

**ЭКСПРЕССИЯ АНТИ-АПОПТОЗНОГО БЕЛКА Bcl-xL В ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ
ГИППОКАМПА ПРИ ИХ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ**

У.С. Дрозд

Научный руководитель: к.б.н. Д.А. Ланшаков

Федеральный Исследовательский Центр Институт Цитологии и Генетики СО РАН,

Россия, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, 630090

Новосибирский государственный университет,

Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2, 630090

E-mail: drozdnsu@gmail.com

**EXPRESSION OF ANTIAPOPTOTIC PROTEIN Bcl-xL IN OPTOGENETICALLY STIMULATED
HIPPOCAMPAL GLUTAMATERGIC NEURONS**

U.S. Drozd

Scientific supervisor: PhD D.A. Lanshakov

The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia, Novosibirsk, Lavrentiev av.,

10, 630090

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090

E-mail: drozdnsu@gmail.com

Abstract. *The anti-apoptotic protein Bcl-xl takes part in processes of neuroplasticity such as synaptogenesis and release of neurotransmitters. In this study dependence of Bcl-xL expression on neuron activity was analyzed by in vivo optogenetic activating of the hippocampal glutamatergic neurons. The immunohistochemically determined level of protein Bcl-xL increased in photosensitive neurons as well as the level of the early response protein c-Fos that prove their activating by light. The activity-dependent expression of Bcl-xL support its role in neuroplasticity.*

Введение. Способность нервной системы реагировать на изменения во внутренней и внешней среде путем изменения своих морфологических и функциональных параметров лежит в основе важнейших нейронных функций, обуславливающих поведенческие реакции, память и адаптацию в физиологических и патологических условиях [1]. Это свойство, нейропластичность, проявляется в зависимости от активности нейронов на многих уровнях: от молекулярного, в виде изменений плотности рецепторных белков в синаптических мембранах и процессов выделения нейромедиаторов, до реконструкции и формирования новых отростков, шипиков и синапсов нервных клеток [2]. Обнаружено, что анти-апоптозный белок Bcl-xL необходим для некоторых из этих процессов. Кроме своей основной функции – защиты клеток от программируемой клеточной гибели, данный белок принимает участие в регуляции энергетики в синапсах, что модулирует процессы, происходящие в них [3], предотвращает развитие длительной терминальной депрессии, а также увеличивает число, размер и активность синапсов [4]. Кроме того, выявлена связь между повышенной экспрессией этого белка и психоэмоциональной и нейрохимической устойчивостью в условиях кратковременного стресса [5]. Регуляция экспрессии этого белка осуществляется многими стимулами, связанными с анти-апоптозными функциями [6], поэтому,

чтобы оценить влияние разрядной активности нейронов на уровень экспрессии в них Vcl-xL, мы напрямую активировали нейроны методом оптогенетики. Данный подход позволяет избирательно управлять активностью нейронов путем внедрения в мембрану нейронов светочувствительных ионных каналов, способных менять мембранный потенциал в ответ на стимуляцию светом [7].

Методы и материалы. На основе плазмид, полученных от фирмы Addgen (США), созданных группой К. Дейссерот, были собраны аденоассоциированные вирусные векторы (AVV) смешанного 1-2-го серотипа pAAV-CAMKIIa-ChR2H134-YFP, содержащие последовательность светочувствительного каналородопсина (ChR2H134) и флюоресцентного белка (YFP) под промотором CAMKIIa для глутаматергических нейронов. В качестве контрольного вектора использовали AAV-CAMKIIa-EGFP, содержащий зеленый флюоресцентный белок под регуляцией того же промотора. 3-дневным крысам линии Wistar вирусные вектора вводили в боковые желудочки головного мозга в количестве 5 μ l, титр 10^{11} под холодным наркозом в стереотаксическом приборе. Через 3 недели после введения векторов исследовали влияние оптогенетической стимуляции на экспрессию в нейронах белка Vcl-xL, а также белка раннего ответа c-Fos. Для этого животных наркотизировали уретаном, в стереотаксической раме помещали в гиппокамп оптоволокно и проводили стимуляцию синим светом (480 нм) в течение 5 минут. Через 30 минут после стимуляции проводили транскардиальную перфузию натрий-фосфатным буфером, содержащим 4% параформальдегид. Извлеченный мозг постфиксировали 4 часа в 4% параформальдегиде и делали срезы толщиной 300 мкм на вибраторе.

Выявление белков Vcl-xL и c-Fos проводили непрямым иммуногистохимическим методом согласно общепринятой методике. Полученные препараты фотографировали при помощи конфокального микроскопа, для анализа изображений использовали программу ZEN («Carl Zeiss», Германия). При этом подсчитывалось нормированное на 1 мм² общее количество Vcl-xL-позитивных или c-Fos-позитивных клеток, а также количество клеток, экспрессирующих одновременно c-fos или Vcl-xL и флюоресцентные белки: ChR2H134-YFP в подопытной группе и EGFP в контрольной. Различия между контрольной и подопытной группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента и считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты. Через 3 недели после введения в мозг неонатальных крыс AAV-векторов в CA1 поле гиппокампа наблюдалась активная экспрессия флюоресцентных белков: ChR2H134-YFP и EGFP в опытной и контрольной группах соответственно.

