения Российской Академии Наук и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики».

Научный консультант: **Штарк Марк Борисович**, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

Официальные оппоненты:

Скребицкий Владимир Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель лаборатории функциональной синаптологии ФГБНУ "Научный центр неврологии";

Суслов Николай Иннокентьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией фитофармакологии и специального питания ФГБНУ "НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга";

Гайнутдинов Халил Латыпович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет".

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Защита состоится "___" _____ 20__ г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.014.01 при ФГБНУ "Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины" по адресу: 630117, г.Новосибирск, ул. академика Тимакова, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФФМ.

Автореферат разослан "___" _____ 2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Мельников В.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Долговременные изменения эффективности синаптической передачи являются ключевым физиологическим механизмом обучения и памяти. Важную роль в сохранении синаптических модификаций играет экспрессия генов. Реорганизация синапсов сопровождается значительными изменениями в транскриптоме мозга, анализ которых представляется необходимым для выяснения механизмов нейропластичности.

Одним из наиболее исследованных проявлений нейрональной пластичности является долговременная потенциация синаптической передачи (ДВП) – феномен, лежащий в основе обучения и памяти (Bliss and Lomo, 1973; Voronin, 1983; Скребицкий и Чепкова, 1999; Leslie and Nedivi, 2011; Скребицкий и Штарк, 2012). Самая распространенная модель ДВП – увеличение ответов постсинаптических нейронов на тестирующую стимуляцию пресинаптических волокон после их кратковременной высокочастотной стимуляции (тетанизации или тэта-стимуляции).

Временная структура ДВП представлена ранней фазой, зависящей от модификации предсуществующих синаптических белков, и поздней, требующей синтеза новых белков и экспрессии генов (Reymann and Frey, 2007; Abraham and Williams, 2008; Leslie and Nedivi, 2011). Динамика транскриптома при формировании ДВП интенсивно исследуется (Hevroni et al., 1998; Matsuo et al., 2000; French et al., 2001a; Lee et al., 2005; Leslie and Nedivi, 2011), в том числе с помощью ДНК-микрочипов (Park et al., 2006; Wibrand et al., 2006; Håvik et al., 2007; Ploski et al., 2010; Ryan et al., 2011, 2012), но круг нерешенных проблем остается далеко не исчерпанным.

Обычно анализ молекулярно-генетических аспектов нейропластичности ограничивают процессами, происходящими в нейронах. Между тем, глия играет важную роль в регуляции синаптической передачи. Астроциты, основной подтип глиии, отвечают на выделение нейромедиаторов увеличением внутриклеточной концентрации кальция и высвобождением в межклеточное пространство глиальных продуктов, модулирующих синаптическую эффективность (Perea and Araque, 2010). И среди этих продуктов – не только классические медиаторы, но и белки. Однако вклад генетического аппарата глиальных клеток в синаптическую пластичность практически неизвестен. Поэтому изучение связи нейрональной пластичности с экспрессией глиальных генов является актуальной задачей нейрофизиологии.

Одним из важнейших секретируемых глией регуляторных факторов является белок S100B. В физиологических концентрациях он проявляет трофические свойства и

препятствует активации макрофагов мозга, в патологических условиях его уровень может повышаться, и он, напротив, становится токсичным (Donato et al., 2009).

S100B модулирует нейронную активность (Sakatani et al., 2008) и синаптическую пластичность (Nishiyama et al., 2002). Для *S100B*-нокаутных мышей характерна улучшенная пространственная память и память о страхе, а также повышенная ДВП в гиппокампе (Nishiyama et al., 2002). В то же время у таких животных быстрее развиваются судороги при киндлинге (Dyck et al., 2002), что могло бы отчасти являться следствием изменения динамики ДВП, поскольку ДВП считается одним из наиболее вероятных механизмов распространения судорожной активности при киндлинге (Годухин, 2005). По-видимому, нормальная экспрессия *S100B* необходима для стабильного функционирования мозга.

Обучение у крыс сопровождается увеличением количества белка S100B в мозге (Шерстнев и др., 2001). Таким образом, *S100B* – перспективный объект для изучения связи нейропластичности с экспрессией глиальных генов. Он удобен также с методической точки зрения, поскольку не экспрессируется в нейронах в большинстве отделов мозга, включая гиппокамп – классический объект для изучения молекулярно-клеточных механизмов нейропластичности. Показанное в ранних работах (Hydén and Lange, 1970), с использованием антител к суммарной фракции белков S100, увеличение после обучения уровня S100 в нейронах гиппокампа может указывать на активацию другого гена семейства *S100* – *S100A1*, экспрессирующегося как в глиальных клетках, так и в нейронах гиппокампа (Ackermann et al., 2006).

Интерес к механизмам регуляции экспрессии S100B и S100A1 связан не только с их возможным участием в нейропластичности, но и с вовлечением этих белков в патологические процессы (Wright et al., 2009; Траилин и Левада, 2009; Sorci et al., 2010; Astrand et al., 2013). В частности, аллель *S100B*, характеризующийся повышенным уровнем экспрессии, является фактором риска развития биполярного расстройства (Dagdan et al., 2011).

Наиболее изучена связь с долговременной памятью и синаптической пластичностью семейств транскрипционных факторов CREB, C/EBP, AP-1, Egr, Rel/NFκB (Анохин, 1996; Гринкевич и Васильев, 1999; Dyakonova et al., 1999; Alberini, 2009; Alberini and Kandel, 2014). В гене *S100A1* крысы идентифицирована потенциальная AP-1-связывающая последовательность (Zimmer et al., 1995), а в промоторе *S100B* крысы присутствуют потенциальные сайты связывания Egr1. Учитывая важную роль AP-1 и Egr1 в нейропластичности, было бы целесообразно оценить возможность их участия в регуляции экспрессии *S100* на модели долговременной потенциации.

Ген *S100B* также может активироваться транскрипционным фактором p53 (Lin et al., 2004), ключевым регулятором системы апоптоза. Его роль в экспрессии генов, ассоциированной с долговременной потенциацией или обучением, ранее не исследовалась. Однако обучение у моллюсков сопровождается ацелированием в мозге белка с молекулярной массой 53 кДа (Данилова и др., 2010). Возможно, этот белок является фактором p53, активность которого увеличивается при ацелировании. Кроме того, элементы системы апоптоза (каспазы, белки семейства Bcl2) участвуют в синаптической пластичности (Гуляева, 2004; Кудряшова и др., 2005; Solá et al., 2012; Li and Sheng, 2012). p53 регулирует экспрессию генов некоторых белков семейства Bcl2, среди его мишеней – гены таких важных для синаптической пластичности факторов, как Egr1, каспаза-1 (Lu et al., 2006).

Таким образом, p53 может быть отнесен к вероятным посредникам, связывающим нейропластичность с экспрессией *S100B*. Изучение транскрипционной активности p53 при формировании ДВП представляет также самостоятельный интерес и может значительно расширить существующие представления о регуляции экспрессии генов при ДВП.

В связи с вышеизложенным, были определены следующие цели и задачи настоящей работы.

Цель исследования: Определить закономерности участия генетического аппарата глии в механизмах нейрональной пластичности и роль транскрипционного фактора p53 в регуляции экспрессии генов при формировании долговременной потенциации синаптической передачи.

На основе поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать модель связанной с нейропластичностью экспрессии генов семейства *S100* (*S100B*, *S100A1*) в срезах гиппокампа крыс.
2. Оценить роль транскрипционных факторов комплекса AP-1 (Fos, Jun, JunB), Egr1 и p53 в индукции экспрессии *S100* при ДВП.
3. Идентифицировать факторы, ограничивающие активность p53 при ДВП.
4. Исследовать механизмы индукции экспрессии *S100B* при формировании ДВП на уровне внутриклеточных регуляторных каскадов.
5. Исследовать экспрессию мишеней p53 в ранней фазе ДВП и оценить вклад p53 в ее регуляцию с помощью активатора p53 нутлина-3.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Зависимые от нейронной активности нейропластические процессы могут сопровождаться изменением транскрипции генов не только в нейронах, но и в глиальных клетках

(астроцитах). При формировании долговременной потенциации синаптической передачи через транскрипционный механизм реализуется увеличение экспрессии глиального фактора *S100B*, модулирующего синаптическую пластичность. Таким образом, генетический аппарат астроцитов вовлечен в механизм нейроглиального взаимодействия, обеспечивающего регуляцию синаптических связей.

2. На основании комплекса экспериментов и данных литературы предложена схема регуляции экспрессии *S100B* при формировании ДВП. В качестве ключевых посредников влияния тетанизации на экспрессию *S100B* выступают Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CaMK). Одним из транскрипционных факторов, контролирующих связанную с индукцией ДВП экспрессию *S100B*, оказался p53, что является первым свидетельством его участия в регуляции экспрессии генов при ДВП.
3. Максимальное увеличение связывания p53 с ДНК при ДВП совпадает по времени с уменьшением суммарного уровня белка p53. Таким образом, индукция ДВП сопровождается одновременной активацией позитивных и негативных регуляторов p53, скоординированная работа которых формирует кратковременный биохимический «потенциал действия».
4. Формирование ДВП сопровождается избирательным изменением экспрессии генов-мишеней p53, что объясняется их сложной регуляцией.
5. К вероятным функциям p53-зависимого компонента транскрипционной программы ДВП могут быть отнесены трофическая поддержка клеток мозга в условиях повышенной функциональной нагрузки и гомеостатическое ограничение эффективности возбуждающих синапсов, необходимое для стабильного функционирования мозга.

Научная новизна полученных результатов. Впервые продемонстрировано увеличение экспрессии гена, кодирующего специфичный для глиальных клеток белок *S100B*, после индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа.

Исследовано влияние различных элементов внутриклеточных регуляторных каскадов на базальную и связанную с индукцией ДВП экспрессию *S100B*. Показано, что убиквитинлигаза Mdm2 и деацетилаза Sirt1 существенно ограничивают базальный уровень мРНК *S100B*, а его увеличение, индуцированное высокочастотной стимуляцией афферентных волокон, зависит от глутаматных рецепторов NMDA-типа (NMDAR) и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ.

