

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И  
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН  
ИЦиГ СО РАН

УДК 577.21

№ госрегистрации 01201058864

УТВЕРЖДАЮ  
Директор  
академик РАН Н. А. Колчанов

*(подпись)*

“31” мая 2011 г.

М.П.

**ОТЧЕТ**  
**О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

В рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы

Проведение научных исследований коллективами научно-образовательных центров в области физико-химической молекулярной и клеточной биологии

по теме:

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-СПЕЦИФИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ  
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЖИВОТНЫХ**

(Государственный контракт № 02.740.11.0705 от 5 апреля 2010 г., шифр заявки  
«2010-1.1-142-043-002»)  
(промежуточный, этап № 3)

Наименование этапа: «Определение уровня экспрессии ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крысы в норме и при стрессе»

Руководитель проекта

д.б.н., проф.

\_\_\_\_\_ Г. М. Дымшиц

*подпись, дата*

Новосибирск 2011

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Дымина Г. М. (раздел 3, введение, заключение)
Исполнители		
зав. отд. молекулярной генетики, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Меркулова Т.И. (разделы 1, 2)
зав. лаб. генетики стресса, д.б.н., проф.	_____ подпись, дата	Раушенбах И. Ю. (разделы 5, 6)
зав. лаб. генной инженерии, к.б.н., доц.	_____ подпись, дата	Кочетов А. В. (раздел 4)
д.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Грунтенко Н.Е. (раздел 5, 6)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Васильев Г.В. (разделы 1, 2)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Левицкий В.Г. (раздел 2)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Антонцева Е. А. (раздел 2)
к.б.н., м.н.с.	_____ подпись, дата	Ощепков Д. Ю. (раздел 1)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Богомолова Е. В. (раздел 5)
к.б.н., с.н.с.	_____ подпись, дата	Адоньева Н.В. (раздел 6)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Карпова Е.К. (раздел 6)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Лаухина О.В. (раздел 6)
к.б.н., н.с.	_____ подпись, дата	Иванов М. К. (раздел 3)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Глушков С.А. (раздел 3)
н.с., к.б.н.	_____ подпись, дата	Сангаев С.С. (раздел 4)
м.н.с.	_____ подпись, дата	Волкова О.А. (раздел 4)
м.н.с., к.б.н.	_____ подпись, дата	Брызгалов Л.О. (раздел 2)

<i>н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Пахарукова М. Ю.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>м.н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Климова Н. В.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>м.н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Брагин А. Г.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>м.н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Ершов Н.И.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>м.н.с.</i>	_____	<i>Федосеева Л.А.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Герасимова С.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Иванисенко Т.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Шевелев О.Б.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Горелова В.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Брагин А.О.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>студент</i>	_____	<i>Климов Л.О.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>студент</i>	_____	<i>Никулин П.С.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>студент</i>	_____	<i>Аркова О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>студент</i>	_____	<i>Сайк О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>Студент</i>	_____	<i>Медведев К.Е.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>Студент</i>	_____	<i>Емцева М.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>Нормоконтролер</i>	_____	<i>Амайзер Н.Н.</i>
	подпись, дата	

## РЕФЕРАТ

Отчет 58 с., 23 рис., 6 табл., 66 источников.

СИГНАЛЫ ЭКСПРЕССИИ, СТРЕСС, ТРАНСЛЯЦИЯ, ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ ХРОМАТИНА, SOLiD, МЕТОД CHIP-SEQ, ЮВЕНИЛЬНЫЙ ГОРМОН, Д2-РЕЦЕПТОРЫ, ДОФАМИН, ГИПЕРТОНИЯ, РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВАЯ СИСТЕМА

Целью проекта является выявление молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов животных на транскрипционном и посттранскрипционном уровне в норме и в условиях стресса, а также исследование генетических моделей патологических состояний. В рамках проекта планируется использовать ряд уникальных генетических моделей. (1) Проведена иммунопреципитация хроматина ткани печени самцов крыс двухмесячного возраста с обработкой канцерогенами и без, а так же новорождённых с использованием антител против транскрипционных факторов FoxO3A, FoxA2, HNF4. Получены и отсекувенированы (SOLiD) специфические библиотеки; (2) В тканях почки, надпочечников, гипоталамуса и продолговатого мозга у молодых (1,5 мес) и взрослых (4-7 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG изучали экспрессию генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), кодирующих ангиотензиноген, ренин, ангиотензин-превращающий фермент, рецепторы ангиотензина II первого и второго типа и рецептор ренина/проренина. Сделано заключение о том, что на формирование гипертензивного статуса крыс линии НИСАГ может влиять состояние РАС в первые недели их жизни, у взрослых животных за поддержание гипертензии отвечают другие системы; (3) Проведен компьютерный анализ мРНК *Mus musculus*, характеризующихся различной эффективностью трансляции в норме и при стрессе. Выдвинуто предположение о том, что реинициация трансляции, характеристики которой зависят от статуса фосфорилирования фактора eIF2 $\alpha$ , является одним из ключевых механизмов стресс-специфического контроля экспрессии генов млекопитающих; (4) В рамках проекта проводится исследование молекулярно-генетических механизмов стрессоустойчивости на модели *Drosophila*. Впервые показано наличие Д2-подобных рецепторов в жировом теле и *corpus allatum* и подтвержден сделанный нами на первом этапе реализации проекта вывод о том, что негативная регуляция синтеза ЮГ дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами. Полученные результаты используются в учебном процессе (курсы «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»). За отчетный период также защищено 2 кандидатские диссертации и опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	11
1. Создание ДНК-библиотек из иммунопреципитированного материала органов экспериментальных животных, подвергнутых воздействию ксенобиотиков.....	17
2. Проведение массового параллельного секвенирования полученных ДНК-библиотек.....	19
3. Определение уровня экспрессии ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG в норме и при стрессе.....	21
4. Исследование конформационных характеристик мРНК эукариот связанных с эффективностью трансляции в норме и при стрессе.....	40
5. Иммуногистохимическая оценка содержания и локализации D2-подобных рецепторов в ткани, синтезирующей ферменты, деградирующие ювенильный гормон.....	44
6. Изучение влияния ксенобиотической активации D2-подобных рецепторов на уровень 20-гидроксиэкдизона у самок дрозофилы в нормальных и стрессирующих условиях.....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	53

## ВВЕДЕНИЕ

Цель проекта заключается в выявлении молекулярных механизмов, контролирующих экспрессию генов животных на транскрипционном и посттранскрипционном уровне в норме и в условиях стресса. Для выполнения этой работы планируется использовать современные методические подходы и перспективные генетические модели, что позволит исследовать регуляцию экспрессии генов, связанных с развитием социально-значимых патологий (канцерогенез, гипертоническая болезнь).

В настоящее время методы и подходы молекулярной биологии активно используются для исследования фундаментальных аспектов организации сложных биологических систем. Одна из ключевых задач заключается в реконструкции генных сетей и регуляторных контуров, определяющих адаптацию организма животных к стрессовым условиям различной природы: эта информация необходима не только для развития существующих представлений о молекулярно-генетических механизмах адаптации к неблагоприятным факторам, но и для получения новых данных о причинах канцерогенеза и некоторых заболеваний, связанных с дисфункцией регуляторных систем вследствие мутаций или воздействия ксенобиотиков. Эти исследования относятся к актуальным направлениям развития молекулярной биологии и необходимы для разработки новых методов диагностики и лечения патологических состояний человека. В то же время, стресс-специфическая экспрессия генов представляет собой модель, изучение которой может дать новую ценную информацию фундаментального характера. В рамках проекта планируется исследовать следующие модели:

*(1) Транскрипционный контроль экспрессии генов печени экспериментальных животных в норме и при воздействии онкогенных ксенобиотиков.* Печень представляет собой ключевой орган детоксификации ксенобиотиков. Система генов, контролирующая детоксификацию, сложна и изучена недостаточно полно. Кроме того, многие ее компоненты одновременно являются ключевыми регуляторами базовых клеточных процессов, таких как дифференцировка, пролиферация и апоптоз. Вследствие этого, происходящие при взаимодействии с определенными веществами сбои в регуляторных системах клеток печени могут приводить к развитию онкологических заболеваний. Планируется провести комплексное исследование влияния ряда гепатоканцерогенных соединений на транскриптом печени и полногеномное распределение важных для ее функции факторов транскрипции, что позволит очертить круг генов, ответственных за развитие опухолей печени под действием этих соединений и построить схему регуляторных событий, ведущих к данной патологии.

На предыдущих этапах проекта нами были отработаны методики проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием пула выделенных ДНК на системе SOLiD, а также разработан метод предсказания сайтов связывания

транскрипционных факторов группы FOX. Кроме этого, были отработаны процедуры выделения препаратов РНК для микрочипового анализа транскриптома и препаратов ядерных белковых экстрактов. На втором этапе проекта нами была проведена иммунопреципитация хроматина семенников самцов крыс с антителами против транскрипционного фактора SF1. Создан задел для исследования этих образцов методом ChIP-Seq. С использованием биочипов RatRef-12 BeadChip (Illumina), содержащих 22523 уникальные олигонуклеотидные пробы, проведен анализ изменений транскриптома печени крысы при введении животным двух аминоазосоединений: гепатоканцерогенного для крыс 3'-MeДАБ и неканцерогенного для них ОАТ. Выявлено 1052 и 442 гена, уровень экспрессии которых в печени достоверно изменялся более чем в 2 раза в ответ на введение 3'-MeДАБ и ОАТ, соответственно. При этом экспрессия 408 генов изменялась преимущественно в ответ на канцерогенный 3'-MeДАБ, но не на ОАТ, 74 гена демонстрировали избирательную реакцию на ОАТ. С использованием базы Gene Ontology показано, что около 20% генов, избирательно реагирующих на гепатоканцерогенный 3'-Me-ДАБ, представлено генами, связанными с клеточным циклом и апоптозом.

*(2) Изучение механизмов транскрипционного контроля экспрессии генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крысы в норме и при стрессе.* Эта часть работы связана с исследованием генетического контроля функционирования одной из важнейших физиологических систем, нарушения в которой приводят к развитию гипертонической болезни. Для проведения исследований планируется использовать уникальную генетическую модель, разработанную в ИЦиГ СО РАН – лабораторную линию крыс НИСАГ, характеризующихся увеличенным кровяным давлением и наследственной склонностью к развитию гипертонии в ответ на стресс. Исследования на молекулярно-биологическом уровне позволят выявить регуляторные механизмы, нарушения в которых отвечают за развитие этой патологии. Планируется провести изучение реакции на стресс ключевых генов симпато-адреналовой и ренин-ангиотензиновой систем у крыс гипертонивной линии НИСАГ разных возрастов в почках, сердце и различных отделах мозга. Полученные данные будут использованы для развития представлений о механизмах возникновения артериальной гипертонии, связанной со стрессом.

На предыдущих этапах проекта нами были отработаны некоторые методы и процедуры для проведения высокочувствительного анализа уровня транскрипции индивидуальных генов: для этого были разработаны процедуры измерения 5'-эндо/экзонуклеазной активности препаратов ДНК-полимеразы Taq. Проведен анализ эффективности использования различных вариантов олигонуклеотидов со структурными модификациями. На втором этапе проекта был разработан метод характеристики флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов, использование которого позволяет проводить оценку степени мечения олигонуклеотидов

флуорофорами и гасителями флуоресценции. Это позволило увеличить чувствительность и воспроизводимость количественной ПЦР в реальном времени за счёт использования охарактеризованных препаратов флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов и ДНК- и РНК-зависимых ДНК-полимераз, оптимизации состава реакционной смеси и «горячего старта».

*(3) Изучение сигналов, локализованных в мРНК и контролирующих общую и стресс-специфическую трансляционную активность матриц.* В рамках проекта планируется провести исследования молекулярных механизмов стрессового ответа, действующих не только на уровне контроля транскрипции, но и на уровне трансляции мРНК. Известно, что в условиях различных видов стресса происходит приостановка трансляции основного пула клеточных мРНК и экспрессируются преимущественно стресс-специфические гены. Сигналы, определяющие такую селективную трансляцию, в настоящее время малоизучены. Планируется провести исследование, направленное на выявление характеристик эукариотических мРНК, связанных с селективной трансляцией в стрессовых условиях. Знание таких характеристик позволит предсказывать мРНК, трансляция которых связана с адаптацией к неблагоприятным условиям, что – в свою очередь – будет способствовать выявлению соответствующих генов.

На предыдущих этапах проекта нами были созданы репрезентативные выборки негомологичных нуклеотидных последовательностей функциональных районов мРНК эукариотических генов. На втором этапе был проведен компьютерный анализ структурно-функциональной организации эукариотических матриц. Впервые исследована структурная характеристика мРНК – размер поверхности молекулы, доступной для взаимодействия (accessible surface area, ASA), отражающая способность участков молекулы к взаимодействию с другими макромолекулами. Обнаружено, что в молекуле РНК параметр ASA контекстно-зависим. Впервые показано, что альтернативные стартовые кодоны характеризуются эволюционной консервативностью, что свидетельствует об их функциональной значимости.

*(4) Исследование роли контроля экспрессии генов дофаминовых (ДА) рецепторов в поддержании гормонального статуса в нормальных и стрессирующих условиях.* Установлено, что D<sub>2</sub>-подобный рецептор (D<sub>2</sub>R) у млекопитающих является ключевым модулятором двигательной функции. У человека D<sub>2</sub>R оказался важнейшей терапевтической мишенью для лечения брадикинезии, возникающей в результате болезни Паркинсона. Однако пока практически ничего не известно о том какую роль контроль экспрессии генов рецепторов дофамина играет в регуляции гормонального статуса организма в стрессирующих условиях. Проведение подобных исследований на человеке невозможно, так как требует



фармакологического изменения уровней стресс-связанных гормонов и проведения генетических экспериментов. Поскольку показано, что ДА-подобные рецепторы высоко-консервативны у млекопитающих и дрозофилы, в рамках настоящего проекта использована созданная в ИЦиГ СО РАН уникальная модель (серия линий дрозофилы с мутациями, вызывающими изменения в уровне различных стресс-связанных гормонов, в том числе дофамина), на которой установлен механизм взаиморегуляции гормонов стресса в контроле репродуктивной функции и устойчивости к действию стрессоров. Эта модель высокоперспективна еще и потому, что соответствующие регуляторные контуры у насекомых устроены значительно проще, чем у млекопитающих, и это позволяет реконструировать их организацию и эволюцию. Выявленные закономерности можно будет использовать как модель для коррекции гормонального дисбаланса, возникающего при стрессе у млекопитающих.

На предыдущих этапах проекта нами было показано, что ксенобиотическая активация или инактивация Д2-подобных рецепторов изменяют интенсивность ответа щелочной фосфатазы на стресс: стресс-реактивность фермента снижена у самок, кормленных бромкриптином (агонистом Д2-подобных рецепторов дофамина), и повышена у самок, кормленных метаклопрамидом (антагонистом Д2-подобных рецепторов дофамина). Щелочная фосфатаза регулирует содержание предшественника дофамина – тирозина. Таким образом, показано, что изменение функциональной активности Д2-подобных рецепторов влияет на метаболизм дофамина. Также было показано, что негативная регуляция активности щелочной фосфатазы дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами: снижение числа Д2-подобных рецепторов повышает активность фермента. На основе данных, представленных в выводе 5 и 6 можно заключить, что нами впервые показано, что Д2-подобные рецепторы дофамина играют существенную роль в развитии стресс-реакции насекомых. На втором этапе проекта изучено влияние ксенобиотической активации Д2-подобных рецепторов на метаболизм ювенильного гормона в нормальных и стрессирующих условиях. Исследован метаболизм ювенильного гормона самок дрозофилы, у которых экспрессия гена DDR2 специфически снижена в железе, производящей ювенильный гормон (с помощью тканеспецифичной РНК-интерференции на линиях трансгенных мух). Подтверждена гипотеза, выдвинутая нами ранее, согласно которой синтез и деградация ювенильного гормона у насекомых находятся под общим контролем и уровень деградации гормона может служить индикатором уровня его синтеза. Впервые установлено, что негативная регуляция синтеза ювенильного гормона дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами. Обнаружено, что ксенобиотическая активация Д2-подобных рецепторов вызывает снижение деградации ЮГ и этот эффект имеет онтогенетический характер.

Решение проблем, которым посвящен настоящий проект, необходимо для развития признанного правительством Российской Федерации приоритетного направления «Живые системы», а также для ряда критических технологий в рамках этого направления. Вовлечение студентов Новосибирского государственного университета и аспирантов Института цитологии и генетики СО РАН в исследования в рамках данного проекта и использование его результатов в преподавании биологических дисциплин, таких как молекулярная биология, новейшие методы молекулярно-генетических исследований и др. сыграет важную роль в формировании у студентов целостного представления о молекулярных механизмах контроля экспрессии генов. Таким образом, в рамках НИР планируется проведение комплексного исследования молекулярных механизмов контроля экспрессии генов в стрессовых условиях, действующих на транскрипционном и трансляционном уровнях. Выполнение НИР должно обеспечивать достижение научных результатов мирового уровня, подготовку и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективных и жизнеспособных научных коллективов.

Основная цель 3-го этапа проекта — определение уровня экспрессии ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крысы в норме и при стрессе. Задачи этапа включают следующие виды работ:

1. Создание ДНК-библиотек из иммунопреципитированного материала органов экспериментальных животных, подвергнутых воздействию ксенобиотиков.
2. Проведение массового параллельного секвенирования полученных ДНК-библиотек.
3. Определение уровня экспрессии ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG в норме и при стрессе.
4. Исследование конформационных характеристик мРНК эукариот связанных с эффективностью трансляции в норме и при стрессе.
5. Иммуногистохимическая оценка содержания и локализации D<sub>2</sub>-подобных рецепторов в ткани, синтезирующей ферменты, деградирующие ювенильный гормон.
6. Изучение влияния ксенобиотической активации D<sub>2</sub>-подобных рецепторов на уровень 20-гидроксиэкдизона у самок дрозофилы в нормальных и стрессирующих условиях.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Развитие и жизнедеятельность многоклеточных животных обеспечивается строго контролируемым уровнем экспрессии генов в различных органах и тканях. Целью проекта является выявление молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию генов животных на транскрипционном и посттранскрипционном уровне в норме и в условиях стресса, а также исследование генетических моделей патологических состояний. В рамках проекта планируется использовать современные методы количественного анализа паттернов экспрессии генов эукариот, а также ряд уникальных генетических моделей. В рамках отчетного (третьего) этапа главным образом была проведена работа по определению уровня экспрессии ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крысы в норме и при стрессе, а также получен ряд интересных научных результатов по другим направлениям работы.

(1) Исследование молекулярных основ канцерогенеза требует применения современных высокопроизводительных методов анализа геномов. В рамках проекта такие методы были применены для изучения форм рака, формирующихся при обработке лабораторных животных ксенобиотиками. Метод иммунопреципитации хроматина *in vivo* является уникальным по своим возможностям инструментом для изучения взаимодействия между ДНК-связывающими белками (транскрипционными факторами, гистонами и др.) и ядерной ДНК. Суть метода: на первом этапе проводится обработка образца ткани или суспензии клеток формалином, приводящая к образованию ковалентных ДНК-белковых сшивок. Далее фиксированный ядерный хроматин выделяется и подвергается ультразвуковому дроблению на фрагменты с максимумом распределения по длинам в районе 250-500 п.н. На следующем этапе с помощью специфических антител к интересующему нас белку проводится селективная иммунопреципитация ДНК-белковых комплексов. Ковалентные связи ДНК-белок гидролизуются, ДНК из преципитированных комплексов выделяется и исследуется. Данные о полногеномном профиле распределения сайтов связывания получают путём секвенирования всего пула выделенной ДНК с помощью приборов массового параллельного секвенирования второго поколения – SOLiD фирмы ABI либо GA analyzer фирмы Illumina (метод ChIP-Seq). Метод ChIP-Seq обладает принципиальными преимуществами перед другими методами. Во-первых, ChIP-Seq даёт многократно больший объём информации, во-вторых, результатом является картина полногеномного, а не только промоторного распределения сайтов связывания, в третьих, полученный результат свободен от предварительной селекции исходных данных, могущих существенно исказить конечный результат, что неизбежно в случае с микрочипами, несущими фиксированное число заранее выбранных последовательностей. Наконец, результатом ChIP-Seq являются не относительные

уровни сигнала, как в случае микрочипов, а конкретные районы последовательностей ДНК, что даёт несравненно больше возможностей для теоретического анализа результатов эксперимента. В результате секвенирования всего пула иммунопреципитированной ДНК и наложения этой информации на референсную геномную последовательность получают совокупность пиков покрытия, соответствующих районам взаимодействия ДНК-Белок. Завершающей стадией эксперимента является биоинформатический анализ полученных пиков, их достоверности, распределения и изменений в результате тех или иных регуляторных событий.