Имуногистохимическое выявление белка Vcl-xL показало, что данный белок после фотостимуляции усиленно экспрессируется в поле CA1 гиппокампа у животных подопытной группы, нейроны которой экспрессировали каналородопсин (ChR2-YFP) и были чувствительны к свету, по сравнению с контрольной группой животных, нейроны которых к свету чувствительны не были и экспрессировали EGFP (Рис. 1, А). На препаратах опытной группы было обнаружено большее число совместно экспрессирующих Vcl-xL и флюоресцентный белок нейронов, чем в контрольной группе ($p < 0,001$), а так же большее общее количество Vcl-xL-позитивных клеток ($p < 0,001$) (Рис. 1, Б).

Экспрессия гена c-fos в нейронах коррелирует с их спонтанной разрядной активностью. Иммуногистохимическое окрашивание белка раннего ответа c-Fos выявляло клетки которые были активны в процессе фотостимуляции [8]. У подопытной группы число клеток, совместно экспрессирующих c-Fos и флюоресцентный белок было значительно больше, чем у контрольной группы ($p < 0,0001$), как и общее число c-Fos-позитивных клеток ($p < 0,03$).

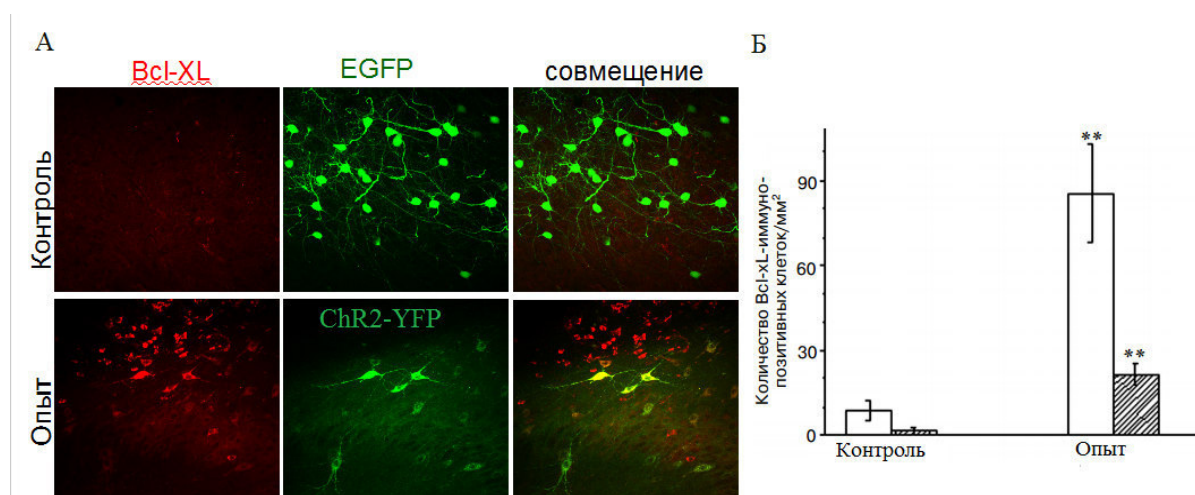


Рис. 1. А) Экспрессия белка *Bcl-xL* и флуоресцентных белков в нейронах поля CA1 гиппокампа. Б) Общее число *Bcl-xL*-позитивных клеток (белые столбцы) и клеток, экспрессирующих *Bcl-xL* совместно с флуоресцентным белком (заштрихованные столбцы) в контрольной и опытной группе. ** $p < 0,001$

Заключение. В совокупности полученные результаты говорят о том, что в светочувствительных нейронах после оптогенетической активации значительно повышается уровень анти-апоптозного белка *Bcl-xL*. Зависимость экспрессии данного белка в глутаматергических нейронах поля CA1 гиппокампа от их разрядной активности обнаружена впервые.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-0011

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, no. 6(6), pp. 463–475
2. Nudo, R. J. (2006) Plasticity. *NeuroRX*, no. 3(4), pp. 420–427
3. Jonas, E. (2006) BCL-xL Regulates Synaptic Plasticity. *Molecular Interventions*, no. 6(4), pp. 208–222
4. Li, H., Alavian K. N, Lazrove E., Mehta N., Jones A., Zhang P., & Guo J. (2013) A Bcl-xL–Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nature Cell Biology*, no 15(7), pp. 773–785
5. Shishkina, G. T., Kalinina T. S., Berezova I. V., Bulygina V. V., & Dygalo N. N. (2010) Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. *Behavioural Brain Research*, no. 213(2), pp. 218–224
6. Formentini L., Pereira M. P., Sánchez-Cenizo L., Santacatterina F., Lucas J. J., Navarro C., Martínez-Serrano A., & Cuezva, J. M. (2014) In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *The EMBO journal*, no. 33(7), pp. 762–78
7. Deisseroth, K. (2011) Optogenetics. *Nature Methods*, no. 8(1), pp. 26–29
8. Ланшаков Д. А., Дрозд У. С., Дыгало Н. Н. Оптогенетическая активация нейрона повышает в нем уровень антиапоптозного белка *Bcl-xL* // *Биохимия*. — 2017. — Т. 82. — Вып. 3. — с. 481.