Впервые доказано участие транскрипционного фактора p53 в регуляции генов при формировании долговременной потенциации. Обнаружено, что индукция ДВП в гиппокампе сопровождается временным увеличением связывания p53 с промотором гена *S100B*, что и является одной из причин изменения его экспрессии.

Выявлено снижение количества белка p53 при формировании ДВП и показана ключевая роль Mdm2 и Sirt1 в этом феномене.

Идентифицирована группа генов, в регуляции которых при ДВП, возможно, принимает участие p53. Эта группа включает в себя некоторые мишени p53 из семейства *Bcl2*: впервые показано, что в ранней фазе ДВП увеличивается экспрессия *Bax* и уменьшается экспрессия *Bcl2*.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что при формировании долговременной потенциации синаптической передачи генетический аппарат астроцитов оказывается вовлеченным в механизм нейроглиального взаимодействия, отвечающего за тонкую настройку синаптических связей.

Практическая ценность работы. Полученные данные расширяют понимание клеточных механизмов пластичности. Идентификация регуляторной сети, контролирующей экспрессию S100B, может быть полезна для выяснения причин увеличения уровня этого белка в мозге при некоторых заболеваниях, а также для оценки перспектив использования регуляторных факторов в качестве мишеней фармакологического воздействия.

Результаты работы открывают также новое перспективное направление в исследовании молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности, связанное с изучением путей активации и роли p53 в нейропластичности, расширяют потенциальную информативность модели долговременной потенциации в срезах гиппокампа при анализе действия биологически активных веществ.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертации доложены на: I, II и III Всероссийских конференциях с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, 2009, 2012, 2015); научной конференции «Медицинская геномика и протеомика» (Новосибирск, 2009); Всероссийской конференции с международным участием «Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга» (Москва, 2010); IX и XI Международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2013, 2015); Межлабораторном семинаре по генетике животных (Институт Цитологии и Генетики СО РАН, 2014).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа объемом 200 страниц состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и указателя цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 446 источников. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками, содержит 8 таблиц.

Личный вклад автора и благодарности. Все выносимые на защиту результаты получены с участием соискателя. Соискателю принадлежит следующее: выбор параметров электрофизиологической модели нейропластичности, идеи применения ингибиторов для изучения механизмов выявленных феноменов, проведение электрофизиологических экспериментов, обработка и анализ основного полученного материала. Автор выражает благодарность В.О.Пустыльняку (НИИМББ) за выполнение биохимических экспериментов.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 1085 срезах гиппокампа, полученных от 301 крысы-самца Wistar (возраст 1,5-3 мес), выращенных в виварии Института Цитологии и Генетики (г. Новосибирск). Животных содержали в условиях свободного доступа к пище и воде при световом режиме 12 ч день/12 ч ночь.

После декапитации мозг помещали в холодный (1-3 °С) аэрированный (95% O₂, 5% CO₂) физиологический раствор следующего состава (мМ): NaCl – 126, KCl – 4, NaH₂PO₄ – 1,24, MgSO₄ – 1,3, CaCl₂ – 2, NaHCO₃ – 26, глюкоза – 10, pH 7,4. Поперечные срезы (толщина 400 мкм) дорзальной части гиппокампа помещали в проточную (2 мл/мин, 22-24 °С) камеру на 30 мин, затем температуру поднимали до 32-33 °С.

Внеклеточный регистрирующий и стимулирующие электроды помещали в пирамидном и радиальном слоях поля CA1 соответственно (рис. 1). Интенсивность стимула подбирали таким образом, чтобы амплитуда п-спайка в ответе составляла ~50% максимальной. Для тетанизации использовали 4 серии стимулов (100 Гц, 1 с) с интервалом 30 с, для низкочастотной стимуляции (НС) – 400 стимулов в течение 91 с (4,4 Гц).

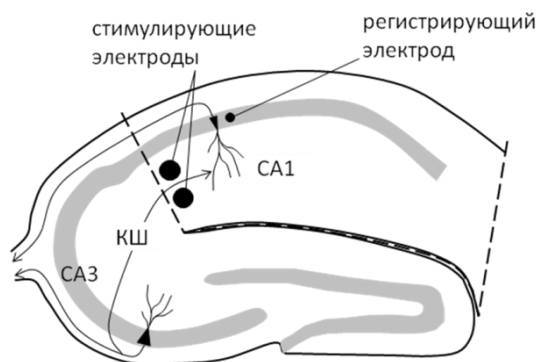


Рис. 1. Расположение электродов в срезе гиппокампа.

Пунктиром выделена область (CA1), вырезавшаяся в конце эксперимента для проведения биохимических анализов. КШ – коллатерали Шаффера.

Для проведения биохимических анализов от каждого животного брали по 4 среза гиппокампа. При исследовании влияния тетанизации или НС на динамику экспрессии генов в интервале до 2 ч (включительно) после стимуляции один из срезов служил контролем и не подвергался никаким манипуляциям в течение всего времени инкубации (4,5 ч), три других тетанизировали или подвергали низкочастотной стимуляции за 10-120 мин до окончания инкубации. Электроды устанавливали на срез за 5 мин до и убирали сразу после стимуляции. При исследовании влияния тетанизации на экспрессию *S100B* через 4-6 ч после тетанизации, два среза из четырех стимулировали через 2,5 ч после приготовления, затем стимулированные и контрольные срезы извлекали из камеры попарно через соответствующие промежутки времени. Для приготовления образцов РНК/белка объединяли по 3-5 срезов от разных животных.

В экспериментах с экзогенными лигандами или растворителем тетанизацию одного среза проводили через 3 ч 45 мин после приготовления срезов, второго – через 4 минуты, после чего оставляли срезы в камере еще на 30 мин (при изучении эффектов МК-801 или *nutlin-3*) или на 20 мин (в остальных случаях). Два контрольных среза извлекали из камеры в интервале между извлечениями тетанизированных срезов.

Ингибиторы (кроме МК-801) растворяли в ДМСО, МК-801 – в воде, аликвоты хранили при -20°C . Концентрация маточных растворов подбиралась таким образом, чтобы концентрация ДМСО в рабочем растворе составляла 0,1%. Физиологический раствор с МК-801 подавали в экспериментальную камеру за 20 мин до и отмывали через 10 мин после начала тетанизации. Остальные препараты или ДМСО добавляли к протоке за 30 мин до тетанизации и оставляли до окончания эксперимента.

Были изучены эффекты ингибитора убиквитинлигазы Mdm2 *nutlin-3* (20 мкМ, количество экспериментов в контрольной группе $n_1=4$, количество экспериментов с ингибитором $n_2=4$), ингибитора СаМК KN-93 (5 мкМ, $n_1=n_2=3$) и его неактивного аналога KN-92 (5 мкМ, $n_1=n_2=3$), ингибитора протеинкиназ K-252a (10-200 нМ, $n_1=n_2=4$), ингибиторов MAPK киназы MEK1 (PD 98059, 40 мкМ, $n_1=n_2=3$), MAP киназы p38 (SB 202190, 1 мкМ, $n_1=n_2=3$), RSK (BRD7389, 10 мкМ, $n_1=4$, $n_2=3$), протеинкиназ C и RSK2 (*bisindolylmaleimide I*, 100 нМ, $n_1=n_2=3$), деацетилазы Sirt1 (EX-527, 1 мкМ, $n_1=n_2=4$), ингибитора p53-зависимой транскрипции *pifithrin-β* (5 мкМ, $n_1=n_2=3$), блокатора глутаматных рецепторов NMDA-типа МК-801 (10 мкМ, $n_1=5$, $n_2=4$). Указанные значения n соответствуют количеству пар (интактный/тетанизированный) образцов РНК, для получения которых объединяли по 4 среза от двух животных.

По окончании инкубации поле CA1 вырезали (рис. 1), и использовали для проведения биохимических анализов.

Для определения уровня мРНК проводили ПЦР в реальном времени с использованием iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad Laboratories) на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения был выбран *β-actin*. Оптимальная концентрация всех пар праймеров в реакционной смеси составила 300 нМ. ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 25 нг кДНК, в следующих условиях: предварительный прогрев (95 °С, 3 мин), затем 40 циклов: денатурация (95 °С, 15 с), отжиг (58 °С, 20 с), элонгация (72 °С, 20 с), измерение флуоресценции (80 °С, 10 с). Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. Относительный уровень мРНК оценивали с использованием значений пороговых циклов C_T с учетом эффективностей реакций (E) исследуемого гена и гена сравнения.

При изучении экспрессии мишеней p53 через 30 мин после тетанизации для проведения ПЦР в реальном времени использовали прибор CFX96 (Bio-Rad) и набор праймеров "p53 Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array" (PARN-027Z, Qiagen). Указанный набор содержал, в частности, праймеры для мРНК *Egr1* и *Jun*. Полученные для этих генов данные были объединены с результатами измерения на IQ5. Кроме того, для статистической оценки изменения уровней мРНК *Egr1*, *Fos*, *Jun* и *JunB* через 30 мин после тетанизации использовали данные, полученные с использованием набора "Synaptic Plasticity RT² Profiler PCR Array" (PARN-126Z, Qiagen).

Для иммунохимической детекции белков 30 мг белка разделяли электрофорезом по методу Лэммли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали сначала со специфичными первичными антителами, затем с конъюгатом вторичных антител с пероксидазой. Визуализацию иммунореактивных полос проводили с использованием ECL-набора Visualizer Spray and Glow (Millipore).

Метод хроматиновой иммунопреципитации представлен в тексте диссертации. Анализ ДНК, преципитирующей с антителами против p53, проводили методом ПЦР с использованием праймеров для областей -760/-559 (Site1), -509/-309 (Site2) и +1/+205 (Site3) гена *S100B* крысы [нумерация нуклеотидов – от старта транскрипции, определенного Nagiwa and Sueoka (1995)].

Для оценки достоверности отличий использовали t-критерий Стьюдента, критерий знаков и ANOVA. Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения применяли метод Бенджамини-Хохберга (контроль FDR, false discovery rate). Данные приводятся в виде "среднее ± стандартная ошибка среднего", если не указано иное.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка эффективности протоколов стимуляции

Как показано на рисунке 2, использованный протокол тетанизации вызывал значительное увеличение амплитуды вызванных стимуляцией коллатералей Шаффера п-спайков в поле СА1, которое сохранялось в течение всего времени наблюдения (3 ч). Низкочастотная стимуляция тем же количеством стимулов, распределенных равномерно в течение того же временного интервала, что и при тетанизации, не изменяла амплитуду ответов. Добавление в перфузирующий раствор ДМСО (0,1%) не оказывало влияния на базальный уровень ответов или динамику потенциации (не представлено).

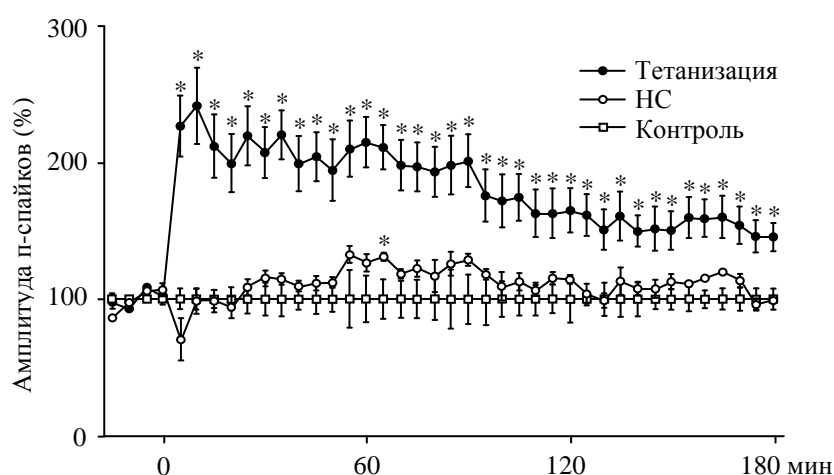


Рис. 2. Влияние тетанизации и низкочастотной стимуляции на амплитуду п-спайков в пирамидном слое поля СА1 срезов гиппокампа крыс.

П-спайки были вызваны стимуляцией коллатералей Шаффера. В контрольных экспериментах проводилось только тестирование ответов нейронов на стимуляцию КШ. Абсцисса – время после начала тетанизации (n=5) или НС (n=3). Ордината – амплитуда п-спайка, нормированная сначала относительно средней амплитуды ответов на 4 стимула, предшествовавших тетанизации или НС, затем относительно средней амплитуды ответов в соответствующей временной точке в контрольной группе (n=4). * $p < 0,05$, относительно контрольной группы, t -критерий Стьюдента.

2. Динамика уровня мРНК *S100B* и *S100A1* после тетанизации или низкочастотной стимуляции в поле СА1 гиппокампа крыс

Влияние тетанизации на экспрессию *S100B* и *S100A1* оказалось различным (рис. 3). Уже через 30 мин после тетанизации наблюдалось значительное увеличение уровня мРНК *S100B*, затем ее уровень постепенно снижался и через 120 мин после тетанизации мало отличался от контроля. Содержание мРНК *S100A1*, напротив, медленно нарастало в течение часа и оставалось на достигнутом уровне до конца эксперимента.

НС не изменяла экспрессию *S100B* и *S100A1* (рис. 3). Следовательно, наблюдаемые после индукции ДВП изменения экспрессии *S100B* и *S100A1* не связаны с механическим повреждением срезов электродами или неспецифическими эффектами электростимуляции, а зависят от определенного паттерна нейронной активности, необходимого для запуска процессов нейропластичности.

Таким образом, нам удалось получить модель ассоциированной с нейропластичностью регуляции генов *S100*, которая согласуется с неоднократно продемонстрированным эффектом увеличения количества белков S100 в мозге при обучении (Hydén and Lange, 1970; Алексидзе и др., 1982; Громов и др., 1991; Шерстнев и др., 2001).

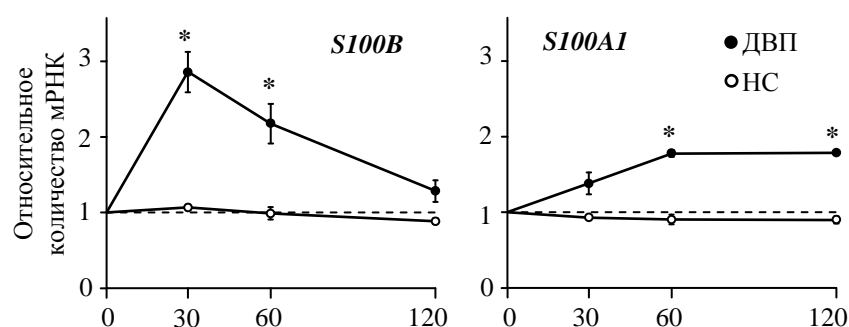


Рис. 3. Динамика мРНК *S100B* и *S100A1* в поле СА1 гиппокампа после тетанизации (ДВП) или низкочастотной стимуляции.

Ордината – относительное количество мРНК. Уровень мРНК в нестимулированных срезах принят за 1. Абсцисса – время после начала стимуляции (мин). *S100B* (ДВП) – $n=4$, в остальных случаях $n=3$. * $p<0,05$, парный t-критерий. Контроль FDR при $m=6$.

3. Динамика уровня мРНК ранних генов *Fos*, *Jun*, *JunB* и *Egr1* после индукции ДВП в поле СА1 гиппокампа крыс

В гене *S100A1* крысы есть потенциальная AP-1-связывающая последовательность, а в промоторе *S100B* крысы – потенциальные сайты связывания Egr1. Мы попытались оценить возможность участия в индукции экспрессии *S100B/A1* при ДВП транскрипционных факторов Fos, Jun, JunB (компонентов комплекса AP-1) и Egr1. Поскольку их активность в значительной мере определяется уровнем экспрессии, мы сравнили динамику мРНК указанных ранних генов (рис. 4) и *S100B/A1*.

После тетанизации содержание мРНК *Egr1*, *JunB* и *Jun* постепенно нарастало. Содержание мРНК *Fos* увеличивалось через 30 мин после тетанизации, затем возвращалось к исходному уровню, а на 120-й минуте вновь наблюдалась тенденция к увеличению.

В динамике экспрессии *S100A1* и *JunB* наблюдалось заметное сходство. Коэффициент корреляции (r) средних значений относительных уровней мРНК *S100A1* и *JunB* составил 0,98 ($p < 0,0005$). Это позволяет сформулировать гипотезу о возможном вовлечении JunB в регуляцию гена *S100A1* при формировании ДВП. Что же касается *S100B*, то динамику его экспрессии, очевидно, определяет не Egr1.

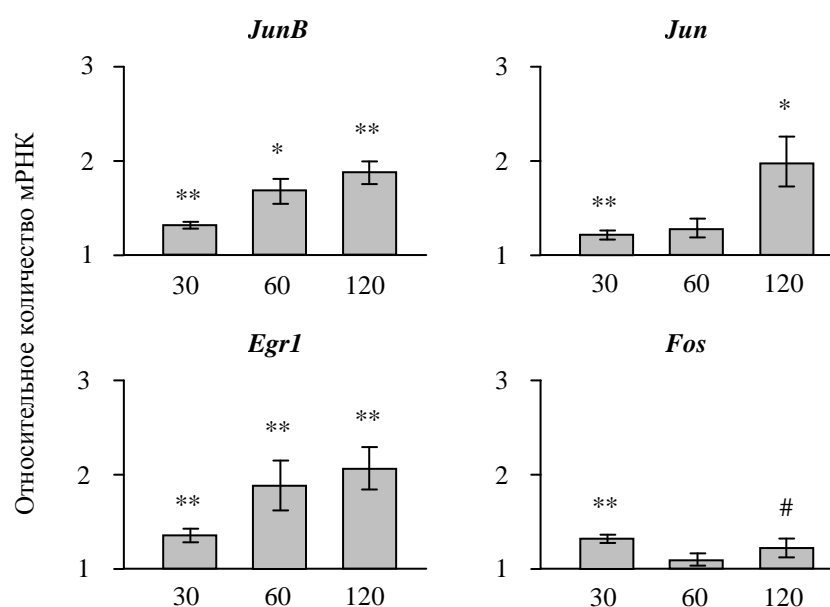


Рис. 4. Динамика экспрессии *Fos*, *Jun*, *JunB* и *Egr1* в поле СА1 срезов гиппокампа крыс после индукции ДВП.

Ордината – относительное количество мРНК в образцах. Уровень мРНК в контроле принят за 1. Абсцисса – время после стимуляции (мин). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (парный t-критерий Стьюдента), # – $p < 0,05$ (критерий знаков). *JunB* (30 мин) – $n=8$, *Jun* и *Egr1* (30 мин) – $n=12$, *Fos* (30 мин) – $n=10$, *Fos* (60 и 120 мин) – $n=6$, в остальных случаях $n=4$. Контроль FDR при $m=12$.

4. Экспрессия *S100B* во временном интервале 10-360 мин после тетанизации

Дальнейший анализ мы ограничили геном *S100B*, поскольку уровень его экспрессии намного превышает экспрессию других генов семейства *S100* в мозге крыс (Baudier et al., 1985; Kuwano et al., 1987). Чтобы точнее представлять себе временные параметры развития регуляторных процессов, мы более детально исследовали динамику экспрессии *S100B* после индукции потенциации, как на ранней стадии, так и на поздней, поскольку продемонстрированное ранее (Неврони et al., 1998) снижение уровня мРНК *S100B* в зубчатой извилине крыс через 6 ч после индуцированных каинатом судорог позволяло предположить, что в нашей модели фаза восстановления экспрессии *S100B* в интервале 30-120 мин после тетанизации может перейти в фазу подавления экспрессии на более поздних этапах.

Оказалось, что содержание мРНК *S100B* в поле CA1 заметно увеличивается уже через 10 мин после тетанизации (рис. 5). Максимальное увеличение содержания мРНК *S100B* наблюдается через 20-30 мин после тетанизации, затем ее количество уменьшается. Таким образом, ключевые регуляторные события, определяющие динамику экспрессии *S100B* при формировании ДВП приходятся на первые 40 мин после тетанизации.

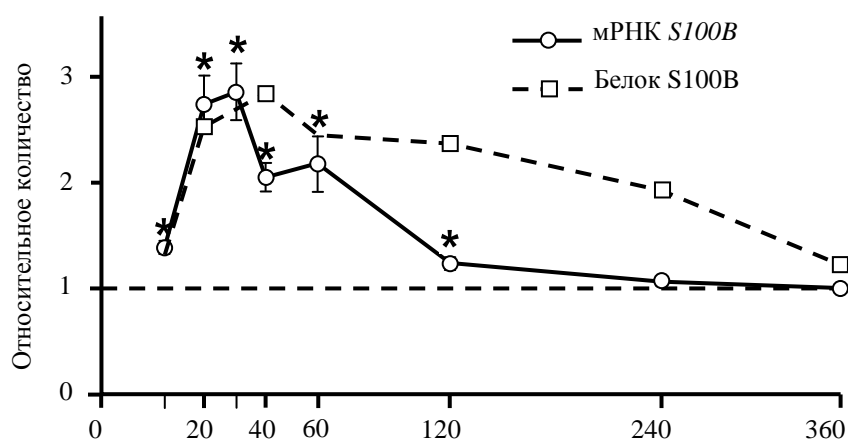


Рис. 5. Изменение содержания мРНК и белка *S100B* в поле CA1 гиппокампа крысы после тетанизации коллатералей Шаффера.

Ордината — количество мРНК или белка *S100B*, нормированное относительно β -актина и контроля. Абсцисса — время (мин) от начала тетанизации. Отмечены достоверные отличия уровня мРНК от контроля: * — $p < 0,05$, парный t-критерий. Контроль FDR при $m=8$. Изменения количества белка достоверны в диапазоне 20-240 мин ($m=7$). Количество независимых экспериментов для белка $n=3$, для мРНК $n=3$ для точек 10, 20, 40, 240 и 360 мин, $n=4$ для 30 и 60 мин, $n=9$ для 120 мин после тетанизации.

Отличие наших результатов от данных авторов, показавших снижение уровня мРНК *S100B* в срезах зубчатой извилины мышей через 30-120 мин после тетанизации перфорантного пути (Park et al., 2006) и в зубчатой извилине крыс через 6 часов после индуцированной каинатом судорожной активности (Nevroni et al., 1998), может свидетельствовать об особой регуляции гена *S100B* в зубчатой извилине, отличающейся как от CA1, так и от других отделов мозга, в которых наблюдается увеличение количества белка *S100B* после обучения (Шерстнев и др., 2001). Кроме того, эксперименты Park et al. (2006) проводились при пониженной (комнатной) температуре, что могло исказить динамику регуляторных процессов, а в экспериментах Nevroni et al. (1998) судорожная активность, в сочетании с действием каината, могла приводить к чрезмерной активации глутаматных рецепторов, что, теоретически, также могло оказать негативное влияние на экспрессию *S100B*, поскольку зависимость физиологических процессов от интенсивности регулирующих воздействий часто имеет инвертированную U-образную форму.

5. Участие p53 в регуляции *S100B* при формировании ДВП

Анализ промотора гена *S100B* крысы показал наличие потенциальных p53-респонсивных элементов (p53-PE). Мы исследовали ДНК-связывающую активность p53 в срезах при ДВП с помощью метода хроматиновой иммунопреципитации (ChIP).

Как было показано в предыдущем разделе, уровень мРНК *S100B* увеличивается уже через 10 мин и достигает максимума через 20-30 мин после тетанизации. Оказалось, что именно в этом временном интервале, причем с той же динамикой, значительно увеличивается способность p53 связываться с промотором *S100B* (рис. 6).

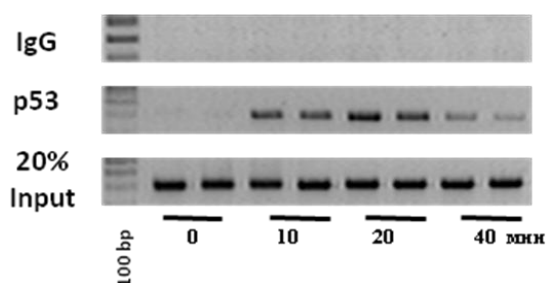


Рис. 6. Связывание p53 с промотором гена *S100B* (Site 2) в поле CA1 гиппокампа крыс через 10, 20 и 40 мин после тетанизации и в контрольных образцах (0 мин).

Иммунопреципитация хроматина с антителами против p53 или нормальным кроличьим IgG. Участки ДНК амплифицировали с помощью ПЦР и разделяли в агарозном геле.

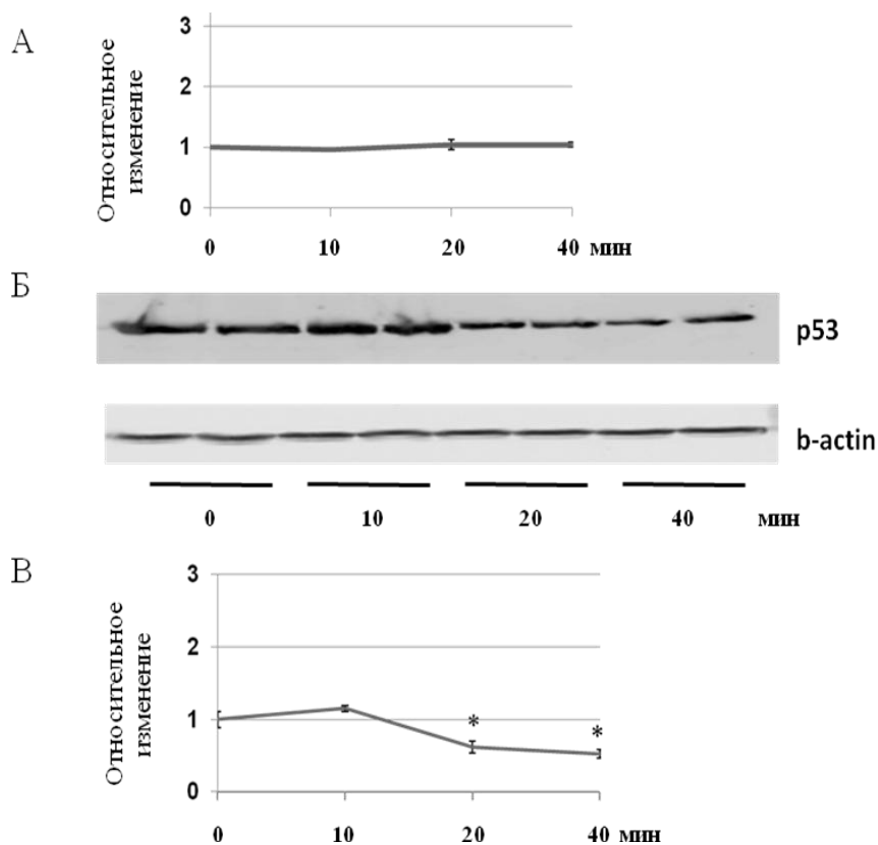


Рис. 7. Влияние тетанизации на экспрессию *p53* в поле СА1 гиппокампа крыс.

Горизонтальная ось – время от начала тетанизации. (А) Относительное содержание мРНК *p53* (контроль принят за 1), $n=3$. (Б) Репрезентативные данные Вестерн блот анализа для *p53* и β -актина. (В) Уровень белка *p53* по данным денситометрии, нормализованный относительно β -актина и контроля.

Увеличение ДНК-связанной фракции *p53* не было вызвано ростом общего количества белка *p53* (рис. 7, Б, В), что указывает на активацию *p53* за счет посттрансляционных модификаций. Количество белка *p53* даже уменьшалось через 20 мин после тетанизации, хотя содержание его мРНК не изменялось (рис. 7), что свидетельствует о снижении скорости трансляции мРНК или ускоренной деградации белка *p53*.

Для дополнительной проверки функциональности связывания *p53* с промотором *S100B* было изучено влияние на экспрессию *S100B* ингибитора *p53* пифитрина- β и его активаторов нутлина-3 и ЕХ-527, являющихся ингибиторами негативных регуляторов *p53* – убиквитинлигазы Mdm2 и деацетилазы Sirt1 соответственно (рис. 8).

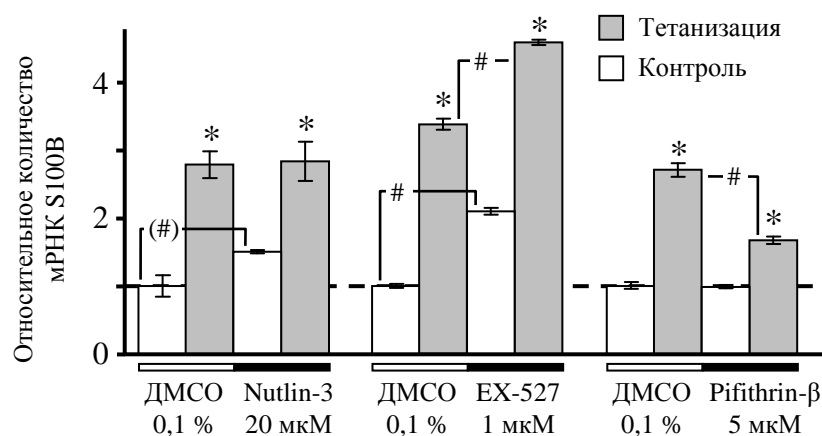


Рис. 8. Влияние регуляторов активности p53 на экспрессию *S100B* в поле CA1 гиппокампа крысы.

Содержание мРНК *S100B* нормировали относительно β -актина, затем относительно среднего уровня мРНК *S100B* в нететанизированных срезах, инкубированных в растворителе. Для контроля FDR соответствующие сравнения, представленные на рис. 8 и 10, сведены в одну группу, для экспериментов с растворителем $m=11$, для экспериментов с экзогенными лигандами $m=12$. * $p<0,05$, относительно соответствующего контроля, парный t-критерий,; # $p<0,05$, t-критерий. Индикатор уровня значимости, не выдержавшего коррекции на множественные сравнения, заключен в скобки.

Оба активатора p53 увеличивали базальный уровень мРНК *S100B* (рис. 8), однако тетанизация в их присутствии приводила к дальнейшему росту количества мРНК *S100B* после тетанизации. Это может свидетельствовать о том, что в индукцию экспрессии *S100B* при потенциации вовлечены, кроме p53, какие-то дополнительные факторы, что подтверждается также неполной блокадой индуцированной тетанизацией экспрессии *S100B* в присутствии пифитрина- β .

Результаты экспериментов с пифитрином- β , EX-527 и нутлином-3 подтверждают, что экспрессия гена *S100B* крысы, как и у человека (Lin et al., 2004), позитивно регулируется транскрипционным фактором p53. При этом в состоянии покоя p53 неактивен и не участвует в поддержании базального уровня транскрипции *S100B*. Индукция ДВП сопровождается временным связыванием p53 с промотором *S100B*, что вносит существенный вклад в увеличение экспрессии *S100B*.

6. Регуляция уровня белка p53 при формировании ДВП

Уменьшение количества белка p53 через 20 мин после тетанизации свидетельствует о росте активности его негативных регуляторов при индукции ДВП. К важнейшим

регуляторам p53 относятся убиквитинлигаза Mdm2 и деацетилаза Sirt1. Чтобы оценить вклад Mdm2 и Sirt1 в регуляцию p53 при формировании ДВП, мы исследовали влияние их ингибиторов на индуцированное тетанизацией снижение уровня белка p53.

Добавление в экспериментальную камеру растворителя (0,1% ДМСО) не влияло на динамику экспрессии p53 при развитии ДВП. Через 20-30 мин после тетанизации содержание белка p53 в поле CA1 снижалось, а количество мРНК p53 оставалось неизменным (рис. 9), что согласуется с данными, полученными с использованием нормального физиологического раствора (рис. 7).

Ингибирование как Mdm2, так и Sirt1 полностью блокировало уменьшение количества белка p53 после тетанизации (рис. 9, Б, Г).

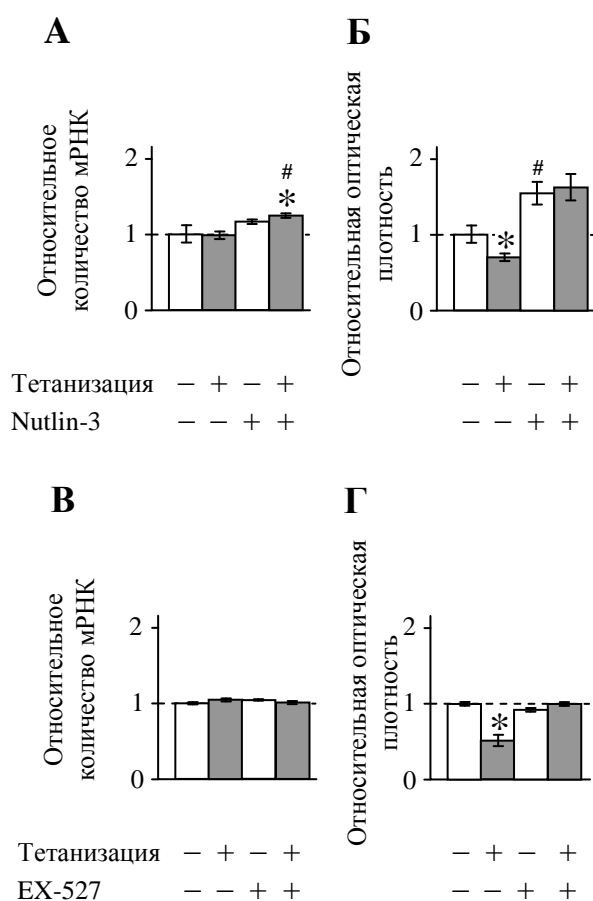


Рис. 9. Влияние ингибиторов Mdm2 (нутлин-3) и Sirt1 (EX-527) и тетанизации на уровни мРНК и белка p53 в поле CA1.

(А, В) Относительное количество мРНК p53. (Б, Г) Данные денситометрического анализа Вестерн блотов. * – $p < 0,05$, относительно соответствующего контроля (нететанизированные срезы), парный t-критерий; # – $p < 0,05$, относительно соответствующих групп "Тетанизация(-)/Ингибитор(-)", t-критерий; $n=4$ для всех групп. Срезы извлекали из экспериментальной камеры через 30 (А, Б) или 20 мин (В, Г) после тетанизации.

Таким образом, тандем Sirt1/Mdm2 играет ключевую роль в уменьшении количества белка p53 при индукции долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа. Принимая во внимание значительное влияние ацетилирования p53 на его активность, а также преимущественно ядерную локализацию Sirt1, можно предположить, что Sirt1 вносит также существенный вклад в быструю инактивацию p53 при формировании ДВП.

7. Вклад глутаматных рецепторов NMDA-типа и протеинкиназ в регуляцию *S100B* при формировании ДВП

Чтобы более детально выяснить механизмы регуляции *S100B*, мы изучили влияние ингибиторов различных сигнальных факторов на индуцированную тетанизацией экспрессию *S100B*. Наиболее вероятные причины зависимости экспрессии *S100B* от частоты стимуляции коллатералей Шаффера – 1) более интенсивное вытекание глутамата из синаптической щели при тетанизации и, соответственно, активация большего числа глутаматных рецепторов (например, метаботропных) на астроцитах и 2) участие в процессе рецепторов NMDA-типа, для активации которых важна суммация возбуждающих постсинаптических потенциалов. Для оценки роли NMDAR в индукции экспрессии *S100B* мы использовали МК-801. Тетанизация в присутствии МК-801 приводила к увеличению содержания мРНК *S100B* в образцах через 30 мин после тетанизации, однако это увеличение было значительно менее выражено, чем в норме (рис. 10).

Ингибитор CaMK KN-93 полностью блокировал увеличение экспрессии *S100B* через 20 мин после ДВП, тогда как KN-92 (неактивный аналог KN-93) не оказывал влияния на уровень мРНК *S100B* (рис. 10). Эти результаты указывают на ключевую роль CaMK в регуляции экспрессии *S100B* при ДВП.

К-252а обладает широким спектром активности. Из известных мишеней, наиболее эффективно он ингибирует CaMKII и тирозинкиназные рецепторы нейротрофинов (Trk).

Чтобы разделить эффекты влияния К-252а на разные мишени, мы сравнили действие препарата в двух концентрациях: 200 нМ (наиболее часто используемая) и 10 нМ, при которой слабо выражены активация FAK (Maroney et al., 1995) и ингибирование протеинкиназ А и С (Kase et al., 1987), однако сохраняется существенное, более чем вдвое, подавление активности Trk (Berg et al., 1992) и CaMKII (Hashimoto et al., 1991).

К-252а существенно подавлял увеличение экспрессии *S100B*, индуцированное тетанизацией (рис. 10). Эффект препарата не зависел от концентрации и, следовательно, был связан преимущественно с ингибированием CaMK и/или Trk, а протеинкиназы А, С и FAK не влияли существенно на экспрессию *S100B* в этих условиях.

Ингибирование MAPK киназы MEK1 (PD 98059, 40 мкМ) не влияло на уровень мРНК *S100B* (рис. 10). Этот результат согласуется с данными Kurino et al. (1995), показавшими, что аппликация глутамата не оказывает влияния на активность MAP/ERK киназ в культивируемых астроцитах, в отличие от нейронов.

Ингибирование кальций-зависимых изоформ протеинкиназы C (bisindolylmaleimide I), MAP киназ p38 α / β (SB202190) и RSK (BRD7389) приводило к умеренному, но достоверному снижению экспрессии *S100B*, индуцированной тетанизацией, по сравнению с контрольными экспериментами (рис. 10).

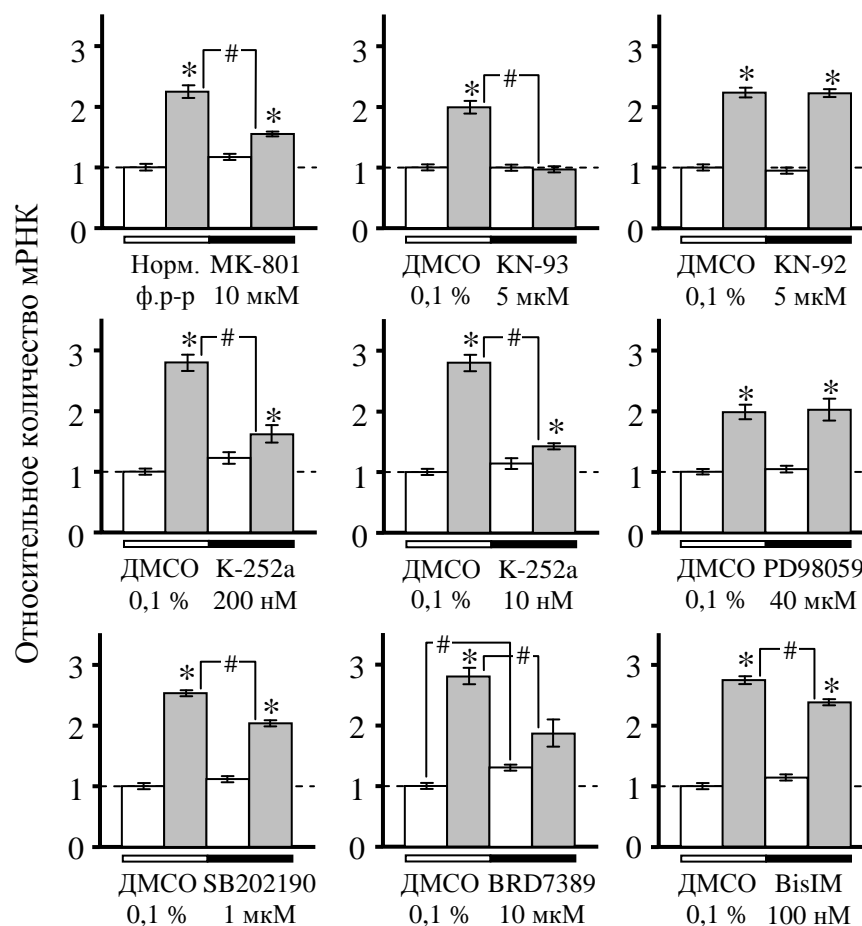


Рис. 10. Влияние ингибиторов NMDAR и протеинкиназ на экспрессию *S100B* в поле CA1 гиппокампа крысы.

Темные столбцы – тетанизированные срезы, светлые – контроль. Содержание мРНК *S100B* нормировали относительно β -актина, затем относительно среднего уровня мРНК *S100B* в нететанизированных срезах, инкубированных в растворителе. Референсная группа (эксперименты с ДМСО) для 10 и 200 нМ К-252а – общая. * $p < 0,05$, относительно соответствующего контроля, парный t-критерий; # $p < 0,05$, t-критерий. Для контроля FDR соответствующие сравнения, представленные на рис. 8 и 10, сведены в одну группу.

Производные бисиндолилмалеимида с близкой эффективностью ингибируют как протеинкиназу Ca, так и RSK2 (Bain et al., 2007). С учетом известной роли RSK2 в регуляции транскрипции при формировании ДВП (Miyamoto, 2006) и регуляции активности p53 (Cho et al., 2005), а также результатов экспериментов с BRD7389, представляется более вероятным, что влияние bisindolylmaleimide I на экспрессию *S100B* было связано именно с ингибированием RSK2, а не протеинкиназ C.

Таким образом, полученные результаты указывают на ключевую роль глутаматных рецепторов NMDA-типа и CaMK в регуляции экспрессии *S100B*, индуцированной нейронной активностью, хотя вклад отдельных CaMK остается неясным. Вопрос о локализации NMDAR также остается открытым. Активация постсинаптических нейронных NMDAR приводит к увеличению внеклеточной концентрации калия и, как следствие, деполяризации пресинаптических терминалей и усилению выброса глутамата (Shih et al., 2013), что, в конечном счете, может приводить к увеличению внутриклеточной концентрации кальция в астроцитах, например, благодаря активности метаботропных рецепторов глутамата. Протеинкиназы MAPK p38 и RSK2 также могут быть вовлечены в индукцию экспрессии *S100B*, тогда как участие MAPK/ERK киназы MEK1 представляется маловероятным, что ставит вопрос о путях активации RSK2, поскольку "типичный" путь предполагает посредничество именно MAPK/ERK (Romeo et al., 2012). Существуют альтернативные пути регуляции RSK, например, через p38–MK2/3 (Romeo et al., 2012), поэтому можно предположить следующую последовательность регуляторных событий, приводящих к кальций-зависимой трансактивации гена *S100B*: CaMK–ASK1–p38–MK2–RSK2–p53–*S100B*. В то же время нельзя исключить, что влияние p38 и RSK на экспрессию *S100B* опосредуется не через p53, а через другие транскрипционные факторы.

8. Экспрессия генов-мишеней p53 в ранней фазе долговременной потенциации

Обнаруженное увеличение активности p53 после индукции ДВП закономерно ставит вопрос о масштабе влияния p53 на динамику транскриптома при формировании ДВП. Чтобы ответить на него, мы использовали набор праймеров "p53 Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array" ("Qiagen"), позволяющий измерять уровень мРНК 84-х генов, функционально связанных с p53, из которых порога детекции ($C_T < 35$) в наших образцах достигли 80, в том числе 50 генов, прямо (благодаря связыванию с промотором или белок-белковому взаимодействию с непосредственными активаторами транскрипции) или опосредованно (через влияние на экспрессию других транскрипционных факторов) регулируемых фактором p53.

Было проведено сравнение влияния тетанизации на динамику мРНК в норме и на фоне активации р53-зависимой транскрипции нутлином-3 (Vassilev et al., 2004). Если вклад р53 в индуцируемые тетанизацией процессы в норме значителен, характер влияния тетанизации на экспрессию гена в присутствии нутлина-3 должен существенно измениться по сравнению с нормальным раствором. Для количественной оценки вклада р53 в регуляцию исследованных генов использовали модель, которая описывается следующими уравнениями:

$$T_p/K_p = f_n \cdot f \quad (1),$$

$$T_n/K_n = f \quad (2),$$

где T_p , K_p , T_n , K_n – уровни мРНК в тетанизованных (Т) и контрольных (К) срезах, инкубированные в растворителе (р) или нутлине-3 (н), f_n и f – эффекты нутлин-3-зависимого и -независимого факторов соответственно. Равенство параметров f_n и f единице означает отсутствие эффекта, величины больше или меньше 1 свидетельствуют, соответственно, об активирующем или репрессорном влиянии на экспрессию гена.

ANOVA (нутлин-3 (растворитель, нутлин-3) × тетанизация (контроль, тетанизация)) с повторными измерениями в факторе "тетанизация" выявил 33 гена, экспрессия которых характеризовалась достоверным эффектом межфакторного взаимодействия, что может свидетельствовать о существенном вкладе нутлин-3-зависимого фактора в регуляцию этих генов при ДВП (табл. 1). Среди них оказалось 11 (с поправкой на множественные сравнения – 8) генов, для которых показан прямой контроль со стороны р53. Для всех 11-ти эффект нутлин-3-зависимого фактора (f_n) совпал с известным из литературы типом р53-зависимой регуляции (табл. 1, TP; ссылки в табл. 5 диссертации). Этот результат косвенно подтверждает вовлечение р53 в регуляцию значительного количества генов при ДВП.

В то же время необходимо принимать во внимание, что р53 – не единственная мишень Mdm2 (Biderman et al., 2012). Mdm2 влияет также на активность других транскрипционных факторов, поэтому для подтверждения участия р53 в регуляции исследованных генов необходимы дополнительные исследования, включающие прямую проверку связывания р53 с промоторами методом хроматиновой иммунопреципитации.

В контексте синаптической пластичности существенный интерес представляет динамика экспрессии генов семейства *Bcl2*. В этом семействе более 20 белков, которые разделяются на две основные группы – проапоптозные (Bax, Bbc3/Puma, Pmaip1/Noxa и др.) и антиапоптозные (Bcl2, Mcl1 и др.) (Aouacheria et al., 2005). Они способны взаимодействовать друг с другом и с р53, регулируя проницаемость митохондриальной мембраны для цитохрома с и, как следствие, активность протеолитических ферментов,

каспаз (Kuribayashi and El-Deiry, 2008; Vaseva and Moll, 2009). Таким образом, баланс членов семейства Bcl2 в значительной мере определяет их активность.

Показано вовлечение белков семейства Bcl2 в механизмы долговременной синаптической депрессии (Li and Sheng, 2012). Кальций, входящий в постсинаптические нейроны, стимулирует протеинфосфатазы, что приводит к последовательной индукции проапоптозных белков семейства Bcl2 – Bad и Bax. Кратковременная активация Bax приводит к ограниченной активации протеолитических ферментов, каспаз, что, в конечном счете, вызывает эндоцитоз глутаматных рецепторов АМРА-типа и, как следствие, снижение эффективности синаптической передачи.

p53 может регулировать активность белков этого семейства не только за счет прямых белок-белковых взаимодействий, но и благодаря своему влиянию на транскрипцию их генов. В частности, p53 активирует экспрессию *Bax*, *Bbc3/Puma*, *Bid*, *Pmaip1/Noxa* и является репрессором для *Bcl2*.

Таблица 1. Экспериментально определенные параметры модели влияния тетанизации и нутлина-3 на экспрессию генов.

Ген	TP	f _n	f	Ген	TP	f _n	f	Ген	TP	f _n	f
<i>Apex1</i>		1,1	1	<i>Cdc25a</i>	–	0,8	1,3	<i>Nfkb1</i>		1,1	1,1
<i>Atm</i>		1,2	1,1	<i>Cdk1</i>	–	0,8	1,3	<u><i>(Pmaip1)</i></u>	+	1,3	1,2
<u><i>(Bag1)</i></u>		1,1	1	<u><i>Chek2</i></u>	–	0,9	1,2	<u><i>Prkca</i></u>	–	0,8	1,6
<u><i>(Bax)</i></u>	+	1,4	1	<u><i>(Cul9)</i></u>		1,2	1	<u><i>Pten</i></u>	+	1,5	1
<u><i>Bcl2</i></u>	–	0,7	1	<u><i>Dapk1</i></u>	+	1,5	0,9	<i>Pttg1</i>	–	1,3	0,7
<i>Brca2</i>		0,8	1,5	<i>E2f3</i>		2,1	0,8	<i>Rela</i>		1,2	1
<u><i>Btg2</i></u>	+	1,3	1,1	<u><i>(Ep300)</i></u>		1,2	1	<i>Rprm</i>	+	0,6	1,2
<u><i>(Casp2)</i></u>	–	1,2	1,1	<i>Fadd</i>		1,7	0,8	<i>Stat1</i>		1,2	1
<u><i>(Casp9)</i></u>		1,1	1	<i>Foxo3</i>		1,9	0,8	<i>Tnf</i>	+	1,1	1,1
<u><i>Ccnb1</i></u>	–	0,9	1,2	<u><i>Gadd45a</i></u>	+	1,3	1	<i>Xrcc4</i>		0,9	1,2
<u><i>(Ccnb1)</i></u>	+	1,1	1,2	<i>Hif1a</i>		1,3	1	<i>Zmat3</i>	+	0,8	1,2

TP – тип p53-зависимой регуляции (прямой или опосредованной), известный из литературы. Подчеркнуты названия генов, для которых показана прямая регуляция со стороны p53. В скобки заключены названия генов, для которых значения *p* взаимодействия нутлина-3 и тетанизации оказались выше порога, скорректированного на множественные сравнения (m=81, 80 генов набора "p53 Signaling Pathway" и S100B). Пояснения в тексте.

Использованный набор праймеров позволял оценить экспрессию нескольких генов семейства *Bcl2* (рис. 11). Содержание мРНК мишеней р53 *Bax*, *Bid* и *Pmaip1* увеличивалось, а *Bcl2* – уменьшалось через 30 мин после тетанизации. Изменения количества белков *Bax* и *Bcl2* соответствовали динамике мРНК, т.е. количество белка *Bax* увеличивалось, а *Bcl2* – уменьшалось после тетанизации. Таким образом, наблюдавшиеся изменения экспрессии *Bax*, *Bid*, *Pmaip1* и *Bcl2* согласуются с нашими данными об увеличении ДНК-связывающей активности р53 в ранней фазе ДВП, в то же время результаты расширенного анализа с использованием нутлина-3 указывают на ведущую роль р53 в регуляции *Bcl2*, но не *Bid* в данных условиях (таблица 1). Кроме того, наблюдалась тенденция к уменьшению уровня мРНК *Bbc3/Puma* (рис. 11), транскрипция которого активируется фактором р53, что иллюстрирует сложный характер регуляции мишеней р53 при формировании ДВП. Для мРНК *Bax* и *Pmaip1* уровень значимости взаимодействия нутлина-3 и тетанизации оказался недостаточно высоким после коррекции на множественные сравнения, однако для белка *Bax* эффект взаимодействия был достоверным и с учетом коррекции ($m=83$, 81 сравнение для мРНК и 2 для белков *Bax* и *Bcl2*).

Таким образом, после индукции ДВП происходят сдвиги в паттерне экспрессии белков семейства *Bcl2*, что может указывать на вероятное изменение характера регуляции активности каспаз. Изменение баланса белков в сторону проапоптозных представителей семейства может свидетельствовать об увеличении "предрасположенности" к индукции синаптической депрессии (если эти события происходят в нейронах).

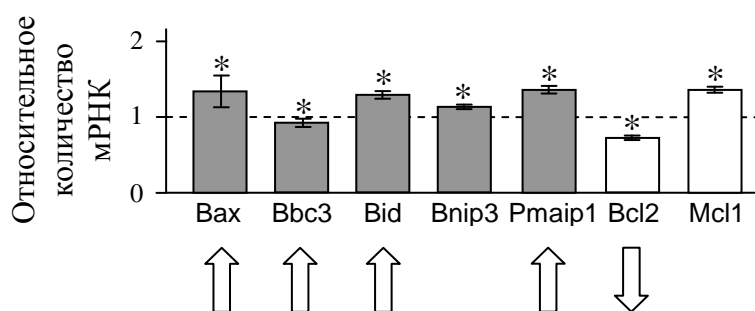


Рис. 11. Динамика мРНК генов семейства *Bcl2* в поле СА1 гиппокампа крысы через 30 мин после индукции ДВП.

Темные столбцы – проапоптозные белки, светлые – антиапоптозные. Стрелками показан характер регуляции гена со стороны р53 – позитивная (стрелка вверх) или негативная (стрелка вниз). Контроль принят за 1. * – $p<0,05$, относительно контроля, парный t-критерий, $n=4$ (с учетом поправки на множественные сравнения, $m=81$). Результаты представлены в виде "среднее \pm стандартное отклонение".

Заключение

Экспрессия генов играет важную роль в нейропластичности. Обычно рассмотрение этого вопроса ограничивается процессами, происходящими в нейронах. Между тем, выделяющиеся при активации синапсов нейромедиаторы изменяют секрецию многих глиальных продуктов, модулирующих синаптическую передачу, включая не только низкомолекулярные транмиттеры, но и белковые молекулы, такие как цитокины и ростовые факторы, однако роль генетического аппарата глии в этих изменениях практически неизвестна.

В частности, обучение у крыс сопровождается увеличением содержания в гиппокампе белков *S100*, участвующих в регуляции многих клеточных функций, включая синаптическую передачу. Механизм этого явления оставался неисследованным. Особый интерес к физиологической регуляции экспрессии *S100B*, синтезирующегося преимущественно в астроцитах, связан с его вовлечением в некоторые заболевания мозга.

Нам удалось воспроизвести эффект ассоциированного с нейропластичностью увеличения экспрессии генов *S100B/Al* на модели долговременной потенциации, которая считается физиологическим механизмом, лежащим в основе обучения и памяти. Тесная связь между индукцией ДВП и экспрессией *S100B/Al* подтверждается отсутствием увеличения уровня их мРНК после низкочастотной стимуляции, не вызывавшей изменений синаптической эффективности.

Впервые был представлен достаточно широкий набор экспериментальных доказательств, позволяющий с уверенностью говорить о том, что регуляция экспрессии специфичного для глии гена *S100B* при формировании ДВП осуществляется на уровне транскрипции. Количество белка *S100B* следовало динамике его мРНК, а содержание мРНК *S100B* изменялось синхронно со связыванием транскрипционного фактора p53 с промотором *S100B*. Кроме того, ингибитор p53-зависимой транскрипции пифитрин-β существенно подавлял рост уровня мРНК *S100B* после тетанизации. Таким образом, индукция долговременной посттетанической потенциации способна динамически изменять активность глиальных генов и, тем самым, уровень секреции глиальных белковых факторов, которые в режиме обратной связи модулируют нейронные функции.

Проведенные исследования позволяют дополнить имеющиеся представления об экспрессии генов при формировании ДВП изображенной на рис. 12 схемой. Вызванное тетанизацией увеличение содержания мРНК *S100B* зависит от глутаматных рецепторов NMDA-типа и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ. В то же время MAP/ERK-киназный каскад, играющий важную роль в регуляции нейронных генов при потенциации, не влияет на динамику мРНК *S100B* в этих условиях.

Одним из транскрипционных факторов, определяющих динамику увеличения содержания мРНК *S100B*, оказался p53, широко известный в качестве ключевого регулятора системы апоптоза. Это первое свидетельство вовлечения p53 в контроль транскрипции при индукции долговременной потенциации. Таким образом, полученные результаты поддерживают наметившуюся в последнее десятилетие тенденцию к переоценке роли p53 как гораздо более универсального фактора, вовлеченного в регуляцию разнообразных клеточных функций (Vousden and Prives, 2009; Maddocks and Vousden, 2011; Itahana et al., 2015), к числу которых, по-видимому, следует отнести и организацию нейроглиального взаимодействия в рамках нейропластических процессов взрослого организма.

Следует подчеркнуть, что при проведении биохимических анализов поле CA1 отделялось от зубчатой извилины, для которой поддержание баланса между делением нейронных стволовых клеток и апоптозом остается актуальным в постнатальном онтогенезе. Следовательно, обнаруженные закономерности действительно не связаны с апоптозом или дифференцировкой стволовых клеток, а представляют собой достаточно универсальный механизм контроля генетической экспрессии со стороны нейронной активности.

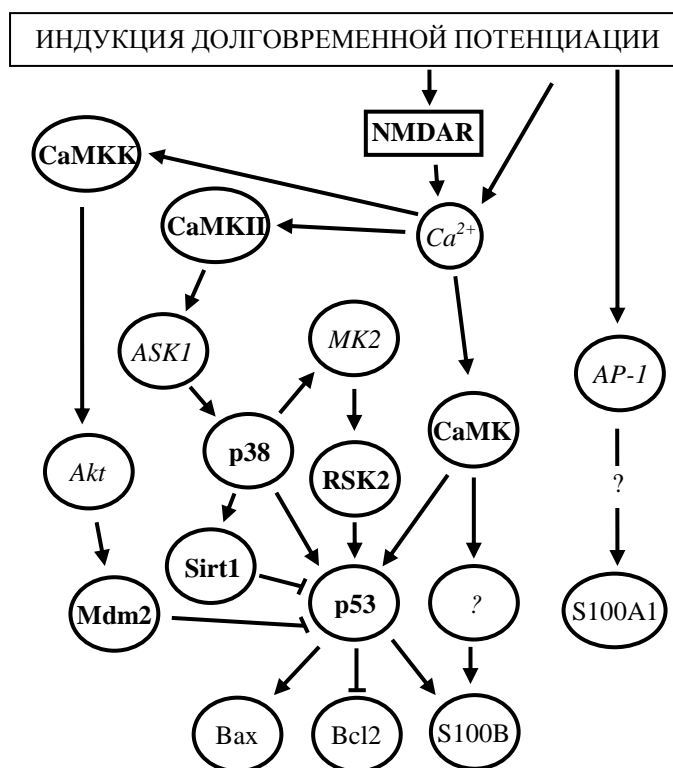


Рис. 12. Регуляция экспрессии генов семейств *S100* и *Bcl2* при формировании ДВП в поле CA1 гиппокампа.

Жирным шрифтом выделены факторы, ингибиторы которых использовались в экспериментах, курсивом – вероятные посредники.

Роль p53 в процессах, сопровождающих формирование ДВП, по-видимому, не ограничивается трансактивацией *S100B*, изменяется также экспрессия некоторых других мишеней p53. Результаты анализа взаимодействия влияний активатора p53 нутлина-3 и тетанизации на экспрессию генов (раздел 8) указывают на существенный вклад p53 в динамику экспрессии, по крайней мере, некоторых его мишеней при формировании ДВП.

Интересный результат проведенного анализа – выявление скрытой регуляции генов: уровень мРНК некоторых генов не изменялся после индукции ДВП в нормальном физиологическом растворе, однако в присутствии нутлина-3 тетанизация существенно меняла экспрессию этих генов. Следовательно, постоянство экспрессии в норме может быть обусловлено балансом разнонаправленных влияний, индуцируемых тетанизацией. Таким образом, обычно реализуемый в исследованиях динамики транскриптома при ДВП подход, при котором анализ мРНК проводится без манипулирования активностью транскрипционных факторов, не дает полной картины регуляторных процессов, запускаемых при формировании ДВП.

В контексте нейропластичности существенный интерес представляет выявленная динамика экспрессии генов семейства *Bcl2*. Если обнаруженные сдвиги происходят не только в глии, но и в нейронах, то, принимая во внимание известную роль элементов системы апоптоза (каспаз, белков семейства *Bcl2*) в долговременной синаптической депрессии (Li and Sheng, 2012), можно предположить, что в данной ситуации система апоптоза выступает в качестве элемента механизма синаптического шкалирования (Балашова и др., 2013), назначение которого – предотвратить предельное увеличение эффективности возбуждающих синаптических связей, ведущее к ограничению дальнейшего участия синапсов в сохранении новой информации и повышению риска развития судорожной активности. Одним из проявлений работы этого механизма может быть гетеродендритная метапластичность – явление, при котором потенциация одних синапсов нейрона препятствует последующей потенциации других (Jones, 2015).

Возможно, *S100B* в нормальных условиях также вовлечен в подобный механизм стабилизации работы нервной системы. Кроме того, в физиологических концентрациях *S100B* обладает трофическими свойствами. Позитивное влияние на жизнеспособность нейронов может оказывать и продукт гена *Btg2* (Lau and Bading, 2009), экспрессия которого также увеличивается при ДВП, по-видимому, отчасти p53-зависимым путем. Таким образом, происходящее при ДВП увеличение экспрессии мишеней p53, таких как *S100B* и *Btg2*, наряду с уменьшением количества самого белка p53, может опосредовать нейропротекторные и трофические эффекты нейронной активности.

Среди перспектив дальнейшей разработки проблемы связи нейропластичности и генной экспрессии можно выделить несколько направлений. Во-первых, необходимо выяснить, в какой мере выявленные закономерности относятся к условиям *in vivo*. Происходит ли активация p53 в мозге при обучении или каких-либо других формах функциональной нагрузки? Какова динамика этого процесса, как быстро восстанавливается уровень белка p53 после ускоренной деградации? Насколько существенна при этом роль p53 в увеличении содержания S100B в мозге?

Важным представляется вопрос о клеточной специфичности активации p53 при ДВП. Является ли этот феномен особенностью S100B-продуцирующих глиальных клеток или имеет место также в нейронах и микроглии? Для решения как этого, так и части вопросов первой группы необходимо изучить характер посттрансляционных модификаций p53 в ранней фазе ДВП, что могло бы дать возможность иммуногистохимической визуализации активных форм p53.

Наконец, проведенный анализ указывает на перспективность более детального исследования вклада p53 в транскрипционную программу ДВП, что подразумевает уточнение роли p53 (с помощью хроматиновой иммунопреципитации и манипуляций с активностью p53) и более полный охват транскриптома (например, с использованием высокопроизводительного секвенирования). Дальнейшее изучение роли p53 и его мишеней в нейропластичности может стать важным вкладом в расшифровку молекулярных основ памяти и предложить новые пути для разработки средств адресного управления пластичностью и сопряженными с ней метаболическими и трофическими процессами как в исследовательских, так и терапевтических целях.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и охарактеризована экспериментальная модель ассоциированного с нейропластичностью увеличения экспрессии специфичного для глии гена *S100B* и гена *S100A1* в условиях *in vitro*. Индукция ДВП в поле CA1 срезов гиппокампа крыс сопровождается увеличением количества мРНК и белка *S100B* и мРНК *S100A1*.
2. Экспрессия *S100B* и *S100A1* избирательно модулируется паттерном нейронных разрядов. Показана ее зависимость от частотных характеристик нейронной активности: высокочастотная стимуляция изменяет уровень мРНК *S100B* и *S100A1*, тогда как низкочастотная не оказывает влияния.
3. Связанная с индукцией ДВП экспрессия *S100B* контролируется глутаматными рецепторами NMDA-типа, Ca^{2+} /кальмодулин-зависимыми протеинкиназами,

протеинкиназами RSK и MAPK p38 и не зависит от активности MAP/ERK-киназного каскада. Базальный уровень мРНК *S100B* ограничивается деацетилазой Sirt1 и убиквитинлигазой Mdm2.

4. Впервые показано участие p53 в регуляции транскрипции при индукции долговременной потенциации: связывание p53 с промотором гена *S100B* является одним из факторов, определяющих динамику мРНК *S100B* в ранней фазе потенциации.
5. Активация p53 при ДВП сопровождается уменьшением количества белка p53. Тандем Sirt1/Mdm2 играет ключевую роль в деградации p53 при ДВП.
6. В ранней фазе долговременной потенциации экспрессия генов-мишеней p53 *Bax*, *Bcl2*, *Btg2*, *Ccnb1*, *Check2*, *Dapk1*, *Gadd45a*, *Prkca* и *Pten* регулируется нутлин-3-зависимым фактором (предположительно – p53).
7. Избирательность вызванных тетанизацией сдвигов экспрессии генов-мишеней p53 обеспечивается многообразием вовлеченных в процесс факторов. Гены *Apafl*, *Bbc3*, *Bid*, *Cdkn1a*, *Dnmt1*, *Egfr*, *Egr1*, *Mdm2*, *Mlh1*, *Pcna* и *Trp73* регулируются преимущественно p53-независимым путем. *Ccnb1*, *Check2*, *Dapk1* и *Prkca* находятся под разнонаправленным, а *S100B* и *Btg2* – однонаправленным контролем со стороны нутлин-3-зависимого и -независимого факторов.
8. Увеличение экспрессии *S100B* и *Btg2* указывает на вероятное нейротрофическое и нейропротекторное значение кратковременной активации p53 при индукции ДВП. Рост уровня *S100B*, наряду с изменением баланса *Bax* и *Bcl2*, возможно, обеспечивает также развитие метапластичности, предотвращающей чрезмерное усиление возбуждающих синапсов.
9. Совокупность полученных данных позволяет заключить, что при формировании долговременной потенциации синаптической передачи генетический аппарат астроцитов оказывается вовлеченным в механизм нейроглиального взаимодействия, отвечающего за тонкую настройку синаптических связей.

Список публикаций по теме диссертации

1. Соколова О.О., Штарк М.Б., **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Пан И.Р., Эпштейн О.И. Экспрессия генов *S100B* и *S100A6* при долговременной посттетанической потенциации в гиппокампе // Бюл. эксп. биол. и мед. 2009. Т. 148. № 8. С. 195-198.
2. Соколова О.О., Штарк М.Б., **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Пан И.Р. Динамика экспрессии “ранних” генов при долговременной посттетанической потенциации в поле СА1 гиппокампа крысы // Бюл. эксп. биол. и мед. 2009. Т. 148. № 9. С. 304-306.

3. Соколова О.О., Штарк М.Б., **Лисачев П.Д.** Нейрональная пластичность и экспрессия генов // Успехи физиол. наук. 2010. Т. 41. № 1. С. 26-44.
4. **Lisachev P.D.**, Shtark M.B., Sokolova O.O. et al. A Comparison of the dynamics of S100B, S100A1, and S100A6 mRNA expression in hippocampal CA1 area of rats during long-term potentiation and after low-frequency stimulation // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010. V. 2010. Article ID 720958, 6 pages.
5. Pustylnyak V.O., **Lisachev P.D.**, Shtark M.B., Epstein O.I. Regulation of S100B gene in rat hippocampal CA1 area during long term potentiation // *Brain Res.* 2011. V. 1394. P. 33-39.
6. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б., Эпштейн О.И. Индукция экспрессии гена S100B при долговременной потенциации в поле CA1 гиппокампа зависит от активности рецепторов NMDA-типа // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2012. Т. 154. № 10. С. 481-484.
7. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Экспрессия генов семейства Bcl2 в ранней фазе долговременной потенциации // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2014. Т. 158. № 7. С. 86-88.
8. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Регуляция экспрессии S100B при долговременной потенциации // *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова.* 2014. Т. 100. № 8. С. 953-963.
9. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Mdm2-зависимая регуляция экспрессии p53 при долговременной потенциации // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2014. Т. 158. № 9. С. 317-319.
10. Pustylnyak V.O, **Lisachev P.D.**, Shtark M.B. Expression of p53 target genes in the early phase of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area // *Neural Plast.* 2015. V. 2015. Article ID 242158, 12 pages.
11. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Sirt1 регулирует стабильность p53 и экспрессию его мишени S100B при долговременной потенциации в гиппокампе крыс // *Бюл. эксп. биол. и мед.* 2015. Т. 160. № 10. С. 429-431.
12. Соколова О.О., Штарк М.Б., **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О. Экспрессия генов и динамика ДПТП в гиппокампе // В сб.: Гиппокамп и память: норма и патология. I Всероссийская конференция с международным участием. Тез. докл. Пушкино. 2009. С. 29.
13. Соколова О.О., Штарк М.Б., **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О. Динамика экспрессии генов при формировании долговременной посттетанической потенциации в срезах гиппокампа крыс // В сб.: Медицинская геномика и протеомика. Новосибирск. 2009. С.140.
14. **Лисачев П.Д.**, Штарк М.Б., Пустыльняк В.О., Соколова О.О., Эпштейн О.И. Нейроглиальные взаимодействия и синаптическая пластичность // В сб.: Материалы конференции "Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга". М.: Научный мир. 2010. С. 398-402.

15. **Лисачев П.Д.**, Штарк М.Б., Пустыльняк В.О., Эпштейн О.И. Экспрессия генов S100 белков, вызванная тетанизацией гиппокампа, и эффекты антидепрессанта флуоксетина // В сб.: С.-Петербургский научный форум "Наука и общество. Физиология и медицина XXI века". Тез. докл. С.-Петербург. 2011. С. 125-126.
16. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Экспрессия глиальных генов, ассоциированная с синаптической пластичностью // В сб.: VII Сибирский съезд физиологов. Материалы съезда / Под ред. Л.И.Афтанаса и др. – Красноярск. 2012. С. 298-299.
17. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Экспрессия глиальных генов при долговременной потенциации в поле СА1 гиппокампа // В сб.: Гиппокамп и память: норма и патология. II Всероссийская конференция с международным участием. Тез. докл. Пущино. 2012. С. 26-27.
18. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Нейропластичность и экспрессия генов // В сб.: Нейронаука для медицины и психологии: 9-й Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2013 г.: Труды / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. – М.: МАКС Пресс. 2013. С. 205-206.
19. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Регуляция экспрессии S100B в гиппокампе крысы // В сб.: Фундаментальные проблемы нейронаук. Функциональная асимметрия. Нейропластичность. Нейродегенерация (Материалы всероссийской научной конференции с международным участием). – М.: Научный мир, 2014. С. 674-680.
20. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Регуляция экспрессии глиальных генов при формировании долговременной потенциации // В сб.: Гиппокамп и память: норма и патология. III Всероссийская конференция с международным участием. Тез. докл. Пущино. 2015. С. 22-23.
21. **Лисачев П.Д.**, Пустыльняк В.О., Штарк М.Б. Деацетилаза Sirt1 ограничивает экспрессию S100B в мозге крысы // В сб.: Нейронаука для медицины и психологии: 11-й Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия; 2-12 июня 2015 г.: Труды / Под ред. Лосевой Е.В., Крючковой А.В., Логиновой Н.А. – М.: МАКС Пресс, 2015. С. 253.