

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)

“15” ноября 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 № 4)

Наименование этапа: «Контроль экспрессии генов дофаминовых рецепторов»

Руководитель проекта

д.б.н., проф.

_____ Г. М. Дымшиц
подпись, дата

Новосибирск 2011

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

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

<i>н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Пахарукова М. Ю.</i>
	подпись, дата	(раздел 1)
<i>н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Климова Н. В.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Брагин А. Г.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>н.с.</i>	_____	<i>Федосеева Л.А.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Герасимова С.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 4)
<i>н.с. к.б.н.</i>	_____	<i>Ершов Н.И.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Иванисенко Т.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Шевелев О.Б.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Горелова В.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Климов Л.О.</i>
	подпись, дата	(раздел 1)
<i>аспирант</i>	_____	<i>Брагин А.О.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>студент</i>	_____	<i>Никулин П.С.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>студент</i>	_____	<i>Аркова О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 2)
<i>студент</i>	_____	<i>Сайк О.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 1)
<i>студент</i>	_____	<i>Медведев К.Е.</i>
	подпись, дата	(раздел 3)
<i>студент</i>	_____	<i>Емцева М.В.</i>
	подпись, дата	(раздел 5)
<i>Нормоконтролер</i>	_____	<i>Амайзер Н.Н.</i>
	подпись, дата	

РЕФЕРАТ

Отчет 47 с., 14 рис., 4 табл., 57 источников.

СИГНАЛЫ ЭКСПРЕССИИ, СТРЕСС, КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР, ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ ХРОМАТИНА, SOLiD, МЕТОД CHIP-SEQ, FOXA, ЮВЕНИЛЬНЫЙ ГОРМОН, Д2-РЕЦЕПТОРЫ, ДОФАМИН

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 современные методы количественного анализа паттернов экспрессии генов эукариот, а также ряд уникальных генетических моделей.

1. Для исследования транскрипционного контроля генов, вовлеченных в онкогенез, проведена иммунопреципитация хроматина тканей печени, почки и надпочечников самцов крыс шестимесячного возраста с использованием антител против транскрипционных факторов SF1 и LRH. Из данного материала получены специфические библиотеки для системы SOLiD. Качество полученного материала проверено тестовым лигированием – «WFA» на системе SOLiD, проводится секвенирование библиотек на системе SOLiD.

2. Исследована экспрессия ключевого гена биосинтеза катехоламинов тирозин-гидроксилазы (TH) в тканях надпочечников, гипоталамуса и продолговатого мозга у молодых (1.5 мес) и взрослых (4-7 мес) крыс гипертензивной линии НИСАГ в сравнении с нормотензивной линией WAG. Мы не выявили различий в базальном уровне мРНК *Th* в надпочечниках крыс WAG и НИСАГ в возрасте 1.5 и 4 месяца, но у крыс в возрасте 7 месяцев наблюдалось небольшое (23%), но статистически достоверное снижение уровня мРНК *Th* в надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG. Повышение экспрессии гена *Th* в этом органе у обеих линий крыс при стрессе водной депривации не достигало статистически достоверного уровня. В гипоталамусе, но не в продолговатом мозге, у молодых крыс НИСАГ уровень мРНК *Th* оказался втрое повышен по сравнению с таковым у нормотензивных крыс WAG. К возрасту 4 месяцев повышенный вдвое уровень мРНК *Th* наблюдался в продолговатом мозге крыс НИСАГ, однако таких различий в гипоталамусе не было. Необычно, что стресс водной депривации вызвал повышение содержания мРНК *Th* в гипоталамусе крыс НИСАГ втрое, в то время как у крыс WAG этот показатель вообще не изменилось. Это наблюдение подтверждает повышенную реактивность симпатической нервной системы крыс НИСАГ. К возрасту 7 мес содержание мРНК *Th* в мозговых структурах крыс НИСАГ, как и в надпочечниках, оказывается даже ниже, чем у крыс WAG. Сделано заключение о том, что на формирование

гипертензивного статуса крыс НИСАГ может влиять состояние ренин-ангиотензиновой системы в первые недели их жизни, у взрослых животных за поддержание высокого уровня артериального давления отвечают другие системы.

3. Изучалась связь между гепатоканцерогенностью азосоединений ОАТ и 3'-МеДАБ для мышей линии GR и одним из ранних событий воздействия этих факторов – их влиянием на ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора FoxA. При введении мышам однократно в возрасте 12 дней 3'-МеДАБ вызывал опухоли печени у самцов и самок в 100% случаев, наравне с известным мышинным гепатоканцерогеном ОАТ. При этом ОАТ снижал ДНК-связывающую активность FOXA в печени в 2,5-3 раза и, как следствие, снижал на 40% уровень глюкокортикоидной индукции печень-специфического гена TAT. В отличие от этого, 3'-МеДАБ не изменял ни активность FOXA белков, ни степень глюкокортикоидной индукции TAT.

4. В отчетный период осуществлен иммуногистохимический анализ яичников половозрелых самок *D. melanogaster* с использованием кроличьих антител против рецептора дофамина 2R (DD2R) и измерен титр 20-гидроксиэкдизона (20Э) у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R в железе, синтезирующей ювенильный гормон. Впервые продемонстрировано, что в фолликулярных клетках яичников (месте синтеза 20Э) половозрелых самок дрозофилы отсутствуют Д2-подобные рецепторы. Впервые показано, что у самок дрозофилы с повышенным в результате снижения числа DD2R в *corpus allatum* титром ЮГ, уровень 20Э резко повышен. Таким образом подтверждено, что дофамин регулирует уровень 20Э опосредованно, через систему метаболизма ЮГ.

Полученные результаты используются в учебном процессе (курсы «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»). За период четвертого этапа защищена одна докторская и одна кандидатская диссертация и опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	13
1. Полногеномный анализ распределения сайтов связывания SF1 в различных тканях крысы в условиях <i>in vivo</i> , выявление общих и тканеспецифичных сайтов и генов-мишеней SF1.....	25
2. Определение уровня экспрессии ключевых генов симпато-адреналовой системы крысы в норме и при стрессе	28
3. Изучение влияния гепатоканцерогенов на экспрессию генов, продукты которых связаны с контролем пролиферации, в печени экспериментальных животных	34
4. Иммуногистохимическая оценка содержания и локализации D2-подобных рецепторов в яичниках дрозофилы – месте синтеза 20-гидроксиэкдизона	36
5. Измерение титра 20-гидроксиэкдизона у самок дрозофилы со сниженной посредством РНК-интерференции экспрессией гена DD2R в железе, синтезирующей ювенильный гормон	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	42

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. На третьем этапе проекта нами была 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) 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». На третьем этапе проекта нами была изучена экспрессия генов ренин-ангиотензиновой системы (РАС), кодирующих ангиотензиноген, ренин, ангиотензин-превращающий фермент, рецепторы ангиотензина II первого и второго типа и рецептор ренина/проренина, которую определяли 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. 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) 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. На третьем этапе проекта нами был 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 α , является одним из ключевых механизмов стресс-специфического контроля экспрессии генов млекопитающих;

(4) *Исследование роли контроля экспрессии генов дофаминовых (ДА) рецепторов в поддержании гормонального статуса в нормальных и стрессирующих условиях.* Установлено, что D2-подобный рецептор (D2R) у млекопитающих является ключевым модулятором двигательной функции. У человека D2R 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 D2-подобных рецепторов изменяют интенсивность ответа щелочной фосфатазы на стресс: стресс-реактивность фермента снижена у самок, кормленных бромкриптином (агонистом D2-подобных рецепторов дофамина), и повышена у самок, кормленных метаклопрамидом (антагонистом D2-подобных рецепторов дофамина). Щелочная фосфатаза регулирует содержание предшественника дофамина – тирозина. Таким образом, показано, что

изменение функциональной активности D2-подобных рецепторов влияет на метаболизм дофамина. Также было показано, что негативная регуляция активности щелочной фосфатазы дофамином опосредуется D2-подобными рецепторами: снижение числа D2-подобных рецепторов повышает активность фермента. На основе данных, представленных в выводе 5 и 6 можно заключить, что нами впервые показано, что D2-подобные рецепторы дофамина играют существенную роль в развитии стресс-реакции насекомых. На втором этапе проекта изучено влияние ксенобиотической активации D2-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 D2-подобными рецепторами. Обнаружено, что ксенобиотическая активация D2-подобных рецепторов вызывает снижение деградации ЮГ и этот эффект имеет онтогенетический характер. На третьем этапе проекта нами было обнаружено наличие D2-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 D2-подобными рецепторами.