Технология SOLiD фирмы Applied Biosystems основана на секвенировании с помощью циклического лигирования коротких олигонуклеотидов (8 п.о.), специфически меченых одним из четырёх флуоресцентных красителей. На первом этапе проводится ПЦР в водно-масляной эмульсии (ePCR). В её ходе с единичной молекулы ДНК из специфической библиотеки на поверхности магнитных шариков диаметром 1 мкм синтезируются клоны идентичных молекул ДНК. Далее проводится отделение фракции шариков, несущих оба адаптера (P1 и P2) на обоих концах синтезированных ДНК-фрагментов. На завершающем этапе пробоподготовки шарики ковалентно пришиваются на дно проточной ячейки, располагаясь на нём с высокой плотностью. В каждом цикле секвенирования фермент лигаза пришивает к 5'-концу субстратного комплекса специфический флуоресцентно меченый одним из 4-х красителей олигонуклеотид. Спектры свечения шариков снимаются CCD-камерой, затем проводится отщепление метки вместе с тремя последними нуклеотидами, после чего цикл лигирования повторяется. Для секвенирования всего фрагмента последовательно используются 5 секвенирующих праймеров при длине чтения до 50 нуклеотидов, при этом каждая буква в последовательности читается фактически дважды, что позволяет заметно поднять точность прочтения секвенируемой последовательности. Производительность системы SOLiD 3 может достигать 4-6 млрд. нуклеотидов (Gb) с одного рабочего слайда, слайд может быть разделён на 4 или 8 частей с некоторой потерей производительности. Время работы прибора при чтении 35 нт. с каждого фрагмента составляет около 5 суток.

(2) Артериальная гипертония (АГ) является многофакторным заболеванием, для развития которого наряду с генетической предрасположенностью важны воздействия определенных факторов среды. В человеческой популяции одним из наиболее важных средовых факторов является психоэмоциональный стресс. В связи с этим представляет интерес определение генетических детерминант АГ животных, у которых повышенное артериальное давление (АД) развивается вследствие воздействия стресса. Такой стресс-чувствительной гипертензивной линией животных являются крысы НИСАГ (наследственная индуцируемая стрессом артериальная гипертония), полученные А.Л. Маркелем из нормотензивной линии крыс Вистар

в ходе многолетней селекции по критерию чувствительности уровня АД животных к мягкому эмоциональному стрессу (Маркель и др, 2002).

Большинство форм АГ имеет под собой основу в виде комплекса генетических нарушений, приводящих, в конечном счете, к развитию патологии. У крыс линии НИСАГ эти нарушения затрагивают, по-видимому, системы ответа организма на стресс, важнейшей из которых является гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная (ГГАС). Ее активность значительно возрастает при стрессе, что приводит, в том числе, к росту АД. Наши данные указывают на более высокую стресс-реактивность ГГАС крыс линии НИСАГ (Хворостова и др, 2002; Markel et al., 2007). Крысы линии НИСАГ характеризуются и повышенной активностью симпато-адреналовой системы как в состоянии покоя, так и при стрессе (Маркель и др, 2006; Markel et al., 2007).

Увеличение АД даже в отсутствие стресса у крыс НИСАГ может быть обусловлено увеличением чувствительности эффекторных систем (и в первую очередь ренин-ангиотензиновой системы, отвечающей за поддержание водно-солевого баланса и влияющей на уровень артериального давления) к вазоконстрикторным влияниям, например, повышенной адренкортикальной функции и эффекту глюкокортикоидных гормонов. Большую роль в увеличении базового АД, по-видимому, играют также морфологические изменения органов-мишеней, развивающиеся у крыс линии НИСАГ под влиянием частых эпизодов повышения АД вследствие увеличенной реактивности симпатоадреналовой системы. Поэтому мы исследовали состояние ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РАС) у крыс линии НИСАГ в сравнении с нормотензивными крысами инбредной линии WAG, выведенными, как и крысы НИСАГ, из аутбредной линии Wistar.

(3) Исследование структуры эукариотических генов и матричных РНК необходимо для понимания фундаментальных механизмов реализации генетической информации. В настоящее время считается, что инициация трансляции большей части эукариотических мРНК происходит по механизму линейного сканирования, согласно которому 40S субъединица рибосомы связывается с кепом на 5'-конце мРНК и движется вдоль матрицы в поиске инициаторного AUG кодона в подходящем контексте (Kozak, 2005; Jackson, 2010). Показано, что нуклеотиды в районе стартового кодона растений и млекопитающих важны для его взаимодействия с рибосомой: оптимальному контексту соответствуют пурин в -3 и гуанин в +4 положениях вокруг AUG. В экспериментах *in vitro* показано, что в случае субоптимального контекста AUG кодона, часть рибосом не распознает его как старт трансляции и может иницировать трансляцию на следующем AUG («сканирование с подтеканием» (Kozak, 2005)). Помимо механизма «сканирование с подтеканием», инициация трансляции на нескольких стартовых кодонах может осуществляться за счет механизмов реинициации и внутренней

инициации трансляции (Internal Ribosome Entry Sites, IRES). Эффективность механизма реинициации ограничена размером 5'-проксимальной рамки считывания (uORF), а также зависит от размера спейсера (участка мРНК, лежащего между проксимальной uORF и нижерасположенным стартовым кодоном трансляции). Считается, что эффективность реинициации может зависеть от статуса базовых факторов инициации трансляции (eIF2, eIF4E) и этот механизм способен обеспечивать синтез альтернативных изоформ нескольких важных регуляторных факторов млекопитающих. IRES были найдены у пикорнавирусов и их роль интенсивно исследуется: эти специфические сигналы способны направлять рибосомы во внутренние районы мРНК и, кроме того, их активность не регулируется статусом фосфорилирования базовых факторов eIF-4EBP1 и eIF-4EBP2. В целом, ситуацию с альтернативной трансляцией в настоящее время можно охарактеризовать следующим образом: известно, что этот феномен существует, и ряд эукариотических мРНК кодируют несколько функционально-значимых изоформ белков за счет инициации трансляции на двух или более стартовых кодонах. Например, в клетках шпината синтезируются митохондриальная и хлоропластная формы протопорфириногена II, трансляция которых иницируется на двух близкорасположенных альтернативных AUG-кодонах; ДНК-лигаза 1 кодируется в геноме арабидопсиса одним геном, с мРНК которого за счет альтернативной трансляции синтезируются ядерная и митохондриальная формы и т.п. Также известны отдельные случаи, в которых аннотированный белок и его N-укороченный вариант выполняют совершенно различные функции (например, мРНК гистона H4 млекопитающих дополнительно кодирует фактор роста остеобластов), характеризуются различной стабильностью или различаются по уровню функциональной активности (детальное рассмотрение таких случаев приведен в (Kochetov, 2008)). Однако, в целом, число описанных в литературе случаев использования альтернативных стартовых кодонов трансляции невелико и при предсказании структуры генов эукариот их существование не принимается в расчет. В банках данных нуклеотидных последовательностей (GenBank, EMBL) подавляющее большинство мРНК содержат только один аннотированный стартовый кодон и одну ORF. С нашей точки зрения такая ситуация не соответствует действительности и существенная часть транскриптов эукариот может кодировать несколько белков (Bazykin and Kochetov, 2011).

Важным элементом клеточной системы контроля экспрессии генов во время стресса является специфическая трансляционная активность мРНК. В большинстве случаев при стрессе (например, вирусной инфекции, интоксикации, тепловом шоке и т.п.) трансляция большинства клеточных мРНК приостанавливается (Cully and Downward, 2009). Исключением из этого правила являются стресс-специфические мРНК, кодирующие белки стрессового ответа, необходимые для адаптации клетки к неблагоприятным условиям. Такое

выключение нормальной трансляции происходит с помощью регуляции активности фактора инициации трансляции eIF2 $\alpha$ . При фосфорилировании этого белка его активность снижается и это приводит к ингибированию инициации трансляции. Другой механизм связан с фосфорилированием белков eIF-4EVP1 и eIF-4EVP2, связывающихся с базовым фактором инициации трансляции 4E. Если эти белки активны, то они выводят из оборота кеп-связывающийся белок 4E, что ингибирует кеп-зависимую трансляцию большинства клеточных мРНК.

Недавно было показано, что реинициация трансляции в некоторых случаях может служить сенсором стрессовых состояний в эукариотической клетке и использоваться для регуляции экспрессии генов. Реинициация трансляции возможна в случае, если проксимальная рамка считывания очень мала: тогда 40S субъединицы рибосом после терминации трансляции могут оставаться связанными с мРНК и двигаться в 3'-направлении. Через некоторое время фактор eIF2 совместно с инициаторной тРНК связывается с этой 40S субъединицей, что будет означать восстановление трансляционной компетентности и возможность повторной инициации (реинициации) трансляции. Однако, активность фактора eIF2 зависит от статуса фосфорилирования субъединицы eIF2 $\alpha$  по серину в одном из регуляторных сайтов. Фосфорилирование приводит к тому, что количество активных комплексов eIF2 уменьшается и интенсивность трансляции большинства клеточных мРНК снижается. В свою очередь, это также увеличивает время, необходимое для восстановления «трансляционной компетентности» 40S субъединиц рибосомы после терминации трансляции на проксимальной рамке считывания (вследствие того, что концентрация доступного eIF2 снижается).

Следует отметить, что этот механизм работает как один из регуляторов - сенсоров стрессового ответа клеток эукариот. Например, транскрипционный фактор ATF5 содержит в 5'-НТП 2 рамки считывания – проксимальную минирамку, и дистальную рамку размером в несколько десятков кодонов, перекрывающуюся с белок-кодирующей частью (CDS). В норме реинициация трансляции (после терминации на проксимальной минирамке) идет в основном на стартовом кодоне второй лидерной рамки считывания и количество рибосом, достигающих стартового кодона CDS, мало. При фосфорилировании eIF2 $\alpha$  процесс восстановления трансляционной компетентности замедляется, реинициация начинает происходить на стартовом кодоне CDS и происходит синтез транскрипционного фактора ATF5, являющегося одним из индекторов генов стрессового ответа. Аналогичным образом происходит регуляция экспрессии транскрипционного фактора GCN4 у дрожжей (обзор: Wek et al., 2006; Wethmar et al., 2010). Недавно было показано, что реинициация трансляции на мРНК некоторых транскрипционных факторов объясняет синтез нескольких N-укороченных изоформ этих белков, часто отличающихся по функции. В мРНК транскрипционного фактора Her-2 такая

«адресующая» минирамка расположена в 5'-НТП (Spevak et al., 2006) и свойства изоформ пока не исследованы. Однако, в мРНК важнейших транскрипционных факторов C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , SCL лидерные минирамки считывания расположены в пределах CDS и функции N-укороченных изоформ различны (Calkhoven et al, 2000; 2003). В мРНК C/EBP $\alpha$  и C/EBP $\beta$  обнаружено по четыре стартовых кодона трансляции (A (основной), B1, B2, C), причем C удален от начала CDS на значительное расстояние. Кроме этого, есть эволюционно-консервативная минирамка считывания между стартовыми кодонами A и B1. Авторы показали, что в зависимости от активности eIF2 $\alpha$  и eIF4E, синтез N-укороченных изоформ по отношению к полноразмерной форме либо увеличивается (низкая активность eIF2 $\alpha$ ) и это ведет к пролиферации клеток, либо снижается (и это ведет к терминальной дифференциации – на примере адипоцитов). Фосфорилирование eIF2 $\alpha$  осуществляется четырьмя протеинкиназами: PKR (ответ на вирусную инфекцию), HRI (окислительный и тепловой стресс, дефицит железа), PER (ER-стресс), GCN-2 (ультрафиолет, ограничение в питании (например, недостаток незаменимых аминокислот), ингибирование протеазосом).

(4). В рамках проекта проводится исследование молекулярно-генетических механизмов стрессоустойчивости на модели *Drosophila* (у насекомых ответ на стрессовые факторы сопровождается изменением в балансе ряда гормонов и биогенных аминов, что может рассматриваться в качестве интересной модели эволюционной консервативности механизмов стрессового ответа). Установлено, что для нормального протекания оогенеза насекомых необходим баланс гонадотропинов, ЮГ и 20-гидроксиэкдизона (20Э). Нарушение этого баланса вызывает драматические изменения в ходе оогенеза (Soller et al., 1999; Gruntenko et al., 2003). Показано, что у самок дрозофилы существует механизм стабилизации баланса гонадотропинов: при изменении уровня одного из них в результате мутации или при стрессе баланс восстанавливается за счет соответствующего изменения титра второго. Посредником во взаиморегуляции ЮГ и 20Э является дофамин (ДА) - один из основных медиаторов, участвующих в контроле приспособленности насекомых (Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Известно, что влияние дофамина (ДА) на метаболизм клетки опосредуется двумя семействами G-протеин-сопряженных рецепторов, D1-подобных и D2-подобных (обз.: Vallone et al., 2000). Показано, что D1-подобные рецепторы связываются со стимулирующими G белками (Gas), вызывая активацию аденилатциклазы и запуск каскада, приводящего к изменениям матричной активности хроматина. D2-подобные рецепторы передают сигнал через ингибирующие G белки (Gai/o), вызывая ингибирование аденилатциклазы (обз.: Vallone et al., 2000). D2-подобный рецептор *Drosophila* (DD2R) был клонирован и охарактеризован (Hearn et al., 2002). Дрэпер с соавторами (Draper et al., 2007) определили паттерн пространственной



экспрессии гена *DD2R* и функционально охарактеризовали мух со сниженным уровнем экспрессии *DD2R*.

В отчетный период мы: (1) иммуногистохимически изучили экспрессию *DD2R* в жировом теле, яичниках и *corpus allatum* самок *D. melanogaster* дикого типа и (2) оценили уровень синтеза ЮГ у трансгенных самок *D. melanogaster* с нормальной и сниженной посредством РНК-интерференции экспрессией *DD2R*. В качестве модели использовали трансгенную линию *D. melanogaster*, *UAS-ds-DD2R*, несущую генетическую конструкцию - антисмысловой супрессор гена *DD2R* *D. melanogaster* (Draper et al., 2007), ее линию предшественник *w1118* и линию *Aug21-Gal4/Cyo::arm-GFP*, несущую конструкцию *Aug21-Gal4*, специфически экспрессирующуюся в *CA*, и балансер *Cyo::arm-GFP*. При скрещивании линий *UAS-ds-DD2R* и *Aug21-Gal4/Cyo::arm-GFP* в поколении F1 будут получаться особи, у которых супрессор гена *DD2R* активен только в клетках *CA*. Гибриды *Aug21-Gal4>w1118* используются в качестве контроля. Кроме того, для визуализации *CA* (экспрессии в ее клетках красного флюоресцентного белка (RFP)) мы создали линию *Aug21>::UAS-RFP* рекомбинацией *Aug21>* с  $P\{UASp-Act5C.mRFP\}$  (*UAS-RFP*).

## **1. Создание ДНК-библиотек из иммунопреципитированного материала органов экспериментальных животных, подвергнутых воздействию ксенобиотиков**

Первой частью работ в выполнении задач данного этапа являлось получение материала иммунопреципитированного хроматина мышей линии C57BL для последующего создания библиотек системы SOLiD. Двухмесячным животным за 18 ч до забоя вводили внутривенно раствор ОАТ в дозе 22.5 мг на 100 г массы тела, либо растворитель (кукурузное масло), новорождённым мышатам масло не вводилось. Для проведения иммунопреципитаций и создания библиотек SOLiD был использован набор SOLiD ChIP-Seq Kit фирмы Applied Biosystems.

Животное декапитировали. 50 мг печени гомогенизировали на льду максимально быстро в 500 мкл буфера TBS, 2 аликвоты по 100 мкл добавляли к 900 мкл 1% раствора формальдегида в PBS и инкубировали при постоянном перемешивании (ротатор RS-24 Biosan) в течение 10 мин при комнатной температуре. В результате такой обработки образуются ковалентные «сшивки» ДНК с белками, отстоящими от неё на расстоянии в пределах 2 Å. Реакцию останавливали добавлением глицина до конечной концентрации 0.125 М и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Образцы центрифугировали 3 мин при 300g при 2°C (центрифуга Eppendorf 5804R). Супернатант сливали, осадок клеток однократно без ресуспендирования промывали TBS, ресуспендировали в 35 мкл лизирующего буфера с

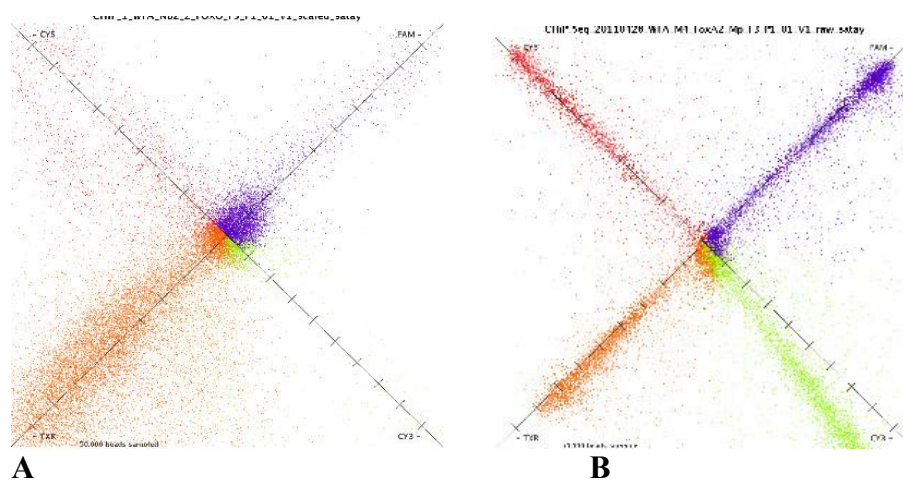
ингибиторами протеаз, инкубировали на льду 5 мин., после чего суспендировали и объединяли. Далее лизат подвергали ультразвуковой обработке на приборе Covaris в микропробирках из боросиликатного стекла, после чего центрифугировали в течение 4 мин при 21000 g при 2°C. Из супернатанта отбиралось 50 мкл, не забирая верхний и нижний слой. Озвученный хроматин разводился 1:20 буфером для разведения. Магнитные шарики Dynabeads инкубировались с соответствующими антителами (против FoxO3 – 3 мкл, FoxA2 – 4 мкл, HNF4 – 4 мкл, гистон H3 – 2 мкл, мышинный IgG – 1 мкл) 1 час при ротации при 4°C, после чего отмывались на магнитном штативе и инкубировались со 100 мкл. разведённого хроматина 2 часа при ротации при 4°C. Далее связанный с Dynabeads хроматин промывался согласно инструкции к набору, ДНК-белковые сшивки гидролизировались в специальном буфере, фрагменты ДНК смывались с Dynabeads и очищались с помощью магнитных шариков из состава набора.

Для создания библиотек использовался набор SOLiD Fragment Library Oligos Kit. Для каждого образца проводилась достройка концов с помощью смеси ферментов из набора, далее проводилась селекция по размеру – к 100 мкл образца добавлялось 70 мкл. магнитных шариков AMPureXP, при этом фрагменты ДНК длиннее 300 п.н. сорбировались на шариках и далее отбрасывались. Жидкая фракция дочищалась добавлением 110 мкл AMPureXP и последующей элюцией с магнитных шариков. К очищенным фрагментам лигировались адаптеры P1 и P2, после чего ДНК очищалась сорбцией на шариках AMPureXP. Полученные фрагменты амплифицировались 15 циклов в 250 мкл ПЦР-реакции с соответствующими праймерами из набора, очищались сорбцией на шариках AMPureXP, концентрации библиотек измерялись на флуориметре Q-Bit набором dsDNA HS assay kit. Всего получено по 6 библиотек для контрольных и новорождённых мышей, и 5 библиотек – для обработанных канцерогеном (без гистона H3). Концентрации полученных библиотек указаны в таблице 1, для мышей, обработанных ОАТ, они оказались существенно ниже.

**Таблица 1.** Концентрации полученных библиотек

Новорождённые мыши		Мыши контроль		Мыши ОАТ	
Библиотека	Конц. (нг/мкл)	Библиотека	Конц. (нг/мкл)	Библиотека	Конц. (нг/мкл)
Histon H3	82	M_Histon H3	75	A_Histon H3	1
FoxO3A	1	M_FoxO3A	0.65	A_FoxO3A	0.15
HNF4	0.16	M_HNF4	0.21	A_HNF4	0.08
FoxA2 Mp	0.20	M_FoxA2 Mp	0.21	A_FoxA2 Mp	0.08
Input Cont	65	M_Input Cont	65	A_Input Cont	16
IgG	0.17	M_IgG	0.12	-	-

Окончательная оценка качества полученных библиотек делается на основе Workflow Analysis – единичного тестового лигирования на приборе SOLiD. После проведения WFA для трёх из пяти библиотек мышей, обработанных OAT (FoxO3A, FoxA2, IgG), было обнаружено, что они имеют неудовлетворительное качество. На цветовой диаграмме наблюдалось доминирование одного цвета (пример - Рис 1А), в отличие от высококачественных библиотек контрольных и новорожденных мышей (пример - Рис 1В), показавших ожидаемое равномерное распределение по 4 цветам с преимущественной локализацией бидсов на осях, что является показателем моноклональности полученных молекулярных колоний. Исходя из этого, было принято решение не использовать данную серию библиотек для секвенирования на системе SOLiD, ограничившись серией библиотек контрольных и новорожденных мышей.



**Рис. 1.** Сравнение результатов WFA для непригодной (А, библиотека «Мыши OAT A\_FoxO3A») и качественной (В, библиотека «Мыши контроль M\_FoxA2») библиотек для SOLiD.

## 2. Проведение массового параллельного секвенирования полученных ДНК-библиотек

В рамках выполнения проекта по секвенированию полученных специфических ChIP-библиотек была проведена оптимизация условий e-ПЦР по количеству матрицы, что является важным условием получения моноклональных бидсов. Средняя длина фрагментов библиотек составила 250 п.н., соответственно, расчётная концентрация ДНК для концентрации 500 pM была равна 96 pg/mkl. Исходное разведение библиотек было выбрано 0.5 pM, по результатам тестовых WFA для библиотек HistonH3 и InputCont выбрана концентрация матрицы 0.3 pM, для библиотек FoxO3A, HNF4, FoxA2Mr – 0.8 pM. e-PCR проводилась согласно методике производителя в варианте Full Scale. Эмульсия готовилась с использованием миксера IKA Ultra-Turrax. e-PCR проводилась на амплификаторе GeneAmp 9700, в связи с относительно большой средней длиной фрагментов библиотеки число циклов ПЦР было увеличено с 40 до 50. После проведения e-PCR визуально оценивалось отсутствие

разрушения эмульсии в ходе реакции, далее эмульсия разрушалась в присутствии бутанола, бидсы осаждались центрифугированием при 2000g, промывались Bead Wash буфером и ресуспендировались в буфере TEX. Количество полученных бидсов рассчитывалось измерением поглощения на спектофотометре NanoDrop. Далее согласно методике проводилось выделение фракции бидсов, несущих амплифицированную матрицу с P2 адаптером на 5'-конце. После этого проводилась модификация 3'-концов ДНК-фрагментов для последующей ковалентной пришивки на слайды SOLiD, и измерение концентрации фракции обогащённых бидсов. Степень обогащения варьировала от 9% (библиотека HNF4 новорождённые мыши) до 18% (библиотека M\_Input Cont, 2-х месячные мыши), находясь в рекомендованных пределах. Окончательное определение качества и количества полученных бидсов проводилось с помощью WFA, для проведения которого каждый слайд SOLiD делится на 4 части, и на каждую четверть наносится 15 млн бидсов от одной из библиотек. Всего проведено 4 WFA, в которых проанализировано 15 результатов e-PCR. Количество полученных бидсов приведены в таблице 2, для всех приведённых библиотек качество полученных бидсов оказалось вполне удовлетворительным.

**Таблица 2.** Количество бидсов, полученных для секвенирования на системе SOLiD.

Новорождённые мыши		Мыши контроль	
Библиотека	Кол-во бидсов (млн)	Библиотека	Кол-во бидсов (млн)
Histon H3	205	M_Histon H3	129
FoxO3A	192	M_FoxO3A	240
HNF4	135	M_HNF4	115
FoxA2 Mp	180	M_FoxA2 Mp	109
Input Cont	220	M_Input Cont	160
IgG	136	M_IgG	112

Для секвенирования каждый слайд SOLiD делился на 4 части, каждый образец наносился на 2 четверти одного слайда. Уже проведено секвенирование 4 образцов контрольных мышей (M\_Histon H3, M\_FoxO3A, M\_FoxA2 Mp и M\_Input Cont). В настоящий момент ведётся секвенирование образцов M\_IgG и M\_HNF4, остальные образцы будут секвенированы непосредственно после этого.

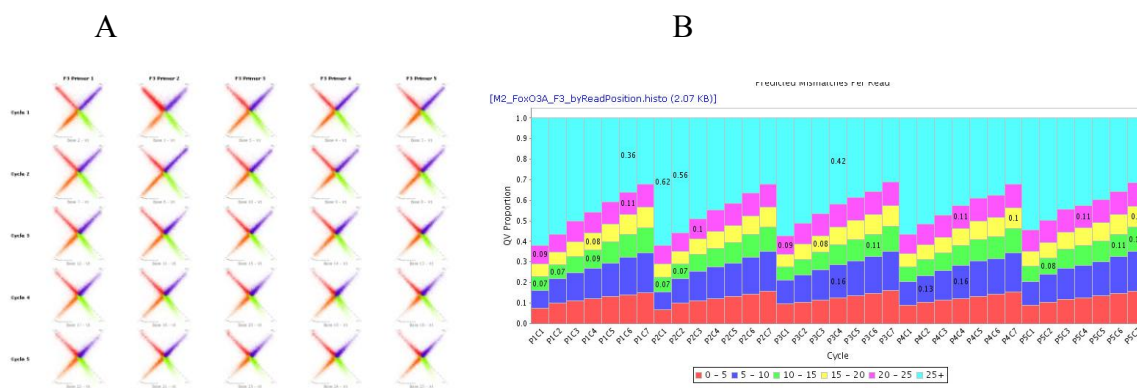
Для секвенирования использовано: M\_Histon H3 – 2x64 млн бидсов, M\_FoxO3A – 2x80 млн, M\_HNF4 – 2x57 млн, M\_FoxA2 Mp – 2x55 млн, M\_Input Cont – 2x80, M\_IgG - 2x56 млн.

Получены следующие объёмы данных мапируемых последовательностей:

M\_Histon H3 – 5.66 Gb;      M\_FoxO3A – 5.19 Gb

M\_FoxA2 Mp – 4.17 Gb; M\_Input Cont – 7.32 Gb

Полученные результаты секвенирования на системе SOLiD имеют достаточно высокое качество (см. пример на рис. 2) и в настоящий момент переданы для биоинформатической обработки.

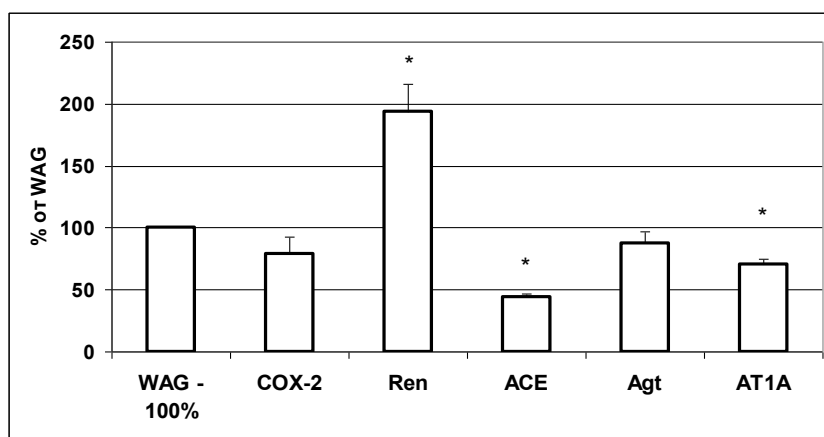


**Рис. 2.** А) Образец FoxO3A, цветковые диаграммы для первых 5 лигирований, В) диаграмма процентного распределения чтений по QV, QV=20 соответствует 99% достоверности.

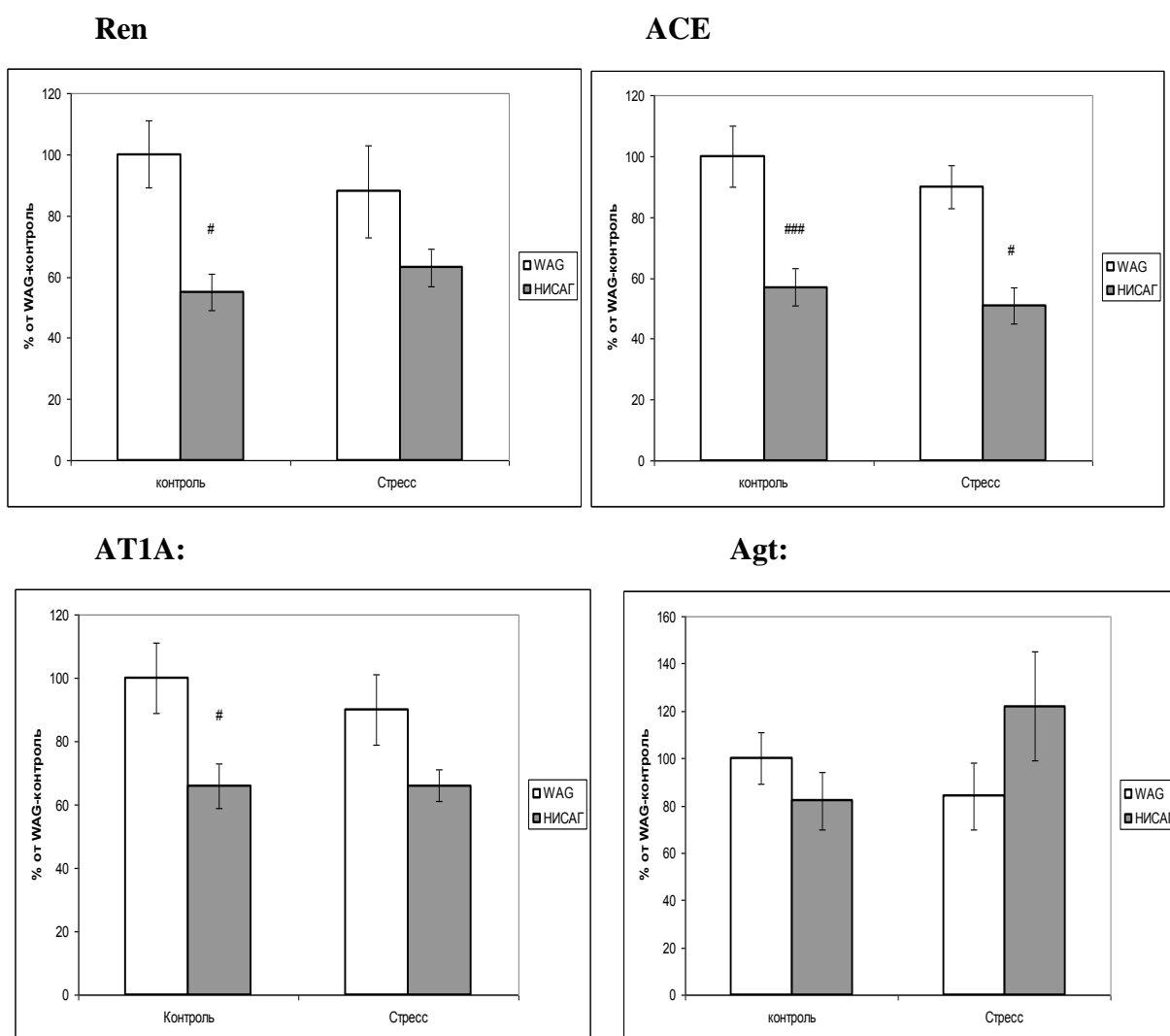
### 3. Определение уровня экспрессии ключевых генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG в норме и при стрессе

Изучение экспрессии генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), связанных с развитием гипертонии, в почках молодых (1.5 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ методом полуколичественной PCR в реальном времени выявило достоверное снижение содержания мРНК генов ангиотензин-превращающего фермента *Ace* (вдвое) и рецептора ангиотензина II 1А типа (AT1A) (на 30%) по сравнению с нормотензивным контролем.

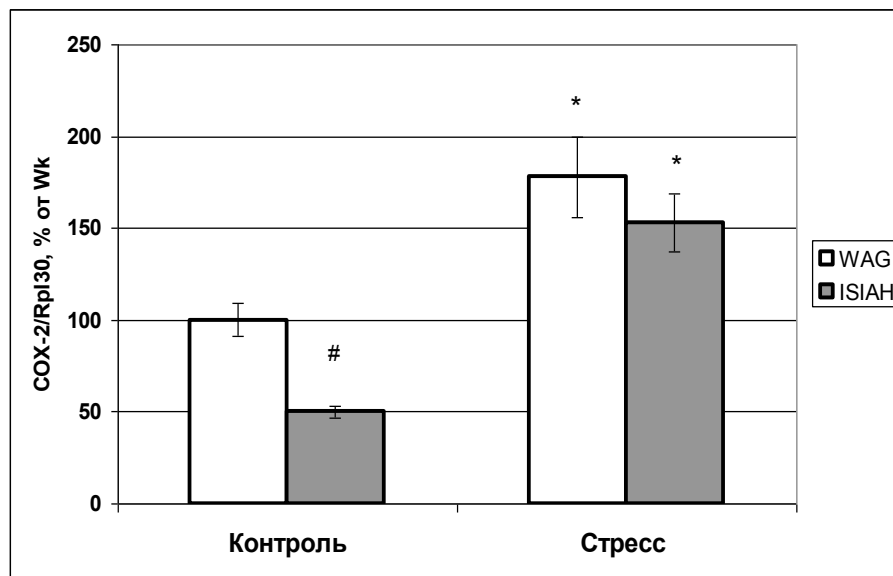
Снижение экспрессии генов ангиотензиногена (*Agt*) и циклооксигеназы-2 (*COX-2*, или *Ptgs2*), модулирующей продукцию ренина в почках крыс, проявляется в меньшей степени и не является статистически достоверным. Вместе с тем, мы выявили в почках молодых крыс линии НИСАГ почти двукратное превышение содержания мРНК ренина (*Ren*) по сравнению с нормотензивными крысами линии WAG (Рис. 3). Нами показано, что уровень экспрессии мРНК генов РАС в почке зрелых (4 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ (*Ren*, *Ace*, рецептора AT1A)(Рис.4), а также гена *COX-2* (Рис.5), в покое достоверно понижен по сравнению с крысами нормотензивной линии WAG. Исключением являлся только ген ангиотензиногена *Agt*, экспрессия которого не отличалась у крыс линий WAG и НИСАГ (Fedoseeva et al., 2011).



**Рис. 3.** Уровень мРНК генов РАС и *COX-2* в почках молодых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG (содержание мРНК у крыс WAG для всех генов принято за 100%). Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. \* – достоверное отличие от WAG ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 4.** Экспрессия генов РАС в почках зрелых (4 мес) крыс НИСАГ (серые столбики) по сравнению с крысами WAG (белые столбики) в покое и при стрессе обезвоживания. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. # – достоверные межгрупповые различия,  $p < 0.05$ ; ### –  $p < 0.005$ .



**Рис. 5.** Экспрессия гена *COX-2* в почках зрелых (4 мес) крыс НИСАГ (серые столбики) по сравнению с крысами WAG (белые столбики) в покое и при стрессе обезвоживания. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. # - достоверные различия между линиями, \* - достоверный эффект стресса.

В наших исследованиях мы показали, что в почках крыс обеих линий стресс водной депривации за 17 часов фактически не приводил к изменениям экспрессии изучаемых генов PAC (Рис. 2). В то же время отмечено достоверное усиление экспрессии гена *COX-2*: у крыс НИСАГ – в 3 раза, а у крыс WAG – только на 70% по сравнению с контрольным уровнем. В результате при стрессе уровень мРНК *COX-2* у крыс НИСАГ становился близким к таковому у крыс WAG, хотя в покое он был в 2 раза ниже, чем у крыс WAG (Рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении базальной активности ренин-ангиотензиновой системы в почке у гипертензивных крыс линии НИСАГ, что, очевидно, надо рассматривать в контексте представлений о низкорениновой форме артериальной гипертензии. Низкорениновая гипертензия составляет примерно третью часть случаев гипертонической болезни человека. Она характеризуется, помимо снижения активности ренина, некоторыми специфическими особенностями, такими как повышение чувствительности АД к соли, увеличением объема внеклеточной жидкости, в том числе плазмы крови, и накоплением в организме натрия. Кроме того, экспериментальные исследования показали, что низкорениновая соль-чувствительная гипертензия связана со сниженным уровнем синтеза NO и с дефектом зависимой от эндотелия вазодилатации (Duffy et al., 2005), подтверждая тем самым, что нарушения системы NO также включены в развитие гипертензии.

В литературе описано несколько моделей низкорениновой формы гипертонии. К ним относятся гипертензивные крысы линии Lion (LH), у которых уровень ренина и проренина как в плазме, так и в почке значительно ниже по сравнению с контролем. Экскреция альдостерона у них также заметно снижена. Помимо низкого базового значения, синтез ренина в почке у крыс LH слабо реагирует на такие физиологические стимулы, как снижение почечного перфузионного давления и  $\beta$ -адренергическую стимуляцию. Наконец, как это часто наблюдается у пациентов с низкорениновой формой АГ, крысы LH оказались соль-чувствительными (Sassard et al., 2003).

Низким уровнем ренина характеризуется и другая соль-чувствительная линия - крысы Dahl SS (DS). Не только активность ренина плазмы, но и концентрация альдостерона плазмы значительно понижены у крыс DS, находившихся на высокосолевого диете с возраста 7 недель, хотя уровень кортикостерона плазмы не отличался от контроля (Nagata et al., 2006). Исследования на крысах DS показали, что, как и у человека, низкорениновая соль-чувствительная гипертония – это специфическое состояние, которое характеризуется пониженной биодоступностью NO, что проявляется в нарушении NO-зависимой сосудистой релаксации и повышении чувствительности сосудов к действию ангиотензина II (Ang II). Блокада рецептора AT1 способна нормализовать состояние таких подопытных животных (Zhou et al., 2006).

Несмотря на некоторую противоречивость литературных данных, большинство исследователей, работающих с крысами SHR, также относят их к нормо- или низкорениновой форме гипертонии (Nakamura et al., 1995). Однако в раннем возрасте у этих крыс отмечен период, когда активность ренина в плазме повышена (Gomez et al., 1988). В этом периоде короткая блокада PАС у крысят SHR индуцирует снижение кровяного давления, которое остается заметным в течение нескольких недель после снятия блокады (Nagaraj et al., 1990). Поскольку аналогичный ранний всплеск активности PАС наблюдался и у крыс LH, и в наших экспериментах на крысах НИСАГ, то можно полагать, что повышение функциональной активности рениновой системы почки в раннем онтогенезе является необходимым этапом формирования гипертензивного статуса, по крайней мере, у некоторых линий крыс.

Проведенные ранее исследования линии крыс НИСАГ показали, что активность ренина и уровень альдостерона плазмы не превышают соответствующие показатели у нормотензивной линии крыс WAG (Amstislavsky et al., 2005; Черкасова и др., 2005). Был показан и сниженный уровень NO-синтазы (NOS)1 в почке (Amstislavsky et al., 2005). Приведенные данные, несомненно, позволяют отнести линию крыс НИСАГ к группе моделей низкорениновой формы гипертонии. Данные по измерению концентрации натрия в плазме крови и в соединительной ткани, которая является естественным депо натрия в организме, также



свидетельствуют в пользу наличия классической картины низкорениновой гипертонии у крыс НИСАГ. Для депо натрия, каковым является соединительная ткань, такая большая разница между линиями животных, очевидно, допустима, и она значительно меньше в плазме крови, в которой концентрации ионов строго гомеостатированы (Fedoseeva et al., 2011).

Известно, что между рениновой системой почки и уровнем натрия в организме существуют реципрокные отношения: с одной стороны, ренин-альдостероновая система призвана задерживать натрий, с другой стороны, задержка натрия приводит к угнетению почечной рениновой системы, что мы и наблюдаем. Однако в таком случае к задержке натрия должны приводить другие причины. В литературе описаны некоторые формы артериальной гипертонии, которые сопровождаются накоплением натрия на фоне снижения функции рениновой системы почки. В частности, это – так называемый синдром «кажущегося избытка минералокортикоидов» (apparent mineralocorticoid excess) (Wilson et al., 1998). Синдром развивается по причине ослабления функции  $11\beta$ -гидростероид дегидрогеназы ( $11\beta$ -HSD2), фермента, который у человека переводит кортизол в кортизон, а у крыс – кортикостерон в  $11$ -дегидрокортикостерон, и тем самым защищает минералокортикоидные рецепторы от избыточной стимуляции глюкокортикоидами, которых секретируется на два порядка больше, чем альдостерона. При этом задержка натрия происходит фактически без участия альдостерона, секреция которого может даже снижаться вследствие подавления рениновой системы почки. Однако, что касается крыс НИСАГ, было показано, что соотношение кортикостерон-дегидрокортикостерон в плазме крови, оттекающей от надпочечника, плазме периферической крови и в ткани надпочечника не различалось у крыс линий WAG и НИСАГ, что позволяет исключить предположение об усилении минералокортикоидной функции за счет избытка кортикостерона у крыс НИСАГ (Антонов и др., 2010). Второй вариант усиленной задержки натрия при угнетенной функции рениновой системы может быть объяснен нарушением функции самих транспортных ионных каналов почки, которые являются мишенью альдостерона. Это характерно для так называемого синдрома Лиддла, когда находят мутации генов, кодирующих синтез субъединиц эпителиального натриевого канала ENaC. В работе Amstislavsky et al. (2005) было показано, что экспрессия мРНК ENaC, как, впрочем, и других ион транспортирующих каналов, в почке крыс НИСАГ повышена. Эта особенность, очевидно, нуждается в дальнейшем исследовании, однако с большой вероятностью можно предположить, что именно изменение функции ионных каналов почки лежит в основе формирования низкорениновой артериальной гипертонии у крыс НИСАГ.

Известно, что после 24-х часовой водной депривации в плазме крови у крыс НИСАГ наблюдается повышение активности ренина (Черкасова и др., 2006). С другой стороны, показано, что экспрессия COX-2 в ткани почки активизируется при снижении объемов

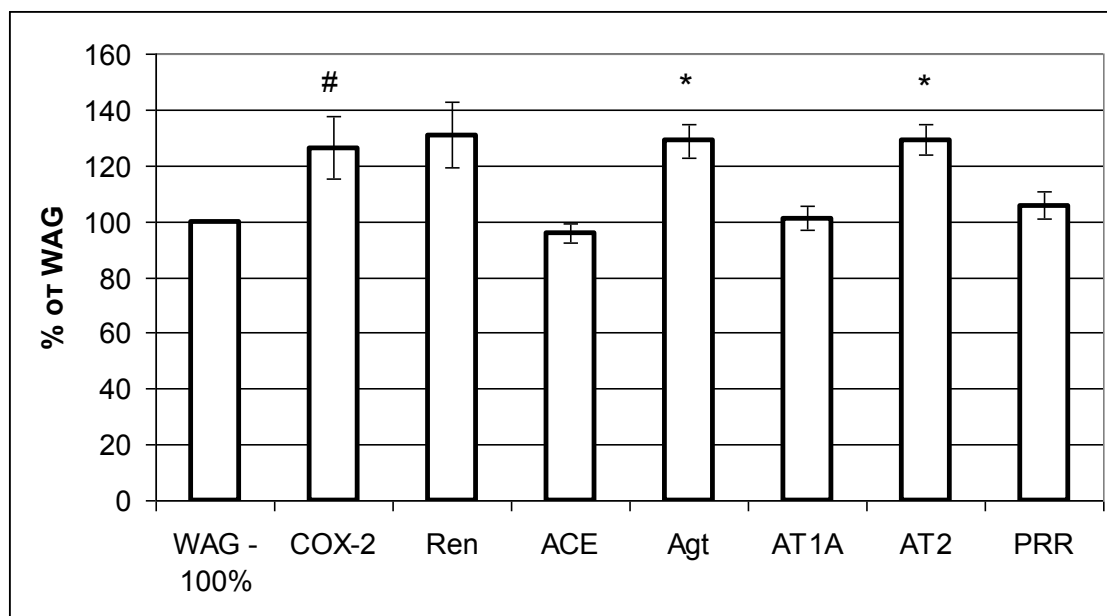
внеклеточной жидкости и нарушении водно-электролитного баланса организма (Yang et al., 1998). Многие экспериментальные данные подтверждают роль COX-2 как медиатора выброса ренина (Cheng, Harris, 2004). Простаноиды – производные COX-2 играют важную роль в регулировании реабсорбции Na и воды, а также включены в модулирование экскреции Na. Ang II может ингибировать экспрессию COX-2 в коре почки через стимуляцию своего рецептора AT1. И, наоборот, показано, что ингибирование COX-2 повышает и продлевает прессорный эффект Ang II (Cheng, Harris, 2004; Qi et al., 2002). Простаноиды – производные COX-2 играют роль в регуляции секреции ренина, но не экспрессии гена ренина (Kammerl et al., 2001). Таким образом, можно предположить, что при относительно непродолжительном лишении воды повышение активности ренина в плазме крови происходит исключительно за счет стимулированного COX-2 выброса его запасов из клеток юкстагломерулярного аппарата почки.

Исходя из приведенных данных, мы предположили, что изменение функции ионных каналов почки, наряду с усилением активности гипофизарно-адренокортикальной и симпатoadреналовой систем, может быть одним из факторов формирования низкорениновой артериальной гипертонии у крыс НИСАГ. Кроме того, пониженный уровень активности ренина – лимитирующего звена PAC – в почках крыс линии НИСАГ может быть обусловлен сниженной благодаря повышенному уровню кортикостерона активностью COX-2. В то же время можно предположить связь пониженной экспрессии гена ренина с уменьшением активности NOS1, отмеченным у этих животных (Amstislavsky et al., 2005).

Ранее было показано, что крысы со спонтанной гипертонией SHR характеризуются изменением уровня экспрессии генов PAC непосредственно в мозговых структурах (Tamura et al., 1996). Содержание и обновление ангиотензина II (Ang II) в гипоталамусе были увеличены у взрослых SHR по сравнению с нормотензивным контролем. Крысы SHR также характеризовались увеличением сайтов связывания Ang II в некоторых ядрах гипоталамуса и продолговатого мозга и повышением содержания мРНК рецептора *AT1A* в переднем отделе гипоталамуса. В дополнение к этому показано увеличение концентрации ангиотензинового рецептора AT1A в стволе мозга у крыс SHR по сравнению с крысами WKY (Komatsu et al., 1996). Начиная с 4-недельного возраста, особенно в *area preoptica* гипоталамуса, у крыс SHR отмечался повышенный уровень мРНК *Agt*, который далее рос по мере взросления гипертензивных крыс (Shibata et al., 1993). Ренин-подобная активность в переднем отделе гипоталамуса и некоторых ядрах продолговатого мозга в процессе развития гипертонии также была выше у крыс SHR по сравнению с контрольной нормотензивной линией WKY (Phillips et al., 1997). Все эти данные позволяют предполагать, что PAC мозга может активно участвовать в механизме повышения артериального давления не только у гипертензивных крыс линии

SHR, но и у других модельных линий. Однако на крысах линии НИСАГ работ по изучению экспрессии мРНК генов PAC в мозговых структурах до настоящего момента опубликовано не было.

Мы изучали экспрессию как «классических» генов PAC (*Ren*, *Agt*, *Ace* и рецептора AT1A), так и генов, особое внимание которым начали уделять только в последнее десятилетие, а именно, рецептора ангиотензина 2-го типа (AT2) и рецептора ренина/проренина (PRR).



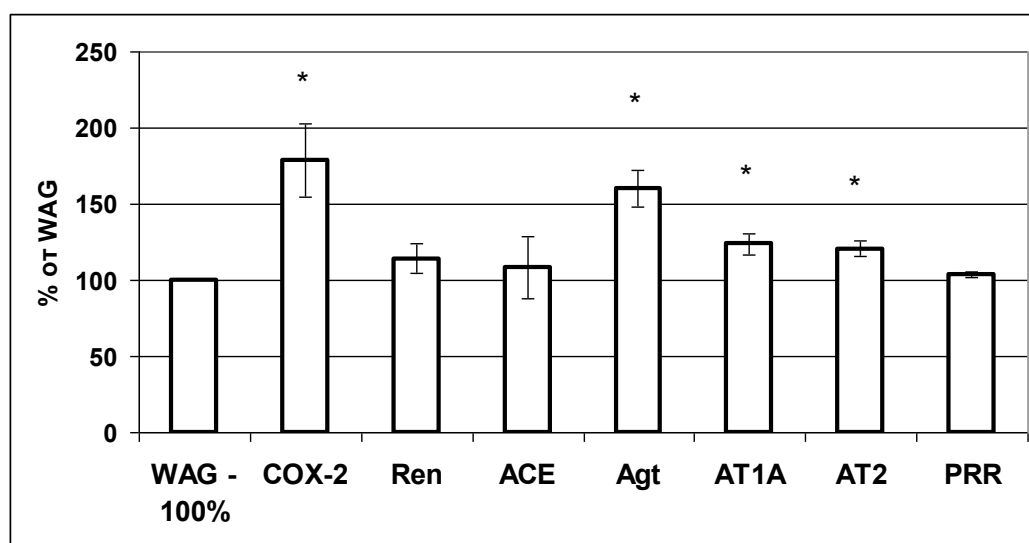
**Рис. 6.** Уровень мРНК генов PAC и *COX-2* в гипоталамусе молодых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. \* –  $p < 0,05$  по ANOVA, # – достоверно только по непараметрическим тестам (критерий Манна-Уитни и медианный тест).

Мы показали достоверное повышение уровней мРНК гена *Agt* и гена рецептора AT2 на 30% в гипоталамусе молодых (1.5 мес) крыс линии НИСАГ относительно контрольной линии WAG. Разницы в экспрессии мРНК генов *Ren* и *ACE* и рецепторов AT1A и PRR в гипоталамусе полторамесячных крыс НИСАГ и WAG не отмечается (Рис. 6).

В продолговатом мозге молодых (1.5 мес) крыс НИСАГ отмечается повышение экспрессии мРНК генов *Agt* и рецептора AT1A (Рис. 8). Оно составляет 60% и 24% соответственно. Изменений в экспрессии мРНК генов *Ren*, *Ace* и рецепторов AT2 и PRR относительно контрольной нормотензивной линии не отмечается.

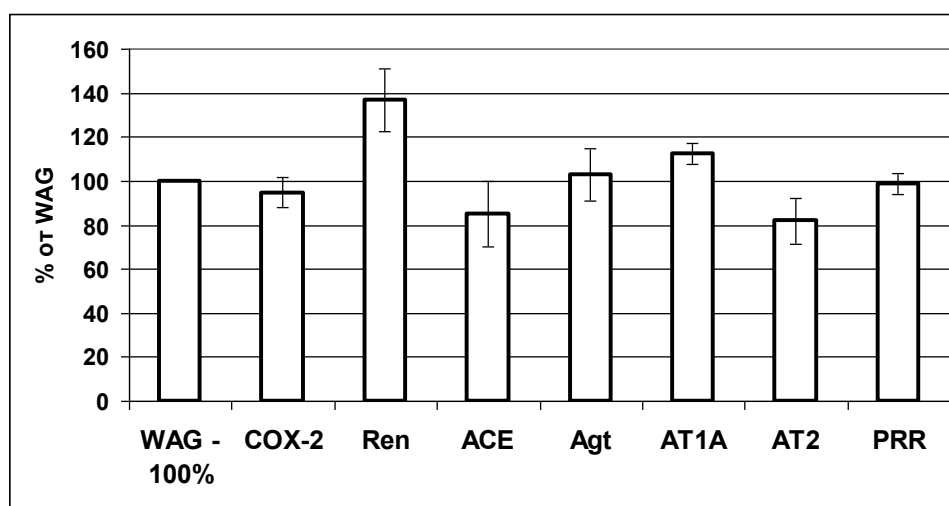
Как и в других органах, мы исследовали экспрессию гена ключевого фермента биосинтеза простагландинов *COX-2* в мозговых структурах. Уровень мРНК *COX-2* в гипоталамусе у молодых крыс НИСАГ был повышен на 26% по сравнению с крысами WAG (Рис. 6). Статистическая обработка показала, что разница не достигает уровня достоверности по

анализу ANOVA, хотя непараметрические тесты (критерий Манна – Уитни и медианный тест) указывают на статистическую значимость результата.

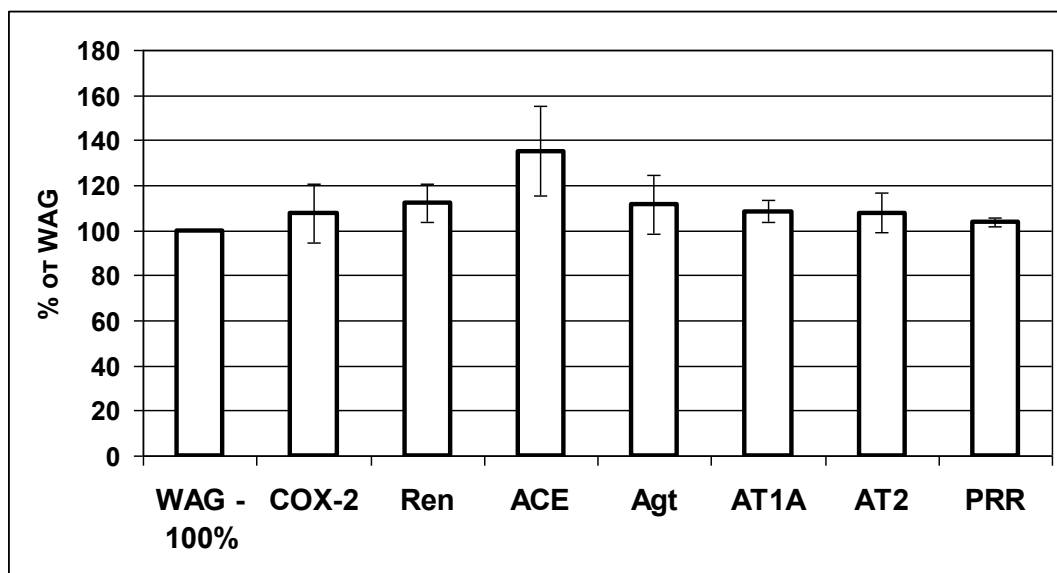


**Рис. 7.** Уровень мРНК генов PAC и *COX-2* в продолговатом мозге молодых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. \* –  $p < 0.05$ .

В продолговатом мозге молодых крыс НИСАГ относительный уровень мРНК *COX-2* был повышен почти на 80 % по сравнению с крысами WAG (Рис. 7). У взрослых (4 и 7 мес) животных НИСАГ в состоянии покоя ни в гипоталамусе, ни в продолговатом мозге достоверных различий в экспрессии мРНК генов *Ace*, *Ren* и *Agt*, а также рецепторов PRR, AT1A и AT2 и гена *COX-2* по сравнению с контрольной линией WAG не выявлено (рис. 8 и 9).

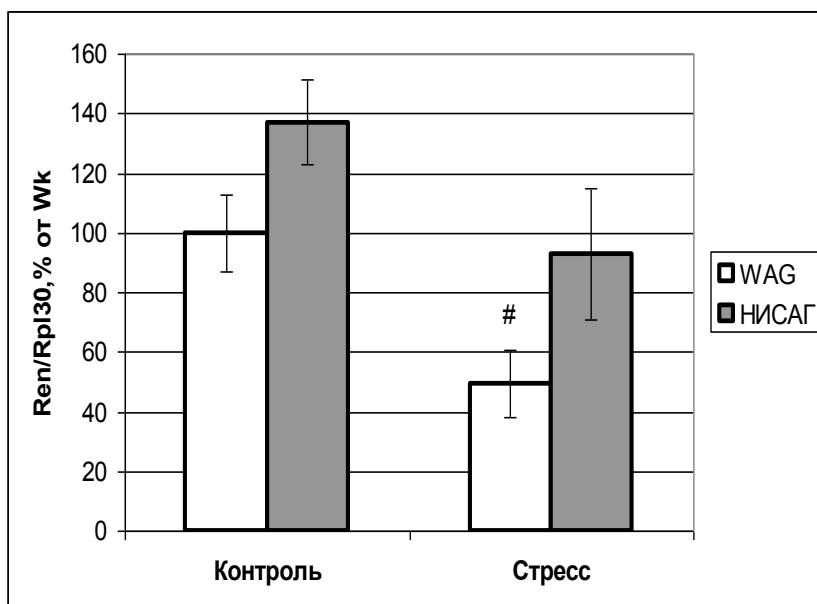


**Рис. 8.** Уровень мРНК генов PAC и *COX-2* в гипоталамусе взрослых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM.

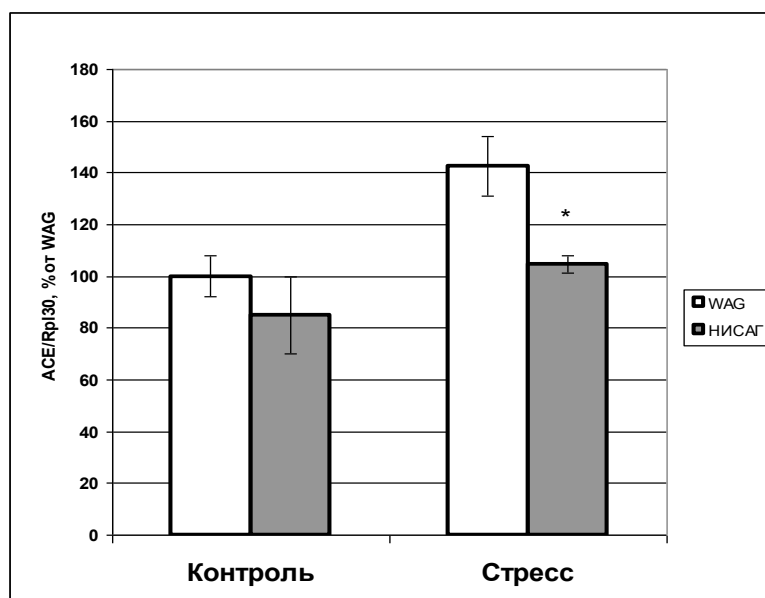


**Рис. 9.** Уровень мРНК генов PAC и COX-2 в продолговатом мозге взрослых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM.

Влияние стресса водной депривации мы изучали в отделе мозга, который связан с деятельностью основных систем, влияющих как на реакцию на стресс, т.е. гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГАС) и симпатoadреналовой, так и управляющей уровнем артериального давления, ренин-ангиотензиновой (РАС) – то есть в гипоталамусе.



**Рис. 10.** Относительное содержание мРНК ренина в гипоталамусе крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 4 месяцев в покое и при стрессе обезвоживания. # – достоверное различие между контролем и опытом ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 11.** Относительное содержание мРНК гена *Ace* в гипоталамусе крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 4 месяцев в покое и при стрессе обезвоживания. \* – достоверное различие между линиями ( $p < 0.05$ ).

Анализ экспрессии ренина в гипоталамусе взрослых (4 мес) крыс линий WAG и НИСАГ в покое и в условиях водной депривации показал статистически значимое снижение уровня мРНК ренина при стрессе обезвоживания у крыс линии WAG (Рис. 10). Снижение же содержания мРНК *Ren* у крыс НИСАГ не достигало статистически достоверного значения из-за высокого внутригруппового разброса данных.

Анализ экспрессии гена *Ace* в гипоталамусе взрослых крыс показал, что хотя этот показатель рос у крыс WAG при стрессе, однако разница с экспрессией в состоянии покоя не достигала достоверного уровня, а различия между линиями животных становились статистически значимыми лишь на фоне стресса (Рис. 11).

Что касается других исследуемых генов, то нам не удалось выявить различий в уровнях мРНК гена *Agt* и рецепторов ангиотензина II, а также гена *COX-2* у крыс двух линий ни в состоянии покоя, ни при стрессе. Рассматриваемые нами мозговые структуры изолированы от общего кровотока гематоэнцефалическим барьером, который препятствует действию Ang II плазмы крови на рецепторы, расположенные в ЦНС. Локальная РАС мозга оказывает автономное влияние на регуляцию артериального давления посредством усиления секреции вазопрессина и гормонов надпочечников, а также участвуя в центральной активации симпатической нервной системы (Schinke et al., 1999).

На основе полученных ранее данных было сделано заключение о наличии низкорениновой формы гипертонии у крыс линии НИСАГ. Однако, несмотря на то, что в почках крыс НИСАГ экспрессия мРНК ренина понижена, в мозговых структурах она находится на уровне, по

крайней мере, не ниже наблюдаемого у контрольной линии WAG. Это согласуется с данными, полученными другими исследователями, о том, что регуляция деятельности мозговой PAC происходит автономным образом, независимо от регуляции PAC в других органах (Ruiz et al., 1990). Так, показано, что введение фармакологических блокаторов мозговой PAC может оказывать значительное влияние на уровень артериального давления экспериментальных животных вне зависимости от уровня активности периферической PAC. Микроинъекции крысам гипертензивных линий SHR и TGR mRen2 каптоприла (ингибитора ACE) непосредственно в желудочки мозга приводили к понижению артериального давления и при этом не влияли на активность ACE на периферии. Аналогичное введение лозартана – блокатора ангиотензинового рецептора AT1A – также приводило к понижению артериального давления у данных гипертензивных животных. Введение же названных препаратов в мозговые структуры нормотензивных крыс не сопровождалось изменением артериального давления (Park, Leenen, 2001).

Мы показали у молодых крыс НИСАГ повышенное содержание мРНК гена предшественника ангиотензина II *Agt* в обеих исследуемых мозговых структурах, связанных с регуляцией артериального давления. Несмотря на отсутствие достоверных различий между линиями крыс в уровнях мРНК ренина в этих структурах, можно предположить, что рост экспрессии *Agt* – первый шаг к повышению содержания Ang II в гипоталамусе и продолговатом мозге у молодых крыс НИСАГ. В этом же возрасте мы наблюдали и дисбаланс мРНК рецепторов Ang II у гипертензивных животных: в гипоталамусе у них повышено содержание мРНК гена рецептора AT2, в продолговатом мозге – обоих изучаемых рецепторов, AT1A и AT2.

Известно, что существует тесная связь между Ang II и симпатической нервной активностью (Malpas, 2010). Ангиотензин (Ang II) оказывает сильное влияние на центральную нервную систему, регулируя и модулируя ощущение жажды, солевой аппетит, выброс вазопрессина и симпатическую нервную активность. Благодаря этому, активация центральной PAC может давать свой вклад в патогенез гипертонии. Рецепторы Ang II найдены в областях ствола мозга, включенных в контроль симпатической активности. В частности, связывание Ang II обнаружено в ядре солитарного тракта, а также ростральных и каудальных регионах вентролатеральной медуллы, и микроинъекции ангиотензина в эти отделы повышали симпатическую нервную активность. Эти сайты связывания – ядра, участвующие в сигнальных путях артериального барорефлекса.

Считается, что многообразные физиологические действия Ang II, включающие вазоконстрикцию, выброс альдостерона и клеточный рост, опосредованы рецептором 1-го типа, или AT1. Субтип А рецептора AT1 (AT1A) локализован на поверхности клеток гладкой мускулатуры сосудов, и его активация приводит к повышению уровня внутриклеточного

кальция, генерации активных форм кислорода и сокращению клеток (Mattson, Maudsley, 2009).

Роль же рецептора 2-го типа (AT<sub>2</sub>) долго оставалась неизвестной. Предполагалось, что она во многом противоположна роли рецептора AT<sub>1</sub>. Данные, полученные на мышах, дефицитных по гену рецептора AT<sub>2</sub>, подтвердили участие этого рецептора в симпатическом ингибировании. В то время как AT<sub>1</sub> в центральной нервной системе твердо связывают с процессами симпатического возбуждения, активация AT<sub>2</sub> приводит к противоположному влиянию на симпатический тонус (Gao and Zucker, 2011). Только в последние годы стало понятно, что рецепторы AT<sub>2</sub> экспрессируются не только в сосудистой стенке, но и в таламических отделах, гипоталамусе и специфических ядрах ствола мозга (Horiuchi et al., 2010). Стимуляция AT<sub>2</sub> включена в аксональную регенерацию, процессы памяти и управление поведением. Показан протективный эффект стимуляции AT<sub>2</sub> при ишемических повреждениях мозга, в частности, благодаря модуляции церебрального кровотока. Есть данные, что Ang II индуцирует дифференцировку нейронов и рост нейритов, опосредованные митоген-активируемой протеин киназой или оксидом азота, через активацию рецептора AT<sub>2</sub>, который тем самым включен в процесс развития мозга.

Нами показана повышенная экспрессия рецепторов AT<sub>1A</sub> у молодых крыс НИСАГ в продолговатом мозге, что может приводить к стойкому повышению симпатического тонуса у этих животных, ведущему в конечном счете к росту артериального давления. Известно, что нарушение баланса уровней рецепторов AT<sub>1A</sub> и AT<sub>2</sub> в ростральной вентролатеральной области (RVLM) вызывает у экспериментальных животных гипертензию и симпатическое возбуждение (Gao et al., 2008). Что же касается повышенного уровня мРНК рецептора AT<sub>2</sub> в гипоталамусе, то можно предположить компенсаторный характер этого роста, исходя из литературных данных о том, что агонист рецептора AT<sub>2</sub> эффективно понижал экскрецию норэпинефрина и артериальное давление у крыс через сигнальные пути NO синтазы в паравентрикулярном ядре (PVN) гипоталамуса (Gao and Zucker, 2011). Поскольку AT<sub>2</sub> повышает выброс оксида азота и снижает ток калия в нейронах, активация этого рецептора должна вызывать подавление симпатического тонуса.

Наши данные указывают и на повышенную экспрессию COX-2 как в гипоталамусе, так и в еще большей степени – в продолговатом мозге молодых крыс НИСАГ. COX-2 – это фермент, содержащийся в дендритных отростках и играющий прямую роль в синаптической физиологии. Белок и мРНК COX-2 быстро индуцируются при физиологической синаптической активности, и высокая базальная экспрессия в коре мозга поддерживается обычной синаптической активностью (Kaufmann et al., 1997). Простагландины – производные COX-2 – важные физиологические регуляторы ряда активностей, включая локальный



церебральный кровоток и обучение. Распределение СОХ-2-содержащих нейронов в ЦНС показывает, что СОХ-2 может быть включена в обработку и интеграцию висцеральных и специальных сенсорных потоков, а также выработку автономных, эндокринных и поведенческих ответов (Breder et al., 1995).

Физиологическая роль простагландинов (ПГ) изучается давно и успешно. Это семейство липидных медиаторов, которые образуются широко по всему телу и выполняют многообразные функции во многих процессах, включая сосудистый гомеостаз, воспаление и репродукцию. Они связываются с 8 типами и субтипами рецепторов для выполнения своих функций. Благодаря своей специфической локализации и межклеточным сигнальным путям, каждый рецептор может опосредовать уникальный профиль действий в организме. Функции ПГ в ЦНС исследовались в основном в связи с болезненными состояниями. Так, EP<sub>3</sub> опосредует гипертермические ответы, и EP<sub>1</sub> и EP<sub>3</sub> оба необходимы для нейроэндокринного стрессового ответа. Дефицитные по EP<sub>1</sub> мыши демонстрируют повышенную агрессию и нарушения в избегании препятствий, показывая, что PGE<sub>2</sub>-EP<sub>1</sub> сигнальный путь контролирует импульсивное поведение при стрессах (Kitaoka et al., 2007). Известно, что крысы НИСАГ проявляют повышенную агрессию по отношению к своим собратьям, и можно предположить, что эта особенность их поведения связана с каким-то дефектом рецептора EP<sub>1</sub>. В таком случае повышенная экспрессия СОХ-2 может носить компенсаторный характер.

Повышенная экспрессия СОХ-2 может быть вредна. При патологических условиях, включая травму, ишемию и хронические нейродегенеративные изменения, активность СОХ-2 повышена, продуцируя активные формы кислорода и токсичные метаболиты простагландинов, усиливающие повреждения (Hickey et al., 2007). С другой стороны, существуют и свидетельства протективной роли СОХ-2 при нарушениях мозгового кровообращения, поскольку ингибиторы СОХ увеличивают размер инфаркта при окклюзии мозговой артерии (Park et al., 2008). Недавние исследования нейроваскулярного сопряжения, т.е. регуляции локального церебрального кровотока в ответ на нейрональную активацию в мозге, показали прямое влияние СОХ-2 мозга на кровяное давление (Matsuura et al., 2009). Это исследование выявило, что АД и частота сердечного ритма заметно снижались после ингибирования СОХ-2. Результаты японских ученых подтвердили, что СОХ-2 участвует в регуляции локального церебрального кровотока во время нейрональной активации у крыс. Можно предположить, что повышенная экспрессия СОХ-2 в мозге молодых крыс НИСАГ вносит свой вклад в повышение АД у этих животных.

СОХ-2 в незрелом мозге регулируется в соответствии с развитием. У крыс наблюдается очень слабая экспрессия СОХ-2 сразу после рождения, затем она растет, достигая пика во время 3-4-й недели после рождения, снижаясь затем до промежуточного уровня в мозге у

взрослых животных. Аналогичный паттерн экспрессии найден для NO-синтазы. NOS, подобно COX, – важный модулятор нейрональной функции в физиологических условиях и парадоксально токсичная молекула в патологических условиях. Паттерн экспрессии COX и NOS, с пиком примерно в 1 месяц, происходит параллельно созреванию коры и синаптогенезу, подтверждая, что они – потенциально важные регуляторы нормального нейронального развития. С другой стороны, показано, что NOS и COX-2 действуют синергично, ухудшая ишемическое повреждение мозга. Таким образом, при патологических условиях комбинированный пик экспрессии COX-2 и NOS в созревающем мозге может создавать патологическое окружение, которое способно усиливать повреждение мозга (Hickey et al., 2007). Исходя из повышенной экспрессии COX-2, можно предположить, что рост числа рецепторов AT<sub>2</sub> в мозге крыс НИСАГ связан с необходимостью защиты от вредных метаболитов, накапливающихся в процессе биосинтеза простагландинов (Horiuchi et al., 2010). Возбудительная синаптическая активность и стрессовые стимулы могут индуцировать экспрессию COX-2. Простагландины стимулируют секрецию АКТГ из гипофиза напрямую либо путем выброса в гипоталамусе КРГ и/или вазопрессина. Простагландины опосредуют нейрогормональные ответы на психологический стресс, включая ответ АКТГ, и могут стимулировать стероидогенез напрямую в надпочечниках крысы. Таким образом, они могут взаимодействовать с ГГАС на уровне гипоталамуса, гипофиза или надпочечников. ПГ участвуют в развитии гипертермии и ответе АКТГ, индуцированном у крыс психологическим стрессом (Bugajski et al., 2001). Методом ОТ-ПЦР была показана повышенная активность генов гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы у крыс линии НИСАГ по сравнению с нормотензивными крысами (Markel et al., 2007). Повышенная экспрессия ключевого фермента синтеза простагландинов может являться одним из начальных этапов активирования ГГАС, наблюдаемого у крыс НИСАГ.

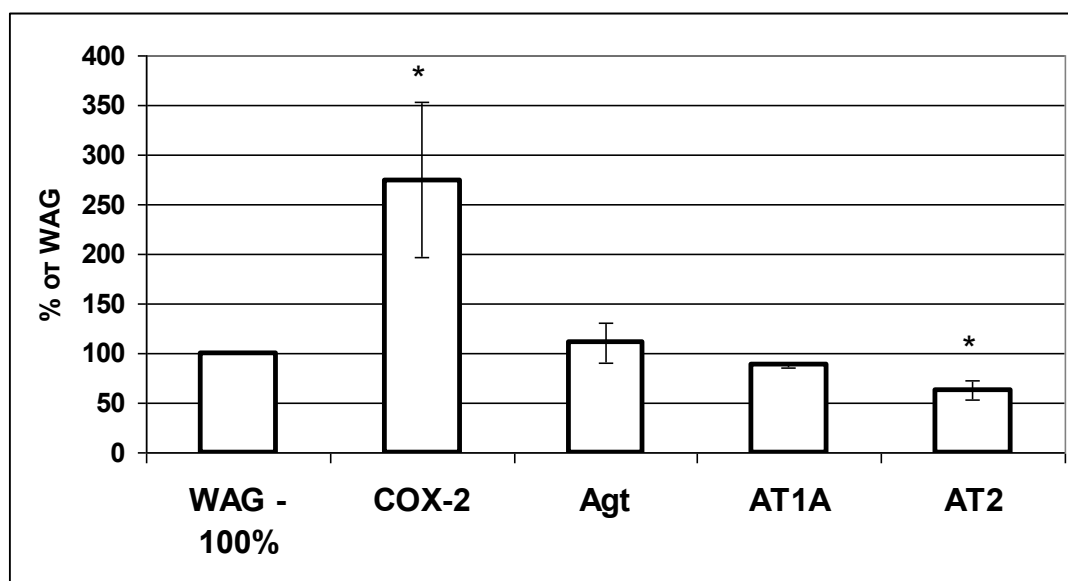
Экспрессия COX-2 и ее связь со стимуляцией ГГАС достаточно подробно описана (Turnbull, Riever, 1999), и работы на эту тему продолжают выходить. Значительно меньше известно о роли COX-2 в других областях мозга и, в частности, в продолговатом мозге, где расположены центры, контролирующие работу сердечно-сосудистой системы, наиболее важным из которых, по-видимому, является рострально-вентролатеральная область (RVLM). Область RVLM является конечным общим путем для множества нисходящих проекций активности симпатической нервной системы в ответ на стресс, кровотечение, артериальную гипотензию (рефлекторная вагусная афферентация), физические нагрузки, боль, гиперкапнию и гипоксию. Известно, что профиль экспрессии COX-2 во время развития совпадает с изменениями в синаптическом ремоделировании созревающей постнатальной ЦНС, зависящим от ее активности (Kaufmann et al., 1996). Эта способность нейронов к долговременным изменениям

в ответ на нейтральную активность – предпосылка для обучения и памяти, как и для адаптивных ответов на патологические стимулы. Измененная экспрессия COX-2, таким образом, может быть следствием изменений в состоянии симпатической нервной системы.

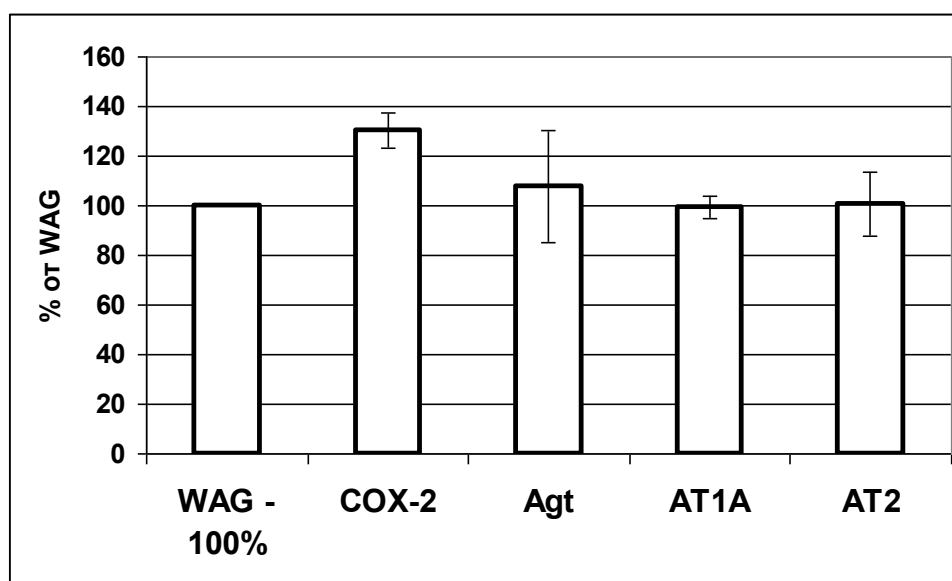
Отметим, что в полученных данных по экспрессии мРНК генов PAC в мозговых структурах крыс разница между исследуемой гипертензивной линией НИСАГ и контрольными нормотензивными животными найдена только у молодых, 1,5-месячных животных. У взрослых животных в покое отличие в экспрессии исследуемых генов отсутствует. Более того, в условиях мягкого стресса, каким является относительно непродолжительное (17 часов) лишение воды, у крыс НИСАГ практически отсутствуют изменения в экспрессии генов PAC (*Ren* и *ACE*), наблюдаемые у нормотензивных WAG (рис. 10 и 11). Из литературных данных известно, что у взрослых крыс наиболее изученной гипертензивной линии SHR высокий уровень мРНК генов *Agt* и рецептора AT1A в мозговых структурах сохраняется или даже может еще больше отличаться от контрольной линии, чем в молодом возрасте. Необходимо понимать, что повышенный уровень экспрессии рецептора AT1A вообще характерен для крыс SHR во многих тканях (в частности, в миокарде), тогда как у взрослых крыс НИСАГ в миокарде и почках он, напротив, понижен (Fedoseeva et al., 2011). На основе полученных результатов можно полагать о существовании различий в возрастной динамике экспрессии мРНК генов PAC между крысами SHR и НИСАГ, а также о снижении с возрастом активности PAC, несмотря на формирование гипертензивного статуса, не только в почках, как это было показано ранее, но и в таких структурах мозга, как гипоталамус и продолговатый мозг. Отличия в экспрессии *Agt* и рецептора AT1A между взрослыми животными гипертензивных линий SHR и НИСАГ дают возможность говорить о том, что у крыс НИСАГ в процессе взросления роли систем контроля артериального давления могут меняться, и за поддержание гипертензивного статуса у взрослых животных SHR и НИСАГ отвечают разные системы. У взрослых крыс НИСАГ центральную роль в поддержании гипертензивного статуса играет повышение активности симпатoadренальной и адренокортикальной гормональных систем, непосредственно отвечающих также за повышение стресс-реактивности крыс НИСАГ (Markel et al., 2007). Мы полагаем, что одним из инициальных механизмов формирования такого гормонального фона у взрослых крыс НИСАГ может являться повышение уровня активности генов PAC в структурах мозга в раннем возрасте у этих животных.

В надпочечниках крыс мРНК не все компоненты PAC присутствуют на уровне, достаточном для изучения их экспрессии методом ПЦР. Поэтому в данном органе у крыс WAG и НИСАГ мы сравнивали экспрессию генов *Agt* и рецепторов ангиотензина AT1A и AT2, а также гена COX-2. На рис. 12 видно, что уровни мРНК генов *Agt* и AT1A в надпочечниках молодых крыс обеих линий достоверно не отличались. Однако содержание мРНК гена рецептора AT2 у

молодых крыс НИСАГ было снижено на треть, а *COX-2* – повышено почти втрое по сравнению с нормотензивным контролем.

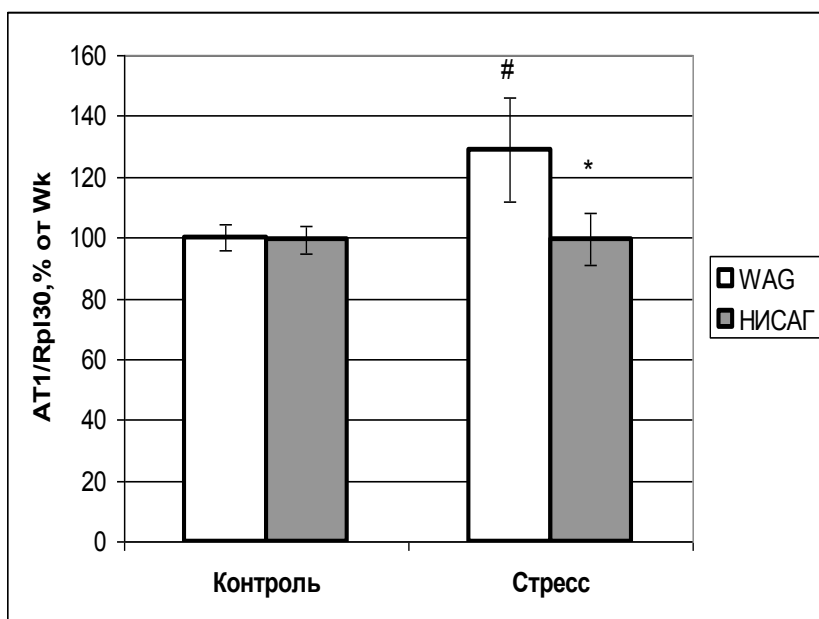


**Рис. 12.** Уровень мРНК генов РАС и *COX-2* в надпочечниках молодых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. \* –  $p < 0.05$ .

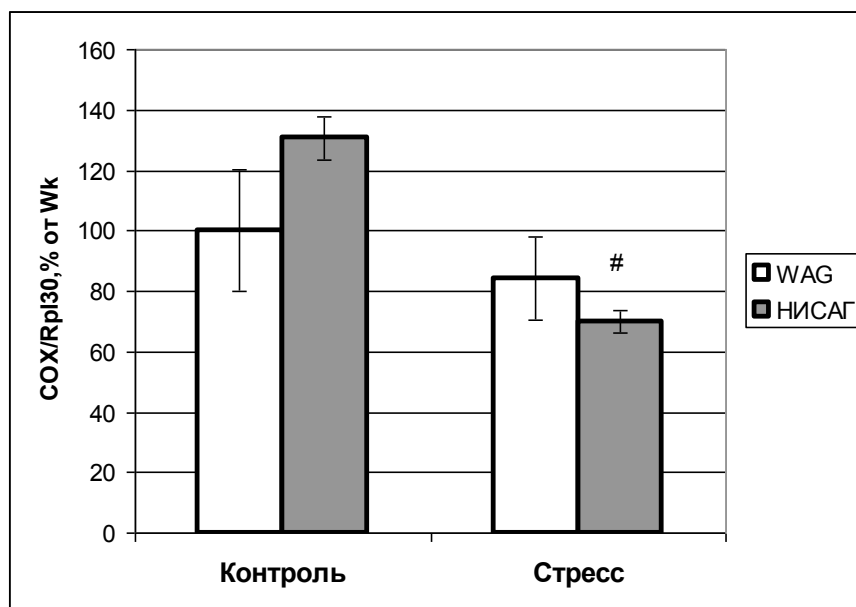


**Рис. 13.** Уровень мРНК генов РАС и *COX-2* в надпочечниках взрослых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем WAG. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM.

В процессе созревания животных картина несколько меняется, и ни по одному из исследуемых в надпочечников генов РАС мы не наблюдали различий между крысами двух линий в возрасте 4 мес в состоянии покоя. Разница в экспрессии гена *COX-2* тоже не достигала достоверного уровня (рис. 13).



**Рис. 14.** Экспрессия гена рецептора AT1A в надпочечниках зрелых (4 мес) крыс НИСАГ (серые столбики) по сравнению с крысами WAG (белые столбики) в покое и при стрессе обезвоживания. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. \* – достоверные межлинейные различия,  $p < 0.05$ ; # – различия между контролем и стрессом внутри линии,  $p < 0.05$ .



**Рис. 15.** Экспрессия гена *COX-2* в надпочечниках зрелых (4 мес) крыс НИСАГ (серые столбики) по сравнению с крысами WAG (белые столбики) в покое и при стрессе обезвоживания. Данные представлены в виде средних значений по группе  $\pm$  SEM. # – достоверные различия между контролем и стрессом внутри линии,  $p < 0.05$ .

Однако при стрессе обезвоживания возрастало содержание мРНК рецепторов AT1A у крыс контрольной линии WAG, в то время как у крыс НИСАГ оно оставалось практически неизменным (рис. 14). Уровень же экспрессии гена *COX-2* при стрессе водной депривации

снижался у крыс НИСАГ, но не у контрольных животных линии WAG (рис. 15). При этом стресс обезвоживания не влиял на уровни мРНК генов *Agt* и рецептора AT2.

В надпочечниках молодых крыс НИСАГ, как и в мозговых структурах, мы наблюдаем дисбаланс рецепторов Ang II: пониженную экспрессию AT2 при практически неизменной для AT1A. Из литературных данных известно, что выключения экспрессии рецептора AT2 при помощи введения нормотензивным крысам антисенс-последовательности к этому рецептору оказалось достаточно для стойкого эффекта повышения систолического АД и прессорного ответа на Ang II (Wang et al., 2004). Экспрессия AT2 может подавляться глюкокортикоидами (Matsubara, 1998). Есть данные и о снижении плотности рецептора AT2 в надпочечниках при повышенной концентрации альдостерона (Wang et al., 1998). У взрослых (5-6 мес) крыс НИСАГ отмечается повышение глюкокортикоидной функции коры надпочечников и тенденция к росту секреции альдостерона (Антонов и др., 2010), что могло бы являться причиной наблюдаемого снижения экспрессии рецептора AT2, однако мы пока не располагаем сведениями о повышенной секреции кортикостерона или альдостерона у крыс НИСАГ в более раннем возрасте.

Нельзя не признать, что мы пока очень далеки от полного понимания роли рецептора AT2. Вероятно, главная причина этого в том, что привычно иметь дело с «активными» рецепторами, которые проявляют себя прямым действием, но не с ингибирующими или модулирующими рецепторами, каким во многих случаях выглядит AT2. Однако модуляция – это важное свойство для тонкой настройки широкого спектра действий, которые в случае AT2 охватывают натрийурез, регуляцию температуры тела, артериальное давление, репродукцию, эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку, восстановление поврежденной ткани и программируемую клеточную смерть (Steckelings et al., 2005). Для выяснения роли этого рецептора в развитии гипертонии у крыс линии НИСАГ необходимо исследовать его экспрессию не только в мозге и надпочечниках, но также в почках и сердце этих крыс.

Роль COX-2 в надпочечниках представлена в научной литературе в основном в связи с активацией ГГАС в ответ на воспаление (при ведении экспериментальным животным бактериального эндотоксина липополисахарида). Было показано, что простагландины играют ключевую роль в опосредовании НРА ответа на иммунные запросы. Эндотоксин вызывает заметный рост уровня мРНК COX-2 в надпочечнике. Он также индуцирует умеренный рост уровня мРНК COX-2 в гипоталамусе. *In vitro* селективные и неселективные ингибиторы COX-2 вызывают заметное снижение стимулированного АКТГ выброса кортикостерона, что подтверждает роль COX-2 в манифестации ответа ГГАС на активацию иммунной системы (Cover et al. 2001). Эндотоксин ЛПС вызывает дозозависимую стимуляцию базальной секреции кортизола в клеточной линии адренокортикальных клеток человека, не влияя на

альдостерон. Показано также, что ЛПС стимулирует выброс простагландина  $E_2$  этими клетками. Эффект ЛПС на кортизол снижался в присутствии специфического ингибитора COX-2, доказывая роль активации COX-2 и синтеза простагландина в ответе надпочечника на ЛПС (Vakharia, Hinson, 2005).

Был исследован и механизм выброса кортикостерона в ответ на АКТГ (Mohn et al., 2005): оксид азота, продуцированный активированной АКТГ NO-синтазой, активирует COX-2, которая генерирует простагландин  $E_2$ , который, в свою очередь, способствует выбросу кортикостерона, запасенного в микровезикулах и других органеллах. Однако  $E_2$  – не единственный простагландин, синтезируемый в надпочечниках. Как кортикальная, так и медуллярная зоны НП продуцируют простагландин  $F_{2\alpha}$  (Lambert-Langlais et al., 2009). Адренкортикальные клетки крысы продуцировали простагландин  $PGF_{2\alpha}$  в базальных условиях и показывали 2,5-кратную индукцию выброса  $PGF_{2\alpha}$  при стимуляции АКТГ, причем эта секреция коррелировала с АКТГ-зависимой экспрессией COX-2. Рецептор FP обнаружили только в хромоаффинных клетках, где он экспрессируется конститутивно (причем эта продукция нечувствительна к глюкокортикоидам), и это делает медуллу главной мишенью для действия простагландина  $F_{2\alpha}$ . Рецептор FP отсутствовал в стероидогенных адренкортикальных клетках. Поэтому вероятно, что  $PGF_{2\alpha}$ , секретлируемый этими клетками, может действовать как паракринный фактор. Простагландин  $F_{2\alpha}$  подавляет секрецию глюкокортикоидов непрямым механизмом, включающим снижение выброса катехоламинов, которое в свою очередь понижает стероидогенез в надпочечнике. Негативный эффект  $PGF_{2\alpha}$  ограничен глюкокортикоидами, поскольку не наблюдали какого-либо эффекта на продукцию альдостерона. Простагландин  $F_{2\alpha}$  можно считать негативным аутокринным/паракринным регулятором в интра-адренальной петле обратной связи, контролирующей выброс кортикостерона. Кортико-медуллярные взаимодействия, опосредованные  $PGF_{2\alpha}$ , могут быть включены как в паракринную обратную связь, лимитирующую ответ на стресс, так и в локальный контроль базального стероидогенеза.

Показано, что простагландин  $E_2$  обеспечивает быстрый выброс глюкокортикоидов из НП при стимуляции АКТГ (Mohn et al., 2005). Таким образом,  $PGF_{2\alpha}/PGE_2$  проявляют противоположное действие с кортикостатическим/кортикотрофным эффектами в тонкой регуляции эндокринных функций надпочечника. Глюкокортикоиды – это мощные противовоспалительные стероиды. Подавляя продукцию глюкокортикоидов,  $PGF_{2\alpha}$  в НП ограничивает противовоспалительные сигналы, в то время как  $PGE_2$ , классический провоспалительный медиатор, повышает противовоспалительные сигналы, способствуя их секреции. Таким образом, совместное действие  $PGF_{2\alpha}/PGE_2$  может обеспечить тонко

действующий механизм для двойственного действия простагландинов в воспалительном процессе (Lambert-Langlais et al., 2009).

Экспрессия COX-2 в надпочечнике опосредована рецептором ангиотензина AT1, поскольку показано, что блокада этого рецептора кандесартаном способна снижать не только индуцированные ЛПС синтез и секрецию альдостерона, но и экспрессию гена COX-2 (Sanchez-Lemus et al.2008). При этом кандесартан не влиял на выброс АКТГ и кортикостерона. Мы наблюдали повышенную почти втрое экспрессию мРНК COX-2 в надпочечниках молодых крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем. Вероятно, это отражает повышенную активность гипоталамо-гипофизарно-адренальной системы, характерную для крыс этой линии. Кроме того, высокий уровень экспрессии COX-2 может стимулироваться высоким уровнем Ang II и связанным с ним воспалением сосудистых стенок, которое сопровождается гипертонией (Cheng et al.2005). Этот процесс воспаления может усиливаться и наблюдаемым дисбалансом в уровне экспрессии рецепторов ангиотензина, то есть снижением экспрессии рецептора AT2.

У взрослых крыс НИСАГ сохраняется тенденция к повышению экспрессии COX-2 в надпочечнике, хотя разница между линиями животных уже не достигает статистически достоверного уровня. Однако при стрессе водной депривации экспрессия COX-2 у крыс НИСАГ достоверно снижается при неизменном, в отличие от крыс WAG, уровне экспрессии рецептора AT1A. Можно предположить, что у крыс WAG рост экспрессии рецептора AT1A направлен на увеличение секреции альдостерона. У гипертензивных крыс НИСАГ этот механизм оказывается подавлен.

#### **4. Исследование конформационных характеристик мРНК эукариот связанных с эффективностью трансляции в норме и при стрессе**

Одна из целей настоящего проекта заключается в исследовании характеристик мРНК, коррелирующих с трансляционной активностью в условиях стресса. В настоящее время неизвестно, какими сигналами определяется стресс-специфическая трансляция эукариотических матриц. Знание этих сигналов может в значительной степени увеличить точность предсказания паттерна экспрессии генов на основе анализа их нуклеотидных последовательностей, что является одной из актуальных задач современной молекулярной биологии.

Для решения поставленной задачи нами были определены выборки мРНК генов мыши, характеризующиеся различной трансляционной активностью во время стресса. Эта работа была выполнена совместно с лабораторией Dr. Ivan Ventoso (Departamento de Biología Molecular,



Universidad Autónoma de Madrid and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Spain). Эта группа специализируется в исследовании стресс-специфического трансляционного контроля на различных моделях и обладает необходимыми экспериментальными возможностями и навыками. Эксперименты были проведены на базе Автономного университета Мадрида на клеточной линии NIH3T3 – фибробластах мыши. Эксперименты были проведены следующим образом: (1) клетки культивировали *in vitro* в нормальных условиях, с помощью дифференциального ультрацентрифугирования выделяли полисомные фракции (транслируемых) мРНК, очищали фракции от рибосом и гибридизовали с микрочипами (были использованы Agilent 44K chips). Это позволило идентифицировать мРНК 8459 генов мыши. Далее была проведена классификация мРНК по эффективности трансляции в нормальных условиях: были выделены группы из полисом высокой и низкой плотности. Эти группы (максимально и минимально транслируемые в норме и обозначенные Max и Min, соответственно) были использованы в дальнейшем компьютерном анализе; (2) на втором этапе культуры клеток были обработаны стрессирующим агентом (thapsigargin), вызывающим быстрое фосфорилирование фактора инициации трансляции eIF2 $\alpha$ . Согласно сделанным оценкам (с помощью оценки включения [<sup>35</sup>S]-Met), около 90% суммарного синтеза белка было ингибировано в течение первого часа после обработки стрессором. Через 3-4 часа синтез белков начал восстанавливаться вследствие постепенного дефосфорилирования eIF2 $\alpha$ . Однако, несмотря на общую тенденцию – глобальное ингибирование трансляционной активности мРНК – были выделены две группы матриц с нестандартными параметрами трансляции: мРНК, трансляция которых не снижалась после обработки стрессором (Stress-Resistent) или (неожиданно) активировалась во время стресса (Stress-Induced). Эти данные были подтверждены выборочным анализом представленности некоторых белков (бета-актина, бета-2 тубулина, компонентов протеасомы, шаперонов (BiP), лактат- и малатдегидрогеназ) с помощью двумерного электрофореза и масс-спектроскопических данных. Stress-Resistent мРНК (в терминах Gene Ontology) были обогащены аминоксил-тРНК лигазами, транскрипционными факторами, факторами репликации и репарации ДНК, антиапоптозными белками. Stress-Induced мРНК были представлены таким известным транскрипционным фактором, как ATF4, а также рядом важных транскрипционных регуляторов (EGR1, EGR2, NFAT5, ATF-5, JUN, FOS, CREB1, OCT-2, SP1). Анализ представленности разных функциональных классов в терминах Gene Ontology показал, что в этой группе часто присутствуют мРНК факторов контроля клеточного деления и стрессового ответа. Количество мРНК с различными трансляционными характеристиками приведено в таблице 3.

**Таблица 3.** Размер выборок мРНК генов человека и мыши, различающихся по трансляционной активности

Выборка	<i>Mus musculus</i>
Всего	8159
Stress-Induced	599
Stress-Resistant	276
Max	317
Min	383

Нужно отметить, что значительное количество Stress-Induced мРНК (~20%) одновременно относились к группе низкотранслируемых (Min) (табл. 4).

**Таблица 4.** Пересечение выборок Stress-Induced / Stress-Resistant *versus* Max / Min

Mouse Sample	Max	Min
Stress-Induced	0	125
Stress-Resistant	2	0

Сравнительный компьютерный анализ контекстных характеристик мРНК, различающихся по трансляционной активности, дал следующие результаты:

1. Интенсивно транслируемые мРНК (выборка Max) в сравнении с контрастной выборкой (Min) характеризуются меньшим размером белок-кодирующих частей, 5'-НТП и 3'-НТП. Характерно, что выборки достоверно различались по числу лидерных кодонов AUG: в выборке Max они встречались значительно реже, чем в выборке Min. Также, Min мРНК характеризовались меньшим содержанием G + C в лидерном районе. Интересно, что контекст стартового кодона трансляции у групп Max и Min не различался (таблица 5).
2. Сравнение Stress-Inducible мРНК с основным транскриптомом (трансляция которого ингибируется при стрессе) показало, что эти мРНК кодируют белки значительно большего размера. Другая достоверно значимая характеристика – значительно более частое присутствие лидерных кодонов AUG. Например, 36% этих мРНК характеризуются присутствием как минимум 2 uAUG (табл. 6). В целом, вероятность встретить два или более uAUG в мРНК из группы Stress-Inducible оказалась в 5-10 раз выше, чем в мРНК группы Max и сопоставимо с низкотранслируемыми мРНК из группы Min. По-видимому, Stress-Inducible мРНК представляют собой специфический подкласс низкотранслируемых матриц, трансляция которых активируется в условиях ингибирования общей трансляционной активности (таблица 5). Также к специфическим характеристикам Stress-Inducible мРНК относятся более низкое содержание нуклеотидов G+C в 5'-НТП и в белок-кодирующей части мРНК (таблица 5).

**Таблица 5.** Средние значения трансляционно-значимых характеристик различных выборок мРНК *Mus musculus* (достоверность отличий оценена с помощью *U*-теста Манна-Уитни).

	Stress-Induced	Остальная выборка	Достоверность различий	Stress-Resistant	Остальная выборка	Достоверность различий
Частота RnnAUG	0.84	0.87	0.024541	0.891	0.867	0.244597
длина 5'UTR	<b>265</b>	<b>192</b>	0.000000	<b>229</b>	<b>196</b>	0.003609
G+C 5'UTR	<b>61</b>	<b>65</b>	0.000000	<b>61.2</b>	<b>65.2</b>	0.000000
Частота uAUGs	<b>1.72</b>	<b>0.99</b>	0.000000	0.891	1.048	0.203053
длина 3'UTR	<b>1900</b>	<b>1119</b>	0.000000	1240	1175	0.335178
G+C 3'UTR	<b>39.3</b>	<b>44.2</b>	0.000000	44.0	43.8	0.654788
длина CDS	<b>3049</b>	<b>1497</b>	0.000000	1764	1606	0.056018
G+C CDS	<b>49.0</b>	<b>53.1</b>	0.000000	53.1	52.8	0.339513
	<b>Max</b>	<b>Остальная выборка</b>	<b>Достоверность различий</b>	<b>Min</b>	<b>Остальная выборка</b>	<b>Достоверность различий</b>
Частота RnnAUG	0.912	0.866	0.019119	0.856	0.869	0.492089
длина 5'UTR	<b>142</b>	<b>199</b>	0.000000	208	197	0.251581
G+C 5'UTR	64.2	65.1	0.122053	<b>62.6</b>	<b>65.2</b>	0.000001
Частота uAUGs	<b>0.45</b>	<b>1.07</b>	0.000000	<b>1.52</b>	<b>1.02</b>	0.000002
длина 3'UTR	<b>499</b>	<b>1204</b>	0.000000	1011	1185	0.002762
G+C 3'UTR	43.9	43.8	0.828280	<b>40.0</b>	44.0	0.000000
длина CDS	<b>863</b>	<b>1642</b>	0.000000	<b>1299</b>	<b>1627</b>	0.000004
G+C CDS	53.6	52.7	0.019433	<b>51.1</b>	<b>52.9</b>	0.000000

**Таблица 6.** Распределение частот мРНК различных трансляционных классов, содержащих разное число лидерных кодонов AUG.

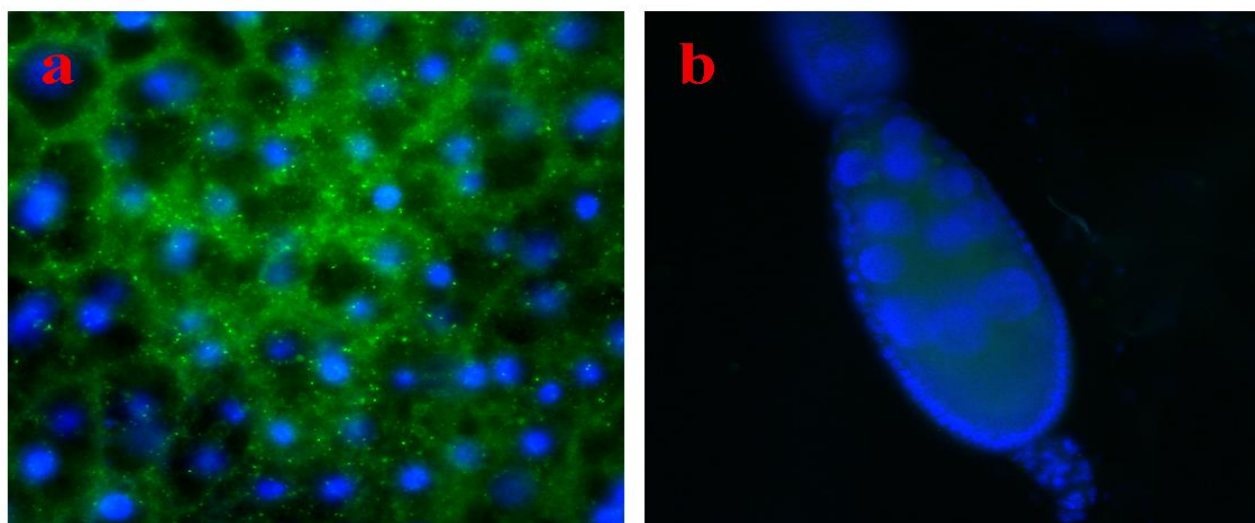
Число uAUGs	Вся выборка	Stress-Induced	Stress-Resistant	Max	Min
0	56.72	41.07	61.96	80.44	48.83
1	20.91	22.54	18.48	12.30	21.67
2	9.07	12.35	7.25	3.15	10.70
3	5.42	8.68	5.43	2.21	6.79
4	3.11	5.18	3.26	0.00	3.39
5	1.56	3.34	2.17	0.63	3.13
6	0.86	2.00	0.72	0.32	1.57
7	0.83	1.84	0.00	0.00	1.04
8	0.47	1.00	0.36	0.00	0.78
9	0.16	0.17	0.00	0.32	0.26
>10	0.89	1.84	0.36	0.63	1.83

На основе полученных данных нами была сформулирована гипотеза, описывающая один из возможных механизмов стресс-специфического контроля трансляционной активности мРНК млекопитающих. По-видимому, контекстные особенности 5'-НТП таких мРНК сходны с известными случаями сенсоров, основанных на механизме реинициации трансляции (ATF4, ATF5, GCN4). В лидерном районе содержатся несколько небольших рамок считывания и в

нормальных (нестрессовых) условиях основная часть рибосом инициирует трансляцию на них с помощью механизма реинициации. Поскольку uORF невелики, эти мРНК в норме несут одну – две рибосомы и относятся к слаботранслируемым. В условиях стресса после фосфорилирования eIF2 $\alpha$  восстановление трансляционной компетентности рибосом замедляется и они начинают инициировать трансляцию основной рамки считывания, что видно в наших экспериментах как стресс-специфическая активация трансляции.

## 5. Иммуногистохимическая оценка содержания и локализации Д2-подобных рецепторов в ткани, синтезирующей ферменты, деградирующие ювенильный гормон

Для того, чтобы исследовать экспрессию DD2R в жировом теле и яичниках, эти органы иссекали из мух, фиксировали в 4% параформальдегиде и готовили препараты, используя первичные кроличьи поликлональные антитела против DD2R, любезно предоставленные доктором Изабель Дрейпер (Исследовательский Институт Молекулярной Кардиологии, Бостон, Массачусетс). На рис. 16 показаны результаты иммуногистохимического анализа наличия Д2-подобных рецепторов в жировом теле (а) и яичниках (b) самок *D. melanogaster*.



**Рис. 16.** DD2R иммунореактивность (зеленый сигнал) (а) в жировом теле и (b) в яичниках самок дикого типа (линия Canton S) *D. melanogaster*.

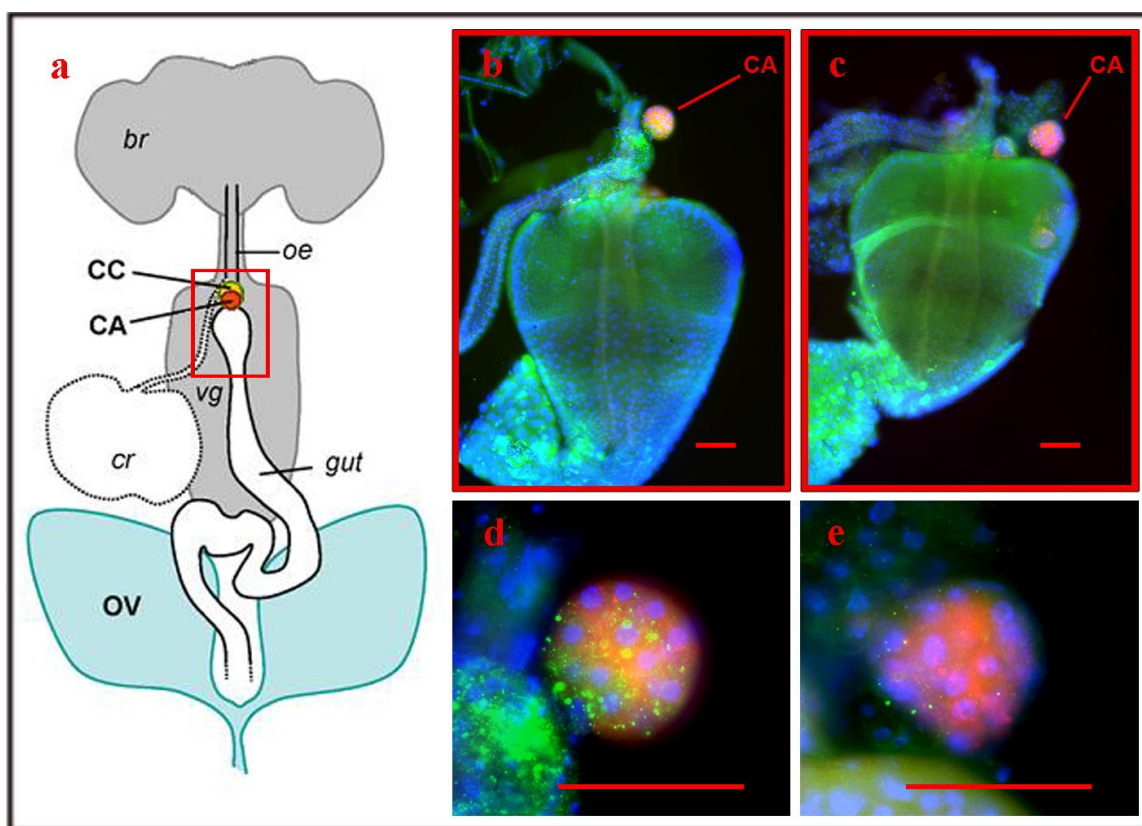
Видно, что в жировом теле практически все клетки являются DD2R иммунореактивными. Вместе с тем, мы не обнаружили таких клеток в яичниках (месте синтеза 20Э), что согласуется со сделанным нами ранее заключением (Gruntenko, Rauschenbach, 2008) о том, что влияние ДА на 20Э опосредуется ювенильным гормоном.

В связи с отсутствием Д2-подобных рецепторов в органе, синтезирующем 20Э, мы отказались от запланированного первоначально на этап 3 исследования влияния ксенобиотической активации Д2-подобных рецепторов на уровень 20Э в нормальных и стрессирующих условиях. Вместо этого мы исследовали экспрессию DD2R в железе, синтезирующей ЮГ (CA), и влияние изменения числа DD2R на уровень продукции гормона.

## 6. Изучение влияния ксенобиотической активации Д2-подобных рецепторов на уровень 20-гидроксиэкдизона у самок дрозофилы в нормальных и стрессирующих условиях

*Иммуногистохимическая оценка локализации и числа Д2-подобных рецепторов (DD2R) в corpus allatum в норме и при РНК-интерферентном подавлении экспрессии этих рецепторов*

У имаго *Drosophila* CA в комплексе с *corpus cardiacum* (CC, железой, синтезирующей адипокинетический гормон) локализована над соединением между зобом (crop) и кишечником (gut) (схема на Рис. 17а). На рисунках 17b и d видно, что DD2R экспрессируется в CA: DD2R иммунореактивность (зеленый сигнал) хорошо видна в клетках CA (меченых RFP, красный сигнал) самок *Aug21>;w1118;UAS-RFP*. В то же время, в CA самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R;UAS-RFP*, у которых в этой железе экспрессируется антисмысловый супрессор гена *DD2R*, DD2R иммунореактивность резко снижена (Рис. 17c, d).



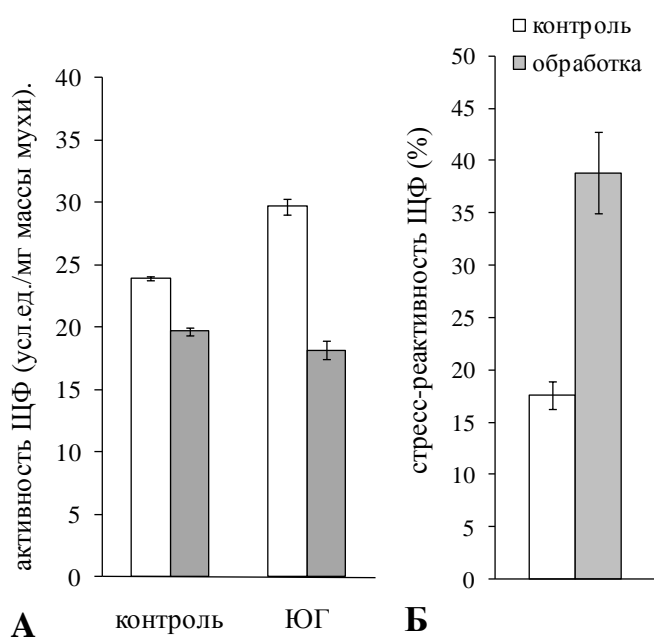
**Рис. 17.** (a) Схема локализации CA у имаго дрозофилы. (b, d) CA самок *Aug21>;w1118;UAS-RFP*. (c, e) CA самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R;UAS-RFP*. Обозначения: CA - corpus allatum; CC - corpus cardiacum; OV - яичники; br - мозг; vg – вентральные ганглии; oe - пищевод; cr (crop)- зоб, gut - кишечник. Шкала = 50 μm.

*Влияние снижения экспрессии DD2R на уровень продукции ювенильного гормона*  
*- Поиск критериев оценки уровня синтеза ЮГ.*

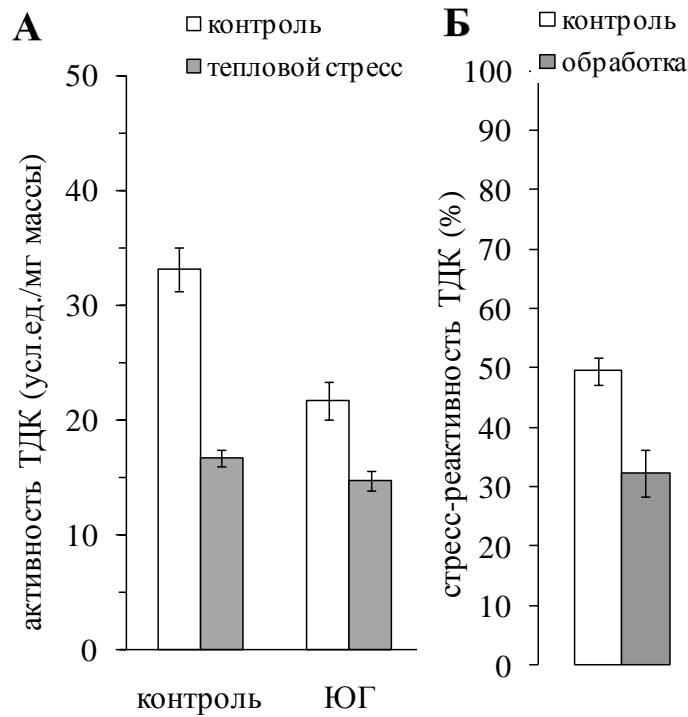
Ранее мы показали, что мутация, снижающая синтез ЮГ у *Drosophila* влияет на активность щелочной фосфатазы (ЩФ, фермента, регулирующего пул предшественника дофамина и октопамина) и тирозиндекарбоксилазы (ТДК, фермента, лимитирующего скорость синтеза октопамина), а также изменяет интенсивность ответа этих ферментов на тепловой стресс – стресс-реактивность (Gruntenko et al., 2003).

Для того, чтобы выяснить, возможно ли использовать эти параметры для оценки уровня синтеза ЮГ при его повышении, мы обработали самок дикого типа *D. melanogaster* ювенильным гормоном и измерили у них активность и стресс-реактивность ЩФ и ТДК. На рис. 18 представлены результаты измерения: (А) активности ЩФ у контрольных самок и обработанных ювенильным гормоном в нормальных условиях (белые столбики на рис. 18А) и при тепловом (38°C, 1 час) стрессе (серые столбики на рис. 18А); (Б) стресс-реактивности, рассчитанной как процент снижения активности фермента при стрессе по отношению к контролю. Хорошо видно, что повышение уровня ЮГ вызывает достоверное ( $p < 0.001$ ) возрастание активности и стресс-реактивности ЩФ у самок дрозофилы.

На рис. 19 представлены результаты измерения: (А) активности ТДК у контрольных самок и обработанных ювенильным гормоном в нормальных условиях и при тепловом (38°C, 1 час) стрессе и (Б) стресс-реактивности ТДК. Хорошо видно, что повышение уровня ЮГ вызывает достоверное ( $p < 0.001$ ) снижение обоих параметров.



**Рис. 18.** Влияние повышения уровня ЮГ на активность (А) и стресс-реактивность (Б) щелочной фосфатазы у самок *Drosophila*.

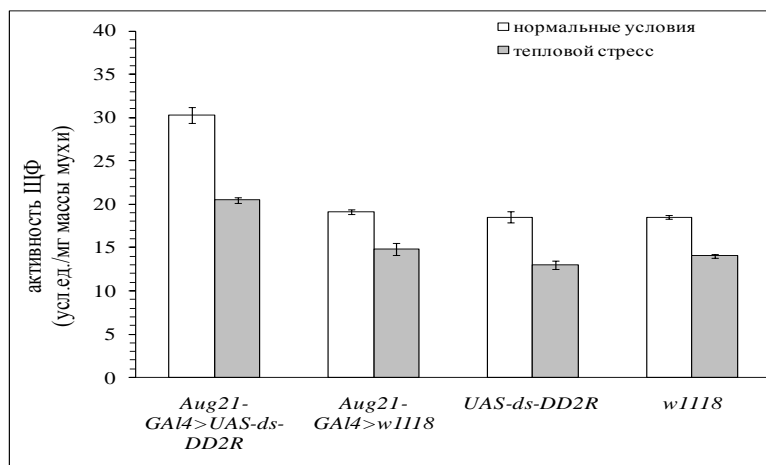


**Рис. 19.** Влияние повышения уровня ЮГ на активность (А) и стресс-реактивность (Б) тирозиндекарбоксилазы у самок *Drosophila*.

Таким образом, активность и стресс-реактивность ЩФ и ТДК могут служить индикаторами для оценки уровня синтеза ЮГ у дрозофилы.

*Оценка уровня синтеза ЮГ у самок D. melanogaster со сниженной экспрессией DD2R в corpus allatum*

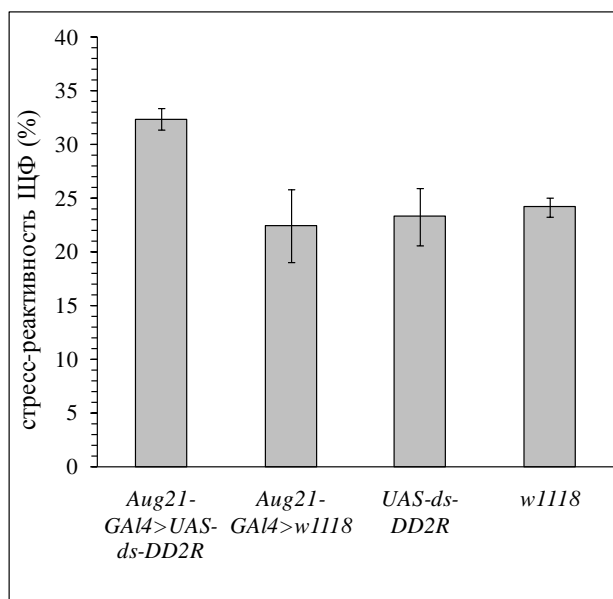
На рис. 20 и 21 представлены результаты измерения активности и стресс-реактивности ЩФ у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R* со сниженной экспрессией DD2R в СА (см. рис.17), контрольных особей *Aug21>;w1118* и самок родительских линий *UAS-ds-DD2R* и *w1118*.



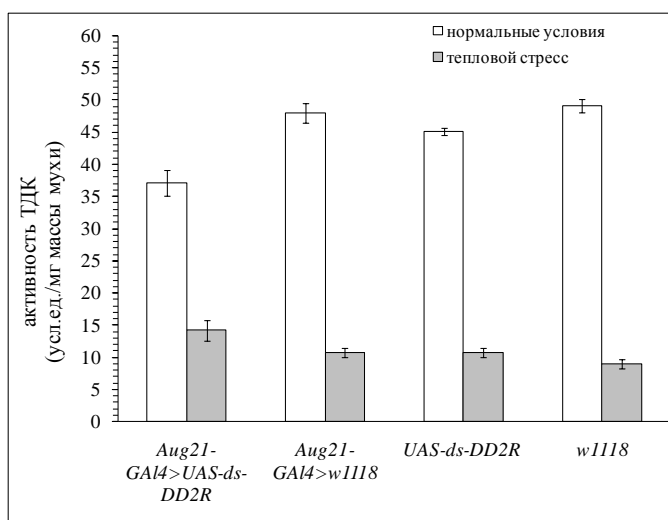
**Рис. 20.** Влияние снижения экспрессии DD2R в СА (*Aug21>;UAS-ds-DD2R*) на активность ЩФ у самок *Drosophila*

Хорошо видно, что у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R* активность и стресс-реактивность ЩФ достоверно ( $p < 0.001$ ) повышены по сравнению с самками всех контрольных групп. Контрольные группы по этим параметрам не различаются.

На рис. 22 и 23 приведены результаты измерения активности и стресс-реактивности ТДК у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R*, контрольных особей *Aug21>;w1118* и самок родительских линий *UAS-ds-DD2R* и *w1118*. Хорошо видно, что у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R* со сниженной экспрессией DD2R в СА активность и стресс-реактивность ТДК достоверно ( $p < 0.001$ ) снижены по сравнению с самками всех контрольных групп. Контрольные группы по этим параметрам не различаются.

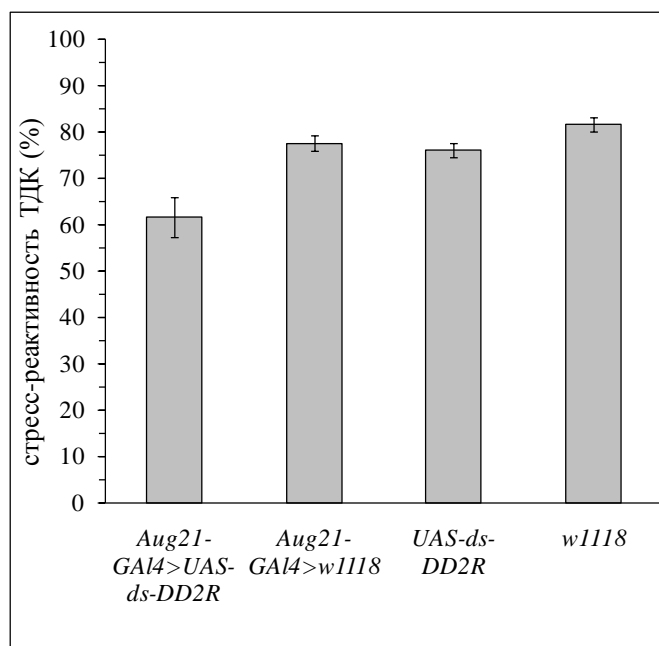


**Рис. 21.** Влияние снижения экспрессии DD2R в СА (*Aug21>;UAS-ds-DD2R*) на стресс-реактивность ЩФ у самок *Drosophila*



**Рис. 22.** Влияние снижения экспрессии DD2R в СА (*Aug21>;UAS-ds-DD2R*) на активность ТДК у самок *Drosophila*





**Рис. 23.** Влияние снижения экспрессии DD2R в СА (Aug21>;UAS-ds-DD2R) на стресс-реактивность ТДК у самок *Drosophila*

Таким образом, результаты измерения четырех индикаторов уровня синтеза ЮГ у *D. melanogaster* свидетельствуют о его повышении у самок со сниженным числом DD2R в железе, синтезирующей ЮГ. Таким образом, мы подтвердили нашу гипотезу о том, что ингибирующее влияние ДА на синтез и деградацию ЮГ у насекомых опосредуется Д2-подобными рецепторами и показали, что эти рецепторы играют существенную роль в развитии стресс-реакции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ, проведенных на 3-ом этапе реализации проекта:

1. Для проведения экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных ДНК на системе SOLiD (ChIP-Seq) проведена иммунопреципитация хроматина ткани печени самцов крыс двухмесячного возраста с обработкой канцерогенами и без, а так же новорожденных с использованием антител против транскрипционных факторов FoxO3A, FoxA2, HNF4, а так же контрольных – IgG, гистон H3. Из данного материала получены специфические библиотеки для системы SOLiD. Качество полученного материала проверено тестовым лигированием – «WFA» на системе SOLiD.
2. Для 12 библиотек системы SOLiD наработаны и проверены WFA бидсы для секвенирования. 5 библиотек по результатам WFA исключены из дальнейшей работы как имеющие недостаточное качество. 4 из 12 годных библиотек уже секвенированы с использованием 2/4

слайда SOLiD на каждую. Полученные данные переданы для биоинформатической обработки. Секвенирование оставшихся будет завершено в ближайшее время.

3. В тканях почки, надпочечников, гипоталамуса и продолговатого мозга у молодых (1,5 мес) и взрослых (4-7 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ и нормотензивной линии WAG изучали экспрессию генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), кодирующих ангиотензиноген (Agt), ренин (Ren), ангиотензин-превращающий фермент (АСЕ), рецепторы ангиотензина II первого и второго типа (АТ1А и АТ2) и рецептор ренина/проренина (PRR). Показали, что в почке молодых крыс НИСАГ, как и у взрослых животных этой линии, понижена экспрессия генов АСЕ и рецептора АТ1А. Однако содержание мРНК ренина было повышено почти вдвое по сравнению с нормотензивным контролем. У взрослых крыс НИСАГ и WAG 17-часовая водная депривация не изменяет экспрессии основных генов РАС. При этом экспрессия COX-2, ключевого фермента синтеза простагландинов, у крыс НИСАГ растет в 3,5 раза, а у крыс WAG только на 80 %. В гипоталамусе у молодых крыс НИСАГ повышено содержание мРНК гена *Agt* и рецептора АТ2, а также гена *COX-2* относительно контрольной линии WAG. В продолговатом мозге молодых крыс НИСАГ повышен уровень мРНК генов *Agt*, рецепторов АТ1А и АТ2 и *COX-2* по сравнению с WAG. У взрослых животных различия с контрольной линией в экспрессии исследуемых генов в мозге не обнаружено. Стресс обезвоживания у взрослых крыс WAG снижает экспрессию ренина и повышает экспрессию АСЕ в гипоталамусе, в то время как у крыс НИСАГ эти показатели не изменяются. В надпочечниках молодых крыс НИСАГ экспрессия *COX-2* повышена в 2,8 раза, а уровень мРНК рецептора АТ2 снижен на треть. У взрослых животных не найдено отличий между линиями крыс в уровнях мРНК генов РАС в надпочечнике. Повышение содержания мРНК *COX-2* также не достигает достоверного уровня, а при стрессе обезвоживания снижается вдвое, в то время как у крыс WAG практически не меняется. При этом стрессе у крыс WAG, но не НИСАГ, растет уровень мРНК рецептора АТ1А. Сделано заключение о том, что на формирование гипертензивного статуса крыс НИСАГ может влиять состояние РАС в первые недели их жизни, у взрослых животных за поддержание высокого уровня артериального давления отвечают другие системы.

4. Проведен компьютерный анализ мРНК *Mus musculus*, характеризующихся различной эффективностью трансляции в норме и при стрессе. Оценка трансляционной активности осуществлялась с помощью выделения фракций мРНК, ассоциированных с полисомами. Выделено четыре класса мРНК (высокоэффективно транслируемые в норме, слабо транслируемые в норме, транслируемые в условиях стресса, высокоэффективно транслируемые в условиях стресса). Обнаружено, что стресс-специфическая трансляция коррелирует с присутствием лидерных открытых рамок считывания. Выдвинуто

предположение о том, что реинициация трансляции, характеристики которой зависят от статуса фосфорилирования фактора eIF2 $\alpha$ , является одним из ключевых механизмов, отвечающих за стресс-специфическую трансляцию мРНК в клетках млекопитающих.

5. Иммуногистохимически исследованы (1) экспрессия *DD2R* в жировом теле и яичниках самок *D. melanogaster*; (2) локализация *DD2R* в *corpus allatum* трансгенных самок *D. melanogaster* с нормальной и сниженной посредством РНК-интерференции экспрессией *DD2R*; (3) оценен уровень синтеза ЮГ у РНК-интерферентных самок. Впервые показано наличие Д2-подобных рецепторов в жировом теле дрозофилы и тем самым подтвержден сделанный нами на первом этапе реализации проекта (при исследовании повсеместной ксенобиотической активации *DD2R* на уровень деградации ЮГ) вывод о том, что негативная регуляция деградации ЮГ дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами. Подтверждена гипотеза, выдвинутая нами ранее (Gruntenko, Rauschenbach, 2008), что регуляция 20Э дофамином опосредуется ювенильным гормоном: в яичниках, синтезирующих 20Э, Д2-подобные рецепторы отсутствуют. Впервые продемонстрировано наличие Д2-подобных рецепторов в *corpus allatum*, и подтвержден сделанный нами на первом этапе реализации проекта вывод о том, что негативная регуляция синтеза ЮГ дофамином опосредуется Д2-подобными рецепторами: у РНК-интерферентных мух с резко сниженным числом *DD2R* в *corpus allatum*. повышен синтез ЮГ.

Таким образом, все задачи, поставленные на данном этапе решены полностью, кроме того, удалось дополнительно решить несколько проблем, актуальных для общего развития проекта. По результатам работы за отчетный период (01.01.2011 – 31.05.2011) было опубликовано 5 статей в высокорейтинговых рецензируемых журналах:

1. Rauschenbach I.Yu., Bogomolova E.V., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Faddeeva N.V., Menshanov P.N., Gruntenko N.E. Mechanisms of age-specific regulation of dopamine metabolism by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* females. *J. Comp. Physiol.* B. 2011. 181. 19-26.
2. Bazykin G.A., Kochetov A.V. Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 2011. 39. 567-577.
3. Левицкий В.Г., Ощепков Д.Ю., Ершов Н.И., Брызгалов Л.О., Антонцева Е.В., Васильев Г.В., Меркулова Т.И., Колчанов Н.А. Разработка методов распознавания сайтов связывания транскрипционных факторов FoxA, их экспериментальная верификация и использование для анализа данных массовой иммунопреципитации хроматина. Докл. Акад. наук. РАН. 2011. Т. 436. С. 413-421.
4. Богомолова Е.В., Адоньева Н.В., Фаддеева Н.В., Грунтенко Н.Е., Раушенбах И.Ю. Подавление экспрессии гена *DD2R* в *corpus allatum* самок *Drosophila melanogaster*

активирует щелочную фосфатазу. Генетика. 2011. Т.47. №4. С.557-559.

5. Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Antonov E.V., Dymshits G.M., Markel A.L. *Expression of the renin angiotensin system genes in the kidney and heart of ISIAH hypertensive rats // Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomedical Chemistry. 2011. V. 5(1). P. 37–43.*

Защищены две диссертации на степень кандидата биологических наук:

1. Климовой Натальи Викторовны «Распознавание сайтов связывания транскрипционных факторов SF-1 и SREBP на ДНК с помощью экспериментально-компьютерного подхода» на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.02.07 – генетика - 16 февраля 2011 года.
2. Защита диссертации Ершова Никиты Игоревича «Ранние изменения транскриптома печени крысы под действием гепатоканцерогенных аминоказосоединений» на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.02.07 – генетика - 6 апреля 2011 года

В исследованиях активное участие принимали молодые ученые, в том числе аспиранты и студенты старших курсов. Полученные результаты уже используются в учебном процессе (молекулярной биологии, компьютерной геномике; спецкурсы «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Антонов Е.В., Морева Т.А., Черкасова О.П., Гишинский М.А., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Изучение секреторной активности коры надпочечника у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Бюлл. СО РАМН. 2010. 30(4). 68-75.
2. Маркель А.Л., Дымшиц Г.М., Шмерлинг М.Д., Якобсон Г.С. Гены, стресс, гипертония. Бюлл. СО РАМН. 2002. 2. 35-40.
3. Маркель А.Л., Калашникова Е.В., Горякин С.В., Сахаров Д.Г., Т.А.Морева Т.А., Дымшиц Г.М., Гишинский М.А., Якобсон Г.С. Характеристика функциональной активности симпато-адреналовой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Бюлл. эксп. биол. мед. 2006. 141(3). 244-247.
4. Хворостова Ю.В., Горякин С.В., Петрова Г.В., Филипенко М.Л., Шихевич С.Г., Редина О.Е., Дымшиц Г.М., Маркель А.Л. Характеристика гипоталамо – гипофизарно - надпочечниковой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ. Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2002. 88(11). 1423-1432.
5. Черкасова О.П., Федоров В.И. Активность ренина почки и плазмы крови при наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензии Вестник ТГУ. 2006. 21. 167-168.
6. Черкасова О.П., Федоров В.И., Маркель А.Л. Активность ангиотензинпревращающего фермента при наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонии Бюл. эксперим. биол. мед. 2005. 140 (10). 381-383.
7. Amstislavsky S., Welker P., Fruhauf J.H., Maslova L., Ivanova L., Jensen B., Markel A.L., Bachmann S. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH). Histochem. Cell Biol. 2005. 8. 1-9.
8. Bazykin G.A., Kochetov A.V. Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 2011. 39. 567-577.
9. Breder C.D., D.Dewitt, R.P.Kraig. Characterization of Inducible Cyclooxygenase in Rat Brain. J. Comp. Neurol. 1995. 355(2). 296–315.
10. Bugajski J., Gadek-Michalska A., Głód R., Bugajski A.J.. Effect of social stress on COX-1 and COX-2-induced alterations in the adrenergic agonists-evoked hypothalamic-pituitary-adrenal responses. J. of Physiology and Hystology and Pharmacology. 2001. 52(4). 811-822.
11. Calkhoven C.F., Muller C., Leutz A. Translational control of C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  isoform expression. Genes Dev. 2000. 14. 1920-1932.
12. Calkhoven C.F., Muller C., Martin R., Krosel G., Pietsch H., Hoang T., Leutz A. Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. Genes Dev. 2003. 17. 959-964.

13. Cheng H.-F., Harris R.C. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension*. 2004. 43. 525-530.
14. Cover P.O., Slater D., Buckingham J.C. Expression of cyclooxygenase enzymes in rat hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Effects of endotoxin and glucocorticoids. *Endocrine*. 2001. 16(2). 123-131.
15. Cully M., Downward J. Translational responses to growth factors and stress. *Biochem. Soc. Transact*. 2009. 37. 284-288.
16. Draper I., Kurshan P.T., McBride E., Jackson F.R., Kopin A.S. Activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. *Dev. Neurobiol*. 2007. 67. 378-393.
17. Duffy S.J., Biegelsen E.S., Eberhardt R.T., Kahn D.F., Kingwell B.A., Vita J.A. Low-renin hypertension with relative aldosterone excess is associated with impaired NO-mediated vasodilation. *Hypertension*. 2005. 46. 707-713.
18. Fedoseeva L.A., Ryazanova M.A., Antonov E.V., Dymshits G.M., Markel A.L. Expression of the Renin Angiotensin System Genes in the Kidney and Heart of ISIAH Hypertensive Rats *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2011. 5(1). 37-43.
19. Gao L., Zucker I.H. AT2 receptor signaling and sympathetic regulation. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011. 11. 124-130.
20. Gao L., Wang W.-Z., Wang W., Zucker I.H.. Imbalance of AT1R and AT2R in the RVLM: potential mechanism for sympathetic overactivity in heart failure. *Hypertension*. 2008. 52(4). 708-714.
21. Gomez R.A., Lynch K.R., Chevalier R.L., Wilfong N., Everett A., Carey R.M., Peach M.J. Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. 1988. 254. F582-F587.
22. Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Bownes M., Segal D., Adonyeva N.V. and Rauschenbach I.Yu. Stress response in a juvenile hormone deficient *Drosophila melanogaster* mutant *apterous*<sup>56f</sup>. *Insect Mol. Biol*. 2003. 12. 353-363.
23. Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Interplay of juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J Insect Physiol*. 2008 54 (6). 902-908.
24. Harrap S.B., Van der Merwe W.M., Griffin S.A., MacPherson F., Lever A.F. Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension*. 1990. 16. 603-614.

25. Hearn M., Ren Y., McBride E., Reveillaud I., Beinborn M., Kopin A. A. *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. 99. 14554–14559.
26. Hickey R.W., Adelson P.D., Johnides M.J., Davis D.S., Yu Z., Rose M.E., Chang Y.-F., Graham S.H. Cyclooxygenase-2 activity following traumatic brain injury in the developing rat. *Pediatr Res.* 2007. 62. 271–276.
27. Horiuchi M., Mogi M., Iwai M. The angiotensin II type 2 receptor in the brain. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 2010 V.11. P. 1-6.
28. Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. 10. 113-127
29. Kammerl M.C., Nüsing R.M., Seyberth H.W., Riegger G.A., Kurtz A., Krämer B.K. Inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates urinary prostanoid excretion without affecting renal renin expression *Pflugers Arch.* 2001. 442. 842-847.
30. Kaufmann W.E., Worley P.F., Pegg J., Bremer M., Isakson P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93. 2317-2321.
31. Kaufmann W.E., Worley P.F., Taylor C.V., Bremer M., Isakson P.C. Cyclooxygenase-2 expression during rat neocortical development and in Rett syndrome. *Brain Dev.* 1997. 19(1). 25-34.
32. Kitaoka S., Furuyashiki T., Nishi A., Shuto T., Koyasu S., Matsuoka T., Miyasaka M., Greengard P., Narumiya S. Prostaglandin E<sub>2</sub> acts on EP1 receptor and amplifies both dopamine D1 and D2 receptor signaling in the striatum. *J. Neurosci.* 2007. 27(47). 12900–12907.
33. Kochetov A.V. Alternative translation and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *BioEssays* 2008. 30. 683-691.
34. Komatsu C., Shibata K., Furukawa T. et al. The developmental increase of the AT1A, but not the AT1B, receptor mRNA level at the preoptic area in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 1996. 58. 1109 – 1121.
35. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 2005. 361. 13-37.
36. Lambert-Langlais S., Pointud J.-C., Lefrançois-Martinez A.-M., Volat F., Manin M., Coudoré F., Val P., Sahut-Barnola I., Ragazzon B., Louiset E., Delarue C., Lefebvre H., Urade Y., Martinez A. Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F<sub>2α</sub> are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS ONE.* 2009. 4(10). e7309.

37. Malpas S.C. Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 2010. 90. 513–557.
38. Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Yu.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. Neuroendocrine profiling in ISIAH rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol.* 2007. 195. 439-450.
39. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ. Res.* 1998. 83. 1182-1191.
40. Matsuura T., Takuwa H., Bakalova R., Obata T., Kanno I. Effect of cyclooxygenase-2 on the regulation of cerebral blood flow during neuronal activation in the rat. *Neurosci Res.* 2009. 65(1). 64-70.
41. Mattson M.P., Maudsley S. Live longer sans the AT1A receptor. *Cell Metab.* 2009. 9(5) 403–405.
42. Mohn C.E., Fernandez-Solari J., De Laurentiis A., Prestifilippo J.P., de la Cal C., Funk R., Bornstein S.R., McCann S.M., Rettori V. The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E<sub>2</sub>. *PNAS.* 2005. 17. 6213–6218.
43. Nagata K., Obata K., Xu J., Ichihara S., Noda A., Kimata H., Kato T., Izawa H., Murohara T., Yokota M. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension.* 2006. 47. 656-664.
44. Nakamura A., Johns E.J. Renal nerves, renin, and angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995. 25. 581-586.
45. Park M.K., Kang Y.J., Lee H.S., Kim H.J., Seo H.G., Lee J.H., Chang K.C. The obligatory role of COX-2 expression for induction of HO-1 in ischemic preconditioned rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008. 377(4). 1191-1194.
46. Park C.G., Leenen F.H. Effects of centrally administered losartan on deoxycorticosterone-salt hypertension rats. *J. Korean. Med. Sci.* 2001. 5. 553 – 537.
47. Phillips M.I., Mohuczy-Dominiak D., Coffey M., Galli S.M., Ping W., Zelles T. Prolonged reduction of high blood pressure with an in vivo, nonpathogenic, adeno-associated viral vector delivery of AT1-R mRNA antisense. *Hypertension.* 1997. 29. 374 –380.
48. Qi Z., Hao C.-M., Langenbach R.I., Breyer R.M., Redha R., Morrow J.D., Breyer M.D. Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 2002. 110. 61–69.
49. Ruiz P., Basso N., Cannata M.A., Taquini A.C. The renin-angiotensin system in different stages of spontaneous hypertension in the rat (S H R). *Clin. Exp. Hypertens. A.* 1990. 12. 63 – 81.



50. Sanchez-Lemus E., Murakami Y., Larrayoz-Roldan I.M., Moughamian A.J., Pavel J., Nishioku T., Saavedra J.M. Angiotensin II AT<sub>1</sub> Receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinology*. 2008. 149(10). 5177–5188.
51. Sassard J., Lo M., Liu K-L. Lyon genetically hypertensive rats: an animal model of “low renin hypertension”. *Acta Pharmacol. Sin.* 2003. 24. 1-6.
52. Schinke M., Baltatu O., Böhm M., Peters J., Rascher W., Bricca G., Lippoldt A., Ganten D., Bader M. Blood pressure reduction and diabetes insipidus in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. 96. 3975–3980.
53. Shibata K., Komatsu C., Misumi Y., Furukawa T. Developmental differences of angiotensinogen mRNA in the preoptic area between spontaneously hypertensive and age-matched Wistar – Kyoto rats. *Mol. Brain Res.* 1993. 19. 115 – 120.
54. Spevak C.C., Park E.H., Geballe A.P., Pelletier J., Sachs M.S. Her-2 upstream open reading frame effects on the use of downstream initiation codons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. 350. 834-841.
55. Steckelings U.M., Kaschina E., Unger T. The AT<sub>2</sub> receptor—a matter of love and hate. *Peptides*. 2005. 26. 1401–1409.
56. Tamura K., Umemura S., Nyui N., Yamakawa T., Yamaguchi S., Ishigami T., Tanaka S., Tanimoto K., Takagi N., Sekihara H., Murakami K. Ishii M. Tissuespecific regulation of angiotensinogen gene expression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996. 27. 1216 – 1223.
57. Turnbull A.V., Rivier C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999. 79. 1-71.
58. Vakharia K., Hinson J.P. Lipopolysaccharide directly stimulates cortisol secretion by human adrenal cells by a cyclooxygenase-dependent mechanism. *Endocrinology*. 2005. 146. 1398–1402.
59. Wang D.H., Qiu J., Hu Z. Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in the adrenal gland. Role of aldosterone. *Hypertension*. 1998. 32. 65-70.
60. Wang H.W., Gallinat S., Li H., Sumners C., Raizada M.K., Katovich M.J. Elevated blood pressure in normotensive rats produced by ‘knockdown’ of the angiotensin type2 receptor. *Exp. Physiol.* 2004. 89(3). 313–322.
61. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 2006. 34(Pt 1). 7-11.
62. Wethmar K., Smink JJ, Leutz A. Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *BioEssays*. 2010. 32. 885-893.

63. Wilson R.C., Dave-Sharma S., Wei J.-Q., Obeyesekere V.R., Li K., Ferrari P., Krozowski Z.S., Shackleton C.H.L., Bradlow L., Wiens T., New M.I. A genetic defect resulting in mild low-renin hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 95. 10200–10205.
64. Vallone D., Picetti R., Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000. 24. 125-132.
65. Yang T., Singh I., Pham H., Sun D., Smart A., Schnermann J.B., Briggs J.P. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am. J. Physiol.* 1998. 274. F481–F489.
66. Zhou M.-S., Schulman I.H., Pagano P.J., Jaimes E.A., Raj L. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure. *Hypertension.* 2006. 47. 81-86.