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 4-го этапа проекта — изучение контроля экспрессии генов дофаминовых рецепторов. Задачи этапа включают следующие виды работ:

1. Полногеномный анализ распределения сайтов связывания SF1 в различных тканях крысы в условиях *in vivo*, выявление общих и тканеспецифичных сайтов и генов-мишеней SF1.
2. Определение уровня экспрессии ключевых генов симпато-адреналовой системы крысы в норме и при стрессе.
3. Изучение влияния гепатоканцерогенов на экспрессию генов, продукты которых связаны с контролем пролиферации, в печени экспериментальных животных.
4. Иммуногистохимическая оценка содержания и локализации D2-подобных рецепторов в яичниках дрозофилы – месте синтеза 20-гидроксиэкдизона.
5. Измерение титра 20-гидроксиэкдизона у самок дрозофилы со сниженной посредством РНК-интерференции экспрессией гена DD2R в железе, синтезирующей ювенильный гормон.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Развитие и жизнедеятельность многоклеточных животных обеспечивается строго контролируемым и специфическим 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 (четвертого) этапа главным образом была проведена работа по изучению контроля экспрессии генов дофаминовых рецепторов, однако также была получена новая интересная информация по другим направлениям работы.

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. При этом основное внимание было уделено влиянию канцерогенов на паттерн экспрессии регуляторных генов, связанных с развитием опухолей. Были применены современные методы высокопроизводительного анализа. 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. Представляет большой интерес сравнительное изучение полногеномной локализации на хроматине транскрипционных факторов SF1 и LRH, которые имеют почти аналогичный консенсус сайта связывания, но экспрессируются в различных тканях и регулируют различные биологические процессы.

Другое направление работы в рамках НОЦ и настоящего проекта связано с исследованием молекулярно-генетических основ артериальной гипертензии (АГ).

Артериальная гипертензия – это состояние постоянно повышенного артериального давления (АД), в первую очередь из-за повышенного сосудистого сопротивления в системной циркуляции. Гипертензия – одна из ведущих причин нетрудоспособности, заболеваемости и смертности среди населения; это наиболее обычное хроническое заболевание в мире. И это один из наиболее важных факторов риска для сердечно-сосудистых заболеваний, сердечных приступов и инсультов (National High Blood Pressure Education Program. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: Complete report. NIH pub no 04–5230. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health; 2004. Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/jnc7full.htm>). Например, в США среди всех случаев смертей в 2007 году первое и третье места занимала смертность от заболеваний сердца и цереброваскулярных болезней (25 и 6%, соответственно) (National Center for Health Statistics. Health, United States, 2010: With Special Feature on Death and Dying. Hyattsville, MD. 2011). Всемирная Организация Здравоохранения связывает с высоким кровяным давлением более 7 млн. смертей в год.

Согласно сегодняшнему пониманию, артериальное давление (АД) – это тонко регулируемый количественный показатель, на который влияет множество физиологических систем, которые в конечном счете интегрируются и поддерживают уровень АД для безопасного и адекватного кровотока во всех тканях, несмотря на широко различающиеся метаболические потребности (Roskopf et al., 2007). Национальный Центр Статистики Здоровья США определяет гипертензию как повышенное кровяное давление и/или прием антигипертензивных лекарств,

причем повышенным считается систолическое давление от 140 мм рт.ст. и диастолическое – от 90 мм рт.ст. (National Center for Health Statistics. Health, United States, 2010: With Special Feature on Death and Dying. Hyattsville, MD. 2011). В соответствии с этим, распространенность гипертонии может охватывать значительную часть и даже большинство взрослого населения в индустриализованных и стареющих обществах в ближайшем будущем, например, в Западной Европе. В США частота встречаемости гипертонии у людей старше 20 лет возросла с 25% в начале 90-х годов прошлого столетия до 30% и более к 2008 году. Начиная же с возраста 55 лет более половины населения США страдает этим недугом (National Center for Health Statistics. Health, United States, 2010: With Special Feature on Death and Dying. Hyattsville, MD. 2011). При достаточно долгой жизни, многие, если не большинство, людей придут к гипертонии. Поэтому необходимо понимать патогенез гипертонии как динамический процесс, вероятно, берущий свое начало еще в раннем детстве.

Доступные свидетельства показывают, что генетические механизмы дают вклад в регуляцию АД (см. обзор Roszkopf et al., 2007). Наблюдается существенная корреляция между значениями АД родителей и детей, и документально подтверждено, что сходство значений АД внутри семей сильнее, чем между семьями. Наблюдения за монозиготными близнецами демонстрируют более значительные совпадения, чем у гетерозиготных близнецов. Наблюдения за приемными детьми также показали, что внутрисемейные совпадения уровней АД не являются просто следствием сходных условий жизни, поскольку биологические братья и сестры проявляли более высокий уровень совпадений, чем приемные. Аналогичная ситуация складывается в наблюдаемых вариациях веса тела, который также управляется как наследственными, так и средовыми факторами. Факторы окружения и питания, как и различный стиль жизни, также дают свой вклад в патогенез первичной гипертонии как важные и поддающиеся модификации факторы риска. Считается, что 30-60% наблюдаемых вариаций в АД определяется генетическими факторами, определяемыми пятью, десятью или более генами, каждый из которых имеет только весьма ограниченный вклад. Окружение (питание) определяет оставшуюся половину вариации АД. Таким образом, мы стоим перед сложным взаимодействием повышающих и снижающих АД генов, многие из которых обладают плеiotропными эффектами, в сочетании с множеством экзогенных факторов. Кроме того, первичная гипертония тесно связана с множеством других заболеваний, включая метаболический синдром, диабет второго типа, преэклампсию или почечные заболевания.

Моногенные, или менделевские, формы гипертонии – это крайне редкие нарушения. Наиболее подробно описанные формы – это аутосомные заболевания, которые сопровождаются определенным фенотипом в дополнение к повышенному АД. Внимательные клинические наблюдения сделали возможными построение родословных, проведение классического

анализа связей, идентификацию локусов, связанных с болезнью и, в конечном счете, нахождение генетических дефектов, которые могут быть индикаторами подобных отклонений и в первичной гипертонии. Среди моногенных гипертонических форм наиболее известные – это излечимый глюкокортикоидами альдостеронизм (GRA), видимый избыток минералокортикоидов (AME), синдром Лиддла, синдром Гордона (псевдоальдостеронизм 2 типа) и некоторые другие.

В отличие от редких случаев моногенной гипертонии, первичная, или эссенциальная гипертония определяется полигенными механизмами, мозаикой нейральных, гормональных и клеточных отклонений с сильным влиянием стиля жизни и факторов окружающей среды. Эссенциальная гипертония составляет около 90-95% всех случаев гипертонии у людей. Генетический вклад в вариации кровяного давления (BP) у человека оценивается в 30–50% (Rassler 2010). У большинства пациентов гипертония имеет мультигенную основу и проявляет различные свойства. В частности, экспрессия соль-чувствительности отличается в широких пределах, подразделяя гипертоников на соль-чувствительных и соль-резистентных. В литературе утверждения, касающиеся процента соль-чувствительных пациентов, меняются в пределах между 30% и 70% [2,3]. Есть свидетельства, что вклад определенных генетических полиморфизмов меняется в зависимости от этнической принадлежности. За последнюю декаду, многие гены были включены в изучение генетики гипертонии, причем во многих случаях лишь на узкой базе доказательств (Rosskopf et al., 2007).

Стресс как фактор, провоцирующий развитие артериальной гипертонии. Наряду с генетической предрасположенностью в развитии гипертонической болезни немаловажную роль играет такой фактор, как стресс. Стресс, физиологический ли, психологический или связанный с условиями жизни, - это двуединый феномен. С одной стороны, это важная адаптивная функция, которая ведет к улучшению здоровья и выживания, приспособлявая к чрезвычайным и опасным ситуациям. С другой стороны, стресс может быть крайне вреден, будучи избыточным (Selye, 1975). В частности, индивидуум, неспособный справиться со стрессом, высоко подвержен множеству заболеваний. Тем не менее, когда ось НРА, симпатoadреналовая и центральная КА системы активируются многократно в течение долгого периода времени, ответ становится не только адаптивным, но также и дезадаптивным [см. обзоры Chrousos and Gold, 1992; McEwen, 1998). Длительный стресс повышает аллостерическую нагрузку и дает основной вклад в развитие сердечно-сосудистых нарушений и психиатрических болезней. Стресс также повышает восприимчивость тела к инфекциям, аутоиммунным заболеваниям, синдрому хронического ожирения и раку. Многие исследования подтверждают, что стресс повышает индивидуальную склонность к

злоупотреблению наркотиками. Более того, стресс может влиять на развитие хронических заболеваний (Sabban, 2007).

Современные концепции стресса рассматривают его как осознанно или неосознанно ощущаемую угрозу гомеостазу (Goldstein and McEwen, 2002), при которой ответ имеет степень специфичности, зависящую, среди прочего, от специфических (особых) проблем для гомеостаза, от восприятия стрессора организмом, и от осознанной способности бороться с ним (Goldstein 2001). Даже простой гомеостатический рефлекс отражает стресс, когда ощущаемое расхождение между установочной точкой для регулируемой переменной и информация о реальном уровне этой переменной дает компенсаторный ответ, чтобы снизить это расхождение. Таким образом, стресс можно рассматривать как условие, когда ожидания, генетически ли программируемые, установленные предыдущим обучением или выведенные из обстоятельств, не соответствуют текущим или предполагаемым восприятиям внутренней или внешней среды, и это расхождение между наблюдаемым или ощущаемым, с одной стороны, и ожидаемым или запрограммированным, с другой, приводит к соответствующим определенному образцу ответам (Goldstein and Kopin, 2007).

Симпатическая нервная система (СНС) является одним из основных нейроэндокринных звеньев стресса. В ответ на различные воздействия в организме происходит быстрое возбуждение СНС и усиление секреторной деятельности мозгового слоя надпочечников. Стимуляция симпатoadреналовой системы приводит к активации ферментов биосинтеза катехоламинов. Катехоламины (дофамин, адреналин и норадреналин) одними из первых появляются в крови в ответ на стресс и необходимы для формирования адекватного ответа. Именно симпатoadреналовая система ответственна за резкое увеличение концентрации норадреналина и адреналина в плазме крови в ответ на стресс. Эмоциональный стресс вызывает повышение уровня синтеза катехоламинов, а значит, и индукцию ферментов, принимающих участие в этих реакциях. Во многих исследованиях было показано, что в ответ на различные физиологические и фармакологические стимулы, такие как холодовой или иммобилизационный стресс, никотин, резерпин, форсколин, факторы роста и др., происходит увеличение уровня мРНК гена тирозин-гидроксилазы (*Th*) в мозговом веществе надпочечников - основном месте синтеза адреналина, а также некоторых отделах мозга (Kvetnansky et al., 2009).

Адреналин, в первую очередь из медуллы надпочечника (НП), и норадреналин, из симпатических нервных окончаний и медуллы НП, активируют сердечную и скелетную мускулатуру для ответа по типу “fight or flight” на острый стресс. Кроме того, катехоламины из НП, и особенно адреналин, играют ключевую роль в процессах, связанных с памятью. Выброс катехоламинов из медуллы НП – один из наиболее быстрых ответов на стресс. В 70-х,

Ричард Кветнянский с сотр. определил, что запускаемый стрессом выброс адреналина и норадреналина из НП настолько быстр, что требуется канюлирование животных для аккуратного измерения роста норадреналина и адреналина в плазме (Kvetnansky et al. 1978). Устойчивый выброс катехоламинов ведет к снижению уровня адреналина в НП. Тем не менее, после длительного ежедневного воздействия иммобилизационного стресса в течение недели или даже месяца, адрено-медуллярные норадреналин и адреналин устанавливаются на новых, повышенных уровнях, причем адреналин в НП на 50%, а норадреналин почти вдвое превышают базальный уровень. Было впоследствии показано, что это происходит из-за повышенной активности ферментов биосинтеза катехоламинов (Sabban, 2007). Например, повторное воздействие иммобилизационного стресса ведет к повышению уровней белка и ферментативной активности ТН и DBH, хотя при однократном действии этого стрессора не наблюдали заметных изменений (Sabban and Kvetnansky, 2001). Поэтому удивительно, что уже за 5 мин экспозиции стресса (самое короткое время тестирования) наблюдался 3-4-кратный рост скорости транскрипции ТН и DBH. Этот подъем транскрипции был так же велик, как и наблюдаемый при продолжительной, 2-часовой иммобилизации и при повторяющемся стрессе (Nankova et al. 1999). Таким образом, транскрипция генов ТН и DBH происходит так же быстро, как стресс запускает рост адренальных глюкокортикоидов.

Во многих исследованиях анализируется связь между симпатической нервной активностью, уровнем норэпинефрина плазмы и гипертонией. Уровни норадреналина плазмы (в первую очередь из симпатических нервных окончаний, но также и из медуллы НП) также заметно повышаются с возрастом у людей и экспериментальных животных, и, как предполагается, сочетаются с растущей гипертонией у пожилых людей (см. обзор Goldstein, 1995). Норадреналин, секретируемый из симпатических нервов, ведет к сокращению клеток гладкой мускулатуры, вызывая железистую секрецию, вазоконстрикцию и сокращения сердца. Системная вазоконстрикция повышает общее периферическое сопротивление кровотока тела, которое в сочетании с сердечной стимуляцией повышает кровяное давление. Сверх всего, выяснилось, что симпатические эфферентные нервы играют важную роль в контроле кровяного давления во многих ситуациях. Оказалось, что они способствуют установлению гипертонии, даже когда ее первичная причина иная. Тем не менее, их роль в инициации становления эссенциальной гипертонии остается противоречивой (см. обзор Mathias, 1991). Изменения в симпато-нейральной функции, ассоциированные с инфарктом миокарда, могут быть первичными, с преувеличенным сердечным или экстракардиальным выбросом норадреналина, повышающим миокардиальное потребление кислорода и приводящим к ишемии, или может быть вторичным, с вовлечением кардиальных и экстракардиальных симпатонейральных выходов, управляющих работой сердечно-сосудистой системы (см. обзор

Goldstein, 1995). Застойные сердечные нарушения также связаны с активацией симпатической нервной системы. Хотя эта активация может обеспечивать кратковременную гемодинамическую поддержку при сердечных нарушениях, через длительное время это оказывается вредным. Препринципальные и клинические исследования доказывают, что хроническая симпатическая активация при застойных сердечных нарушениях является дезадаптивным ответом, который ускоряет прогрессирующее ухудшение (Sabban, 2007).

В последние десятилетия ведутся интенсивные исследования генетико-физиологических механизмов гипертонической болезни. Важным условием, обеспечивающим успех этих исследований, стало создание экспериментальных генетических моделей гипертонической болезни, каждая из которых воспроизводит один из вариантов этого, по сути дела, гетерогенного заболевания и позволяет изучать каждую из этих форм по отдельности, в чистом виде. Поскольку эссенциальная гипертония человека является сложным и комплексным заболеванием, исследователи вывели различные линии лабораторных животных, и прежде всего крыс с высоким давлением, для изучения этой болезни на экспериментальных моделях. В некоторых случаях были также селектированы животные с низким давлением, либо поддерживаются неселектированные стоковые животные, из которых выведена гипертензивная линия.

Наиболее известные гипертонические линии крыс – это линия GH (генетически гипертензивные) из Новой Зеландии; сольчувствительные (S) и сольрезистентные (R) крысы Dahl, отобранные по реакции АД на высокосолевою диету; крысы со спонтанной гипертонией SHR, выведенные по признаку высокого АД без провокативных стимулов в Киото, Япония, и контрольные к ним крысы Wistar-Kyoto; крысы Sabra, подверженные гипертонии (SBH) и Sabra, устойчивые к гипертонии (SBN), выведенные на основе ответа АД на одностороннюю нефрэктомия, воздействие дезоксикортикостерон-ацетата и 1% NaCl в питье; линии крыс Lyon, селектированные по высокому (LH) или низкому (LL) АД (третья линия, LN, была отобрана по нормальному давлению) без специальных провоцирующих воздействий; Миланские линии (Milan) также селектированы на высокое (MHS) и низкое (MNS) давление без провоцирующих факторов (Rapp, 2000).

В результате многолетней селекции в Институте цитологии и генетики СО РАН получена линия крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертонией (линия НИСАГ). Крысы линии НИСАГ представляют одну из наиболее удобных моделей для изучения развития гипертонической болезни под влиянием психоэмоционального стресса, который является важнейшим фактором формирования артериальной гипертонии человека. Известно, что уровень стресса определяется как интенсивностью стимуляции (стрессора), так и чувствительностью или восприимчивостью организма к этой стимуляции, то есть

фактически взаимодействием средовых и организменных, в том числе и генетических, факторов. Поэтому для создания экспериментальной модели стресс-чувствительной артериальной гипертонии проводилась работа по генетической селекции линии крыс, отличающихся повышенной чувствительностью к действию эмоциогенных стимулов, которая выражалась бы в увеличении АД (Маркель, 2002). Селекция проводилась фактически в два этапа. На первом этапе на протяжении 17 поколений для скрещиваний отбирали крыс из разных семей, отличающихся повышенным уровнем АД в условиях эмоционального стресса. После того как был достигнут значительный селекционный успех, был начат второй этап, призванный получить гомозиготную линию со стабильным проявлением признака (повышенного АД), пригодную для последующего генетического анализа. С этой целью на протяжении более 20 поколений проведены близкородственные (братско-сестринские) скрещивания. В такой инбредной линии все особи имеют практически одинаковый геном. Важно отметить, что несмотря на то, что селекция велась на повышение АД при стрессе, отмечено также увеличение базального АД, которое достигло 160-170 мм рт. ст. Действие эмоционального стресса приводит у крыс селектированной линии к повышению АД еще на 35-40 мм рт. ст., в результате чего оно достигает 200 мм рт.ст.

За прошедшие годы были исследованы многие физиологические и биохимические характеристики данной линии (Маркель, 2002). Показано, что крысы НИСАГ характеризуются повышенной поведенческой активностью в незнакомой обстановке (тест открытого поля), что свидетельствует об их повышенной психологической возбудимости. Отмечены изменения в скорости обмена и концентрации норадреналина, дофамина и серотонина в отделах мозга, участвующих в регуляции артериального давления и стресс-реактивности. Изменены также концентрации и соотношения $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -адренорецепторов в данных отделах мозга. Внутримозговое введение фармакологических агентов, избирательно стимулирующих $\alpha 1$ -адренорецепторы, крысам НИСАГ приводит к повышению артериального давления, в то время как у контрольных крыс такая стимуляция сопровождается его снижением. У гипертензивных крыс также изменена реакция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГАС, основного гормонального звена стресса) на стимуляцию $\alpha 1$ -адренорецепторов головного мозга. Отсюда было сделано заключение, что изменение норадренергической регуляторной системы головного мозга у крыс НИСАГ может быть ответственно как за повышение АД, так и за изменение стрессовой реактивности. Наши данные указывают на более высокую стресс-реактивность ГГАС крыс линии НИСАГ (Хворостова и др., 2002; Markel et al., 2007). С коррекцией функции норадренергических механизмов мозга в раннем онтогенезе связана также возможность смягчения развития гипертензивного статуса у крыс линии НИСАГ (Маркель, 2002).

С особенностями функции норадренергической системы мозга связано, вероятно, повышение симпатической нервной активности у крыс НИСАГ как в состоянии покоя, так и при стрессе (Маркель и др., 2006; Markel et al., 2007). Это находит выражение в увеличении концентрации адреналина в мозговом слое надпочечников и повышении активности основных ферментов его биосинтеза – тирозингидроксилазы, дофамин-β-гидроксилазы и фенилэтанол-амин-N-метилтрансферазы. Это свидетельствует о том, что, вероятно, у крыс этой линии присутствуют какие-то изменения в цепи биосинтеза катехоламинов.

Исходя из этого, целью данного этапа нашей работы являлось изучение особенностей экспрессии гена ключевого фермента биосинтеза катехоламинов тирозин-гидроксилазы в мозговом веществе надпочечников, гипоталамусе и продолговатом мозге у крыс гипертензивной линии НИСАГ по сравнению с крысами нормотензивной линии WAG.

Роль транскрипционных факторов в канцерогенезе. Известно, что канцерогенез характеризуется нарушением баланса процессов пролиферации, апоптоза и дифференцировки. За поддержание такого баланса в высокодифференцированной клетке отвечают регуляторные белки - транскрипционные факторы, которые обеспечивают специфику протеома определенного типа клеток. Примером таких белков является семейство транскрипционных факторов FOXA. Белки этого семейства (FoxA1, FoxA2, FoxA3) экспрессируются в печени, поджелудочной железе и легких, способствуют декомпактизации хроматина и контролируют экспрессию множества генов-мишеней. В печени обнаружено более 100 генов-мишеней FoxA, продукты которых регулируют процессы дифференцировки, клеточного метаболизма, поддержания фенотипа клеток. Вовлеченность факторов FoxA в индукцию опухолей исследована нами на модели различных гепатоканцерогенных веществ, прежде всего азосоединений, которые обладают выраженной тканевой, видовой и линейной специфичностью. С целью более глубокого изучения роли FOXA белков в механизмах развития опухолей печени мы исследовали влияние ОАТ и 3'МеДАБ на индукцию опухолей у 12-ти дневных мышей линии GR, ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов FOXA в печени и уровень глюкокортикоидной индукции ТАТ у этих животных.

Исследование молекулярно-генетических механизмов ответа на стрессовые воздействия также проводилось на эволюционно-консервативной 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). У взрослых насекомых, в том числе у *Drosophila*, ЮГ и 20Э, с одной стороны, задействованы в механизме стресс-реакции (Rauschenbach et al., 1995; Hirashima et al., 2000), а с другой - играют роль гонадотропинов (инициируя синтез ЖБ в жировом теле и фолликулярных клетках яичника сразу после вылета

имаго, поддерживая его на определенном уровне после оплодотворения, регулируя поглощение ЖБ ооцитами) и детерминируют половое поведение и синтез феромонов (обзор: Simonet et al., 2004).

Постлесвейт и Паркер (Postlethwait and Parker, 1987) разработали модель гормонального контроля синтеза желточных белков (ЖБ), в которой ЮГ стимулирует синтез (а затем – секрецию и поглощение) ЖБ фолликулярными клетками яичников и одновременно индуцирует экдизонсекретирующие клетки яичника к синтезу или секреции 20Э, который, в свою очередь, инициирует синтез ЖБ в жировом теле. Эта модель была дополнена в исследованиях Баунс (обз.: Bownes, 1989), показавшей, что у *D. melanogaster* (1) ЮГ модулирует транскрипцию *yr* генов, (2) 20Э поддерживает ее на высоком уровне, (3) ЮГ необходим в высоких дозах для инициации созревания яичников после вылета и затем в более низких - для поддержания продукции ЖБ жировым телом.

Ричард и соавторы (Richard et al., 2001), изучая вителлогенез у ЮГ-дефицитных мутантов и диапаузирующих самок дикого типа *D. melanogaster*, также подтвердили заключение Постлесвейта и Паркера (Postlethwait, Parker, 1987) в том, что ЮГ инициирует ранние стадии вителлогенеза и синтез экдистероидов в яичниках, а 20Э стимулирует синтез ЖБ в жировом теле. Однако, в отличие от Постлетвейта и Паркера (Postlethwait, Parker, 1987), Ричард и соавторы (Richard et al., 2001) считают, что поглощение ЖБ ооцитами регулируется 20Э, а не ЮГ, и вообще отводят экдизону основную роль в контроле оогенеза у *D. melanogaster*.

Нам же представляется наиболее перспективной более близкая к модели Постлетвейта и Паркера (Postlethwait and Parker, 1987) гипотеза, выдвинутая Соллером и соавторами (Soller et al., 1999) в результате анализа данных своих экспериментов по обработке самок *D. melanogaster* экзогенными ЮГ и 20Э. Они полагают, что развитие вителлогенических ооцитов, включая как синтез ЖБ в фолликулярных клетках, так и их поглощение ооцитами, стимулируются ЮГ, тогда как 20Э контролирует превителлогенические стадии развития ооцитов. Согласно их представлениям, у *Drosophila* для нормального течения оогенеза принципиальным является поддержание баланса ЮГ и 20Э (Soller et al., 1999). В наших исследованиях это представление было подтверждено и показано, что нарушение баланса вызывает драматические изменения в ходе оогенеза (Gruntenko et al., 2003).

Очевидно, что для поддержания такого баланса должен существовать механизм, обеспечивающий регуляцию титра одного из гонадотропинов под воздействием изменения в титре другого. Исследования возможных взаимодействий 20Э и ЮГ проводились на многих видах насекомых. Установлено, что ЮГ регулирует *in vivo* продукцию экдистероидов в яичниках взрослых самок, дрозофилы в том числе (обзоры: Bownes, 1989; Simonet et al., 2004).

Четкое регулирование титра ЮГ и 20Э в гемолимфе необходимо не только для координации процессов, связанных с контролем вителлогенеза и репродуктивной функции, но и для регуляции изменений, происходящих в ответ на стрессорное воздействие (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2008). Каков же может быть механизм подобной взаимной регуляции ЮГ и 20Э? Показно, что помимо специфических нейропептидов, обладающих проторакотропным, аллатотропным и аллатостатическим действием (обзор: Simonet et al., 2004), метаболизм ЮГ и 20Э может регулироваться биогенными аминами, октопамином (ОА) и дофамином (ДА), влияние которых на метаболизм гонадотропинов обнаружено в экспериментах *in vitro* на различных видах насекомых (Lafon-Cazal, Baehr, 1988; Woodring, Hoffmann, 1994; Kaatz et al., 1994; Rachinsky, 1994; Granger et al., 1996; Hirashima et al., 1999).

Однако долгое время оставалось неизвестным, обладают ли эндогенные амины таким же влиянием *in vivo*, являясь ли это влияние генетически детерминированным, и влияют ли ОА и ДА как нейрогормоны на воспроизводительную функцию (оогенез, плодовитость) насекомых. Мы попытались выяснить это, используя фармакологические подходы и генетические модели – линии дрозофилы у которых в результате мутации резко изменен уровень одного из биогенных аминов.

Чтобы определить, как влияет изменение уровня биогенных аминов *in vivo* на метаболизм ЮГ, мы использовали мутантные линии *D. melanogaster*: линию *Tβh^{nM18}* с нуль мутацией гена *тирамин-β-гидроксилазы*, приводящей к полному отсутствию ОА у мух этой линии, и линии *ste* и *e* *D. melanogaster*, с удвоенным в результате мутации гена *N-β-аланилдофаминсинтетазы (ebony)* уровнем ДА. Мы обнаружили, что эти мутации приводят к существенным изменениям в метаболизме ЮГ, причем эти изменения генетически детерминированы. Самки, лишённые ОА (*Tβh^{nM18}*), как молодые, так и интенсивно размножающиеся, имеют уровень деградации ЮГ значительно более высокий, чем самки линии-предшественницы и чем особи дикого типа (*Canton S*). В то же время, у молодых самок с удвоенным содержанием ДА (*ste*, *e*) деградация гормона значительно ниже, а у зрелых выше, чем у дикого типа (обзор Gruntenko and Rauschenbach, 2009). Суммируя, можно заключить, что ОА оказывает ингибирующее влияние на активность ферментов деградации ЮГ как у молодых, так и у половозрелых самок дрозофилы, а ДА ингибирует активность ферментов деградации ЮГ у молодых самок и стимулирует ее у зрелых.

Заметим, что такое же стадия-зависимое влияние ДА на метаболизм ЮГ у самок обнаружено Пастором с соавторами (Pastor et al., 1991): ДА стимулирует продукцию ЮГ в *С1* 2-суточных самок тараканов *Blattella germanica*, и ингибирует ее у 6-суточных. Онтогенетический характер регуляции уровня ЮГ дофамином был также продемонстрирован Грангер с

соавторами (Granger et al., 1996), показавшими, что ДА стимулирует синтез ЮГ в СА в первые два дня последней личиночной стадии табачного бражника *Manduca sexta*, но ингибирует его в начале предкуколичного периода.

Естественно возникает вопрос, каким может быть механизм такого разнонаправленного действия ДА на метаболизм ЮГ на разных стадиях развития, обнаруженного у насекомых из различных отрядов? Известно, что допаминэргические сигналы опосредуются через трансмембранные рецепторы. Семейство ДА рецепторов подразделяется на два больших подсемейства: Д1-подобные рецепторы (Д1 и Д5) и Д2-подобные рецепторы (Д2, Д3 и Д4) (обзор: Vallone et al., 2000). Показано, что Д1-подобные рецепторы связываются со стимулирующими G белками (Gas), вызывая активацию аденилатциклазы и запуск каскада, приводящего к изменению матричной активности хроматина. Д2-подобные рецепторы передают сигнал через ингибирующие G белки (Gai/o), вызывая ингибирование аденилатциклазы (обзоры: Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000). Д2-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*.

Изменение влияния ДА на активность ферментов деградации ЮГ с ингибирующего (у молодых самок дрозофилы) на стимулирующего (у половозрелых) и на уровень синтеза гормона со стимулирующего на ингибирующее позволило нам предположить наличие переключения на геномном уровне, приводящего к изменению состава и/или числа Д1- и Д2-подобных рецепторов в жировом теле (ЖТ) (месте синтеза ферментов деградации ЮГ) и *corpus allatum* (СА – железе, синтезирующей ЮГ) (обзор: Gruntenko and Rauschenbach, 2008). Учитывая, что синтез и деградация ЮГ у самок дрозофилы находятся в противофазе и под общим контролем (см. выше) можно допустить, что у молодых самок дрозофилы в ЖТ представлены, в основном, Д2-подобные рецепторы, а в СА – Д1-подобные рецепторы. При половом созревании, после того как ЮГ индуцирует синтез экдистероидов и начало вителлогенеза (обзоры: Raikhel et al., 2004; Simonet et al., 2004) происходит переключение и в ЖТ синтезируются Д1-подобные рецепторы, а в СА – Д2-подобные, что приводит к инвертированию влияния ДА на активность ферментов синтеза и деградации ЮГ. Такое переключение может, по-видимому, осуществлять 20Э, титр которого низок у молодых самок дрозофилы и повышается при половом созревании (Handler, 1982). Последнее предположение хорошо согласуется с данными Грангер с соавторами (Granger et al., 1996), показавшими, что эдистероиды вовлечены в регуляцию стадияспецифического ответа СА на ДА у личинок последнего возраста *Manduca sexta*.

В рамках этапа 4 настоящего проекта мы: (1) иммуногистохимически изучили экспрессию гена *DD2R* в яичниках половозрелых самок дикого типа *D. melanogaster* и (2) измерили уровень 20Э у трансгенных самок *D. melanogaster* с нормальной и сниженной экспрессией гена *DD2R* в железе, синтезирующей ЮГ. В качестве модели использовали трансгенную линию *D. melanogaster*, *UAS-ds-DD2R*, несущую генетическую конструкцию - антисмысловой супрессор гена *DD2R* (Drapet 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 получают особи, у которых супрессор гена *DD2R* активен только в клетках *CA*. Гибридов *Aug21-Gal4>w1118* использовали в качестве контроля.

1. Полногеномный анализ распределения сайтов связывания SF1 в различных тканях крысы в условиях *in vivo*, выявление общих и тканеспецифичных сайтов и генов-мишеней SF1.

Первой частью работ в выполнении задач данного этапа являлось получение материала иммунопреципитированного хроматина различных тканей (надпочечники, почка, печень) крыс линии Спрэг-Дуули для последующего создания библиотек системы SOLiD. Для проведения иммунопреципитаций и создания библиотек SOLiD был использован набор SOLiD ChIP-Seq Kit фирмы Applied Biosystems.

Животное декапитировали, печень отмывалась от крови перфузией через воротную вену печени. 50 мг. ткани печени, 50 мг. ткани почки, весь объём надпочечников (от 36 до 41 мг) гомогенизировали на льду максимально быстро в 300 мкл буфера TBS, 2 аликвоты по 150 мкл добавляли к 850 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 3 мин при 21000 g при 2°C. Из супернатанта отбиралось 50 мкл, не забирая верхний (содержащий жиры) и нижний слой (дебрис). Озвученный хроматин разводился 1:20 буфером для разведения. Магнитные шарики

Dynabeads инкубировались с соответствующими антителами (против SF1 – 6 мкл, против LRH– 4 мкл, мышиный IgG – 1 мкл) 1,5 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 доочищалась 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 двумя последовательными сорбциями на шариках AMPureXP, концентрации библиотек измерялись на флуориметре Q-Bit набором dsDNA HS assay kit. Концентрации полученных библиотек для системы SOLiD указаны в табл.1.

Таблица 1. Концентрации полученных библиотек

Надпочечники		Почка		Печень	
Библиотека	Конц. (нг/мкл)	Библиотека	Конц. (нг/мкл)	Библиотека	Конц. (нг/мкл)
Rabbit IgG	0.82	Rabbit IgG	0.99	Rabbit IgG	1.04
SF1	6.1	SF1	1.7	SF1	1.4
LRH	0.78	LRH	2.8	LRH	4.9
Input Cont	68	Input Cont	59	Input Cont	73

Окончательная оценка качества полученных библиотек делается на основе WorkFlow Analysis – единичного тестового лигирования на приборе SOLiD. 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.

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/ml. Исходное разведение библиотек было выбрано 0.5 pM, по результатам тестовых WFA для библиотек серии Rabbit_IgG, _Надп и _Печ выбрана концентрация матрицы 0.5 pM, для библиотек серии Input_Cont – 0.25 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 пипетированием при добавлении 0.75 объёма 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 обгащённых бидсов. Степень обогащения варьировала от 11% (библиотека Rabbit IgG почка) до 26% (библиотека Input Cont печень), оставаясь 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 одного из результатов e-PCR. К сожалению, две последовательные поломки прибора SOLiD в отчётный период (выход из строя термодатчика в ячейке 1 и элемента Пельтье в ячейке 2) потребовали существенных затрат времени на ремонт прибора и, соответственно, значительно сдвинули график выполнения проектов, в том числе данного. К настоящему моменту проведено 2 WFA, в которых проанализировано 8 результатов e-PCR. Количества полученных бидсов приведены в таблице 1, для всех приведённых библиотек качество полученных бидсов оказалось вполне удовлетворительным. В настоящее время осуществляется секвенирование 4 образцов - Rabbit IgG надпочечники, Input Cont надпочечники, SF1 Надпочечники, SF1 Почка.

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

Надпочечники		Почка		Печень	
Результат e-PCR	Кол-во бидсов,	Результат e-PCR	Кол-во бидсов	Результат e-PCR	Кол-во бидсов
Rabbit IgG	150 млн	Rabbit IgG	141 млн	Rabbit IgG	159 млн
SF1	231 млн	SF1	202 млн	SF1	-
LRH	-	LRH	-	LRH	-
Input Cont	209 млн	Input Cont	286 млн	Input Cont	336 млн

Для секвенирования каждый слайд SOLiD делился на 4 части, каждый образец наносился на 2 четверти одного слайда в объёме 65 млн бидсов на каждую четверть.

2. Определение уровня экспрессии ключевых генов симпато-адреналовой системы крысы в норме и при стрессе

Мы исследовали состояние симпато-адреналовой системы у крыс линии НИСАГ в сравнении с нормотензивными крысами инбредной линии WAG, выведенными, как и крысы НИСАГ, из аутбредной линии Wistar. Работу проводили на крысах-самцах в возрасте 1, 5, 4 и 7 мес в состоянии покоя. Стрессу мягкой водной депривации (17 час) подвергали крыс в возрасте 4 мес. Экспрессию гена *Th* оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени, сравнивая уровни содержания мРНК этого гена как между двумя линиями крыс, так и внутри линий – между опытом и контролем.

Эксперименты по определению возрастной динамики изменений экспрессии гена *Th* в органах, связанных с влиянием на артериальное давление, не выявили различий в базальном уровне мРНК *Th* в надпочечниках крыс WAG и НИСАГ в возрасте 1,5 и 4 месяца (Рис. 1 и 2), а в 7 месяцев мы наблюдали небольшое (на 23%), но достоверное снижение уровня мРНК *Th* в

надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG (Рис. 3). Действие стресса водной депривации хоть и выявило тенденцию к повышению экспрессии гена *Th* в этом органе у обеих линий крыс, но изменения не достигали статистически достоверного уровня (Рис. 4). Объяснение этому факту следует искать в особенностях строения надпочечников крыс НИСАГ.

В работе Бузуевой и сотр. (2006), посвященной возрастным особенностям структуры мозгового вещества надпочечника у крыс НИСАГ, выявлено накопление признаков функционального перенапряжения и активизации деструктивных процессов в

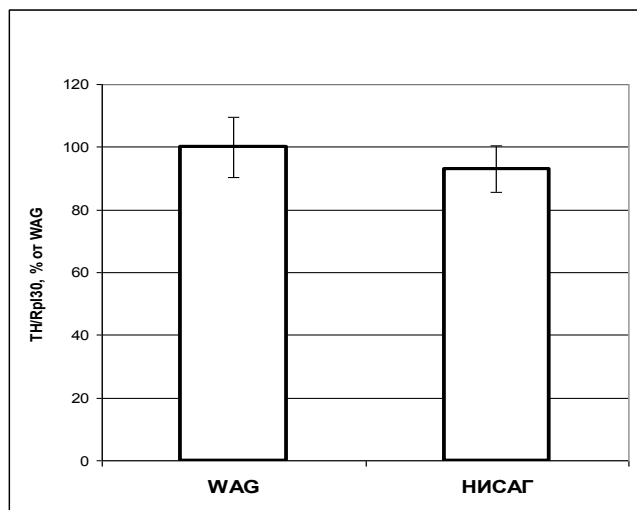


Рис. 1. Относительное содержание мРНК гена *Th* в надпочечниках крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 1,5 месяцев.

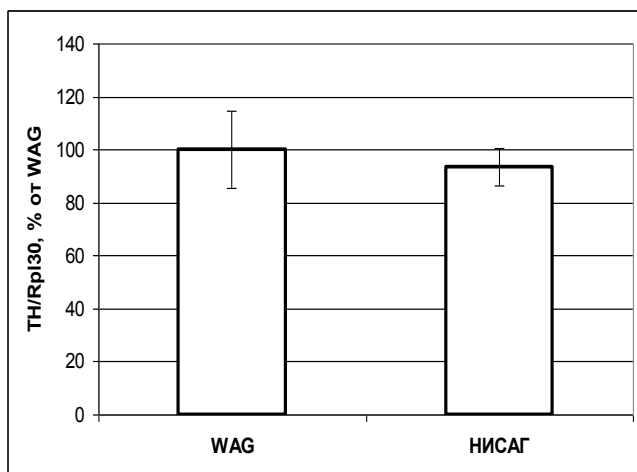


Рис. 2. Относительное содержание мРНК гена *Th* в надпочечниках крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 4 месяцев в состоянии покоя.

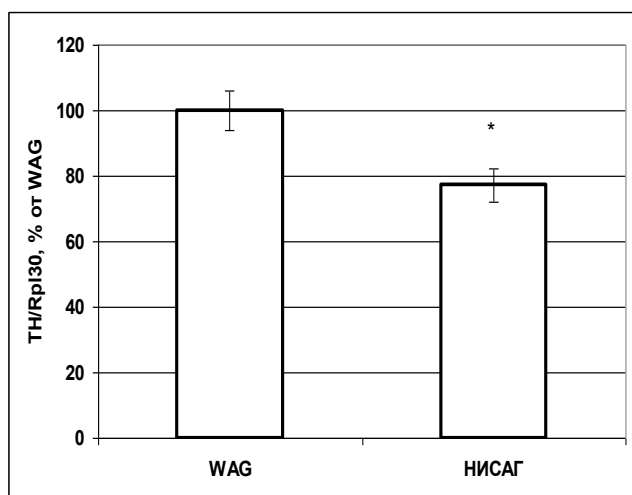


Рис. 3. Относительное содержание мРНК гена *Th* в надпочечниках крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 7 месяцев. * – достоверная разница ($p < 0,05$).

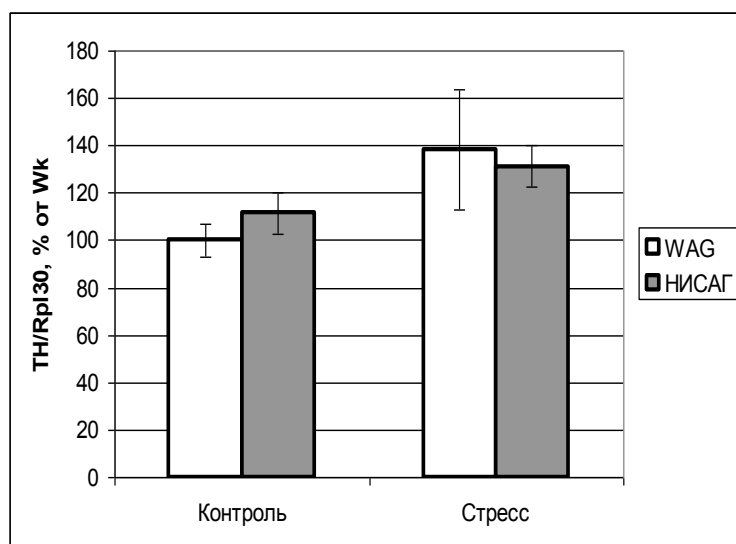


Рис. 4. Относительное содержание мРНК гена *Th* в надпочечниках крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 4 месяцев в состоянии покоя и при стрессе обезвоживания.

мозговом веществе у 12-месячных животных этой линии. Начало данному процессу может быть положено в более раннем возрасте, приводя к снижению содержания в этой ткани мРНК первого фермента цепочки биосинтеза катехоламинов. В этой же работе было показано, что хромаффинные клетки 3-недельных крысят НИСАГ содержали больше плотных хромаффинных гранул, накапливающих секрет, чем у контрольных животных Вистар, указывая на более высокую гормон-синтетическую активность. Но этот же факт может свидетельствовать о том, что выброс катехоламинов при стрессе не требует их усиленного синтеза *de novo*, ограничиваясь накопленным в гранулах запасом. У крыс следующего возраста (6 мес) повышенная секреторная активность мозгового вещества надпочечника обеспечивалась за счет гипертрофии этой ткани, а не усиления процессов биосинтеза на

единицу объема, поскольку относительный объем шероховатой эндоплазматической сети и численная плотность свободных рибосом были на уровне контрольных значений. Как отмечено в недавней работе Антонова и др. (2010), «мы имеем практически законченную картину гипертрофии железы, в результате которой «интенсивность функционирования структур», то есть «количество функции» на единицу массы органа у сравниваемых линий одинаково, однако общая продукция гормонов повышается за счет увеличения массы ткани, секретирующей гормон».

Нельзя не отметить и тот факт, что регуляция экспрессии гена *Th* может происходить как на уровне синтеза мРНК *de novo* или ее стабильности, так и на посттранскрипционном уровне. На долговременном уровне активность ТН может регулироваться модуляцией транскрипции, стабильностью РНК, альтернативным сплайсингом РНК (у приматов), трансляционной активностью и стабильностью фермента (Kvetnansky et al., 2009). Поэтому уровень содержания мРНК может не отражать уровня биосинтеза катехоламинов у экспериментальных животных.

Возрастную динамику экспрессии гена *Th* в мозге изучали в отделах, связанных с регуляцией артериального давления, то есть в гипоталамусе и продолговатом мозге. У молодых крыс НИСАГ уровень мРНК *Th* оказался значительно (втрое) повышен по сравнению с крысами WAG в гипоталамусе (Рис. 5), но не в продолговатом мозге (Рис. 6).

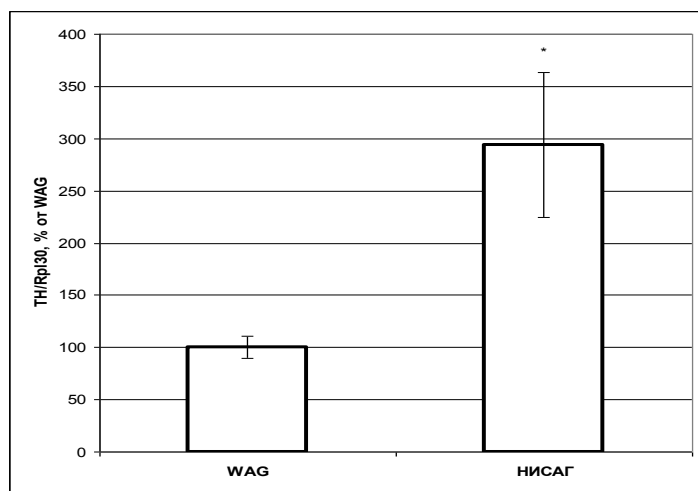


Рис. 5. Относительное содержание мРНК гена *Th* в гипоталамусе крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 1,5 месяцев. * – достоверная разница ($p < 0,05$).

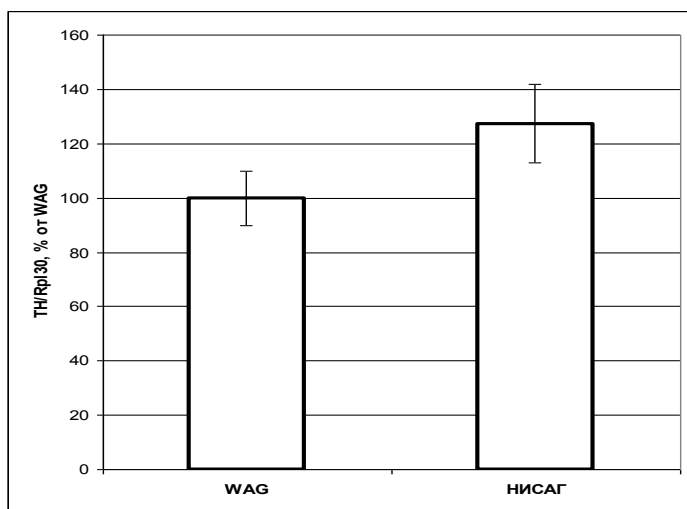


Рис. 6. Относительное содержание мРНК гена *Th* в продолговатом мозге крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 1,5 месяцев.

К возрасту 4 мес паттерн экспрессии изменился, и повышенный вдвое уровень мРНК *Th* мы наблюдали в продолговатом мозге (Рис. 7), но не в гипоталамусе (Рис. 8). Однако стресс водной депривации вызвал повышение содержания мРНК *Th* в гипоталамусе крыс НИСАГ втрое, в то время как у крыс WAG оно вообще не изменилось (Рис.8). Это наблюдение еще раз подтверждает повышенную реактивность симпатической

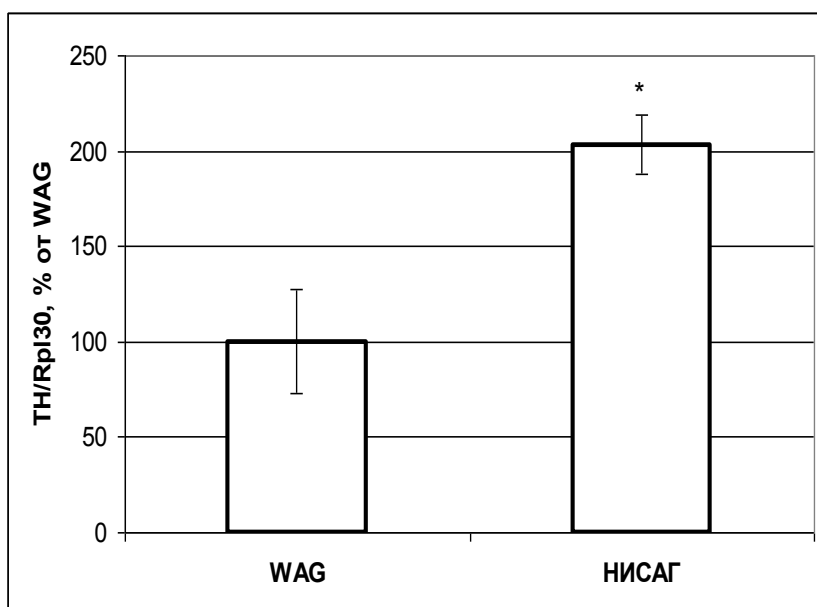


Рис. 7. Относительное содержание мРНК гена *Th* в продолговатом мозге крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 4 месяцев. * – достоверная разница ($p < 0,05$).

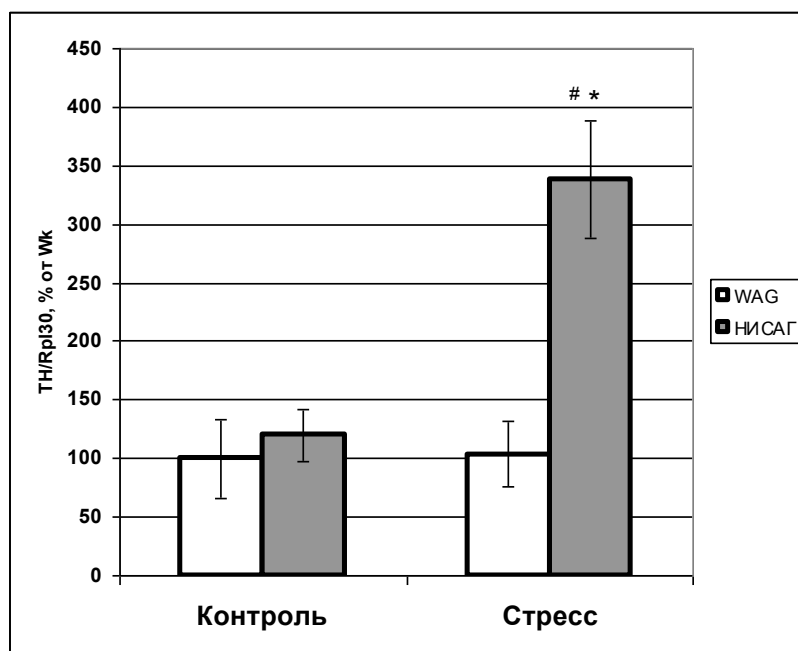


Рис. 8. Относительное содержание мРНК гена *Th* в гипоталамусе крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 4 месяцев в покое и при стрессе обезвоживания. * – достоверное различие между линиями ($p < 0,005$), # – различие между контролем и опытом ($p < 0,005$).

нервной системы крыс НИСАГ, в том числе и на такие воздействия, которые не оказывают влияния на крыс нормотензивной контрольной линии. При этом практически отсутствующая в надпочечниках реакция на лишение воды у крыс обеих линий согласуется с мнением о стресс-специфичности ответов разных звеньев симпато-адреналовой системы и с тем, что симпато-нейральная система, по крайней мере в отношении ТН, регулируется независимо от медуллы НП (Kvetnansky et al., 2009).

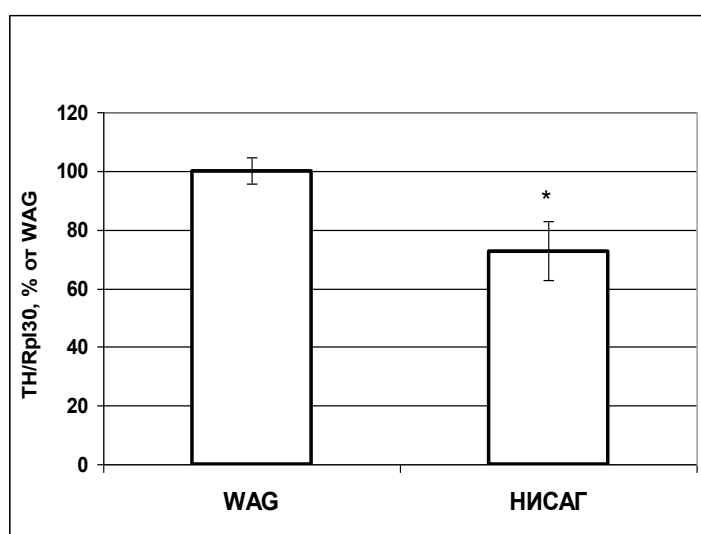


Рис. 9. Относительное содержание мРНК гена *Th* в продолговатом мозге крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 7 месяцев. * – достоверное различие между линиями ($p < 0,05$).

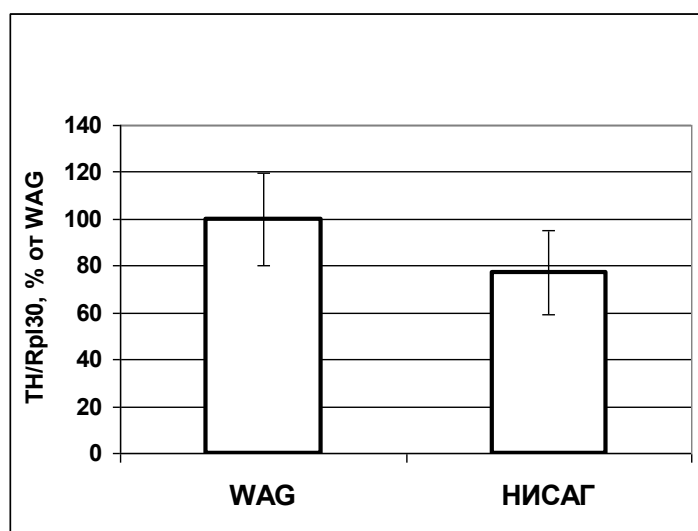


Рис. 10. Относительное содержание мРНК гена *Th* в гипоталамусе крыс линий WAG и НИСАГ в возрасте 7 месяцев.

К возрасту 7 мес содержание мРНК ТН в мозговых структурах крыс НИСАГ, как и в надпочечниках, оказывается даже ниже, чем у крыс WAG (Рис. 9 и 10). Вероятно, тут также можно говорить о более раннем истощении системы биосинтеза катехоламинов, работавшей с хронической перегрузкой.

Общий образ изменений нейроэндокринного профиля крыс НИСАГ отличается от широко распространенной линии SHR. У обеих линий наблюдается значительное повышение адреномедулярной активности (по SHR, см. Korner et al. 1993, O'Connor et al. 1999, Reja et al. 2002, Kuo et al. 2004). Однако следует отметить некоторые расхождения. Moura et al. (2005) показал, что, в противоположность повышенному содержанию норэпинефрина как в плазме, так и в стенке хвостовой артерии, которое соответствует более высокой периферической симпатической активности, базальная активность ТН и содержание катехоламинов в НП у SHR заметно понижены до, во время и после формирования гипертонии. У крыс НИСАГ выявлено повышенное по сравнению с контрольной линией крыс содержание эпинефрина в НП (Маркель и др., 2006; Markel et al., 2007). Согласно полученным нами данным, экспрессия гена *Th* в надпочечниках во время формирования гипертензивного статуса у крыс НИСАГ не отличается от ее уровня у контрольных животных.

3. Изучение влияния гепатоканцерогенов на экспрессию генов, продукты которых связаны с контролем пролиферации, в печени экспериментальных животных

Работа выполнена на 12-суточных самцах и самках мышей линии GR разведения вивария ИЦиГ СО РАН. Все манипуляции с ними проводили в соответствии с международными правилами работы с животными [86/609/ЕЕС]. Азосоединения растворяли в оливковом масле

и вводили мышам однократно внутривенно: 3'МеДАБ («Koch-Light», Англия) в дозе 250 мг/кг, ОАТ («ICN», США) - 225 мг/кг. Контрольным животным вводили растворитель.

Через год после введения ОАТ 12-ти дневным мышам GR опухоли печени развились у 100% самок, и у 80% самцов (у 12 из 15). После введения 3'МеДАБ опухоли печени обнаружены в 100% случаев и у самцов, и у самок (Табл. 3). Количество узелков в печени у самок преобладало в ответ на 3'МеДАБ, а не ОАТ. Таким образом, неканцерогенный для взрослых мышей 3'МеДАБ в сравнении с известным гепатоканцерогеном ОАТ оказывал выраженный опухолеиндуцирующий эффект при обработке 12-ти дневных мышей GR.

Мы показали, что ОАТ в печени 12-ти дневных мышей GR значительно снижал ДНК-связывающую активность FOXA, по результатам денситометрии - в 2,8 раза. Однако оказалось, что 3'МеДАБ, гепатоканцерогенный для этих мышей, тем не менее, практически не снижал ДНК-связывающую активность FOXA.

Изменения глюкокортикоидной индукции ТАТ (Табл. 4) напрямую отражали изменения активности FOXA белков, что согласуется с данными, что FOXA белки определяют амплитуду глюкокортикоидной индукции ТАТ [Roux J. *at al.*, 1995]. ОАТ снижал уровень глюкокортикоидной индукции ТАТ на 40-42%. 3'МеДАБ абсолютно не влиял на уровень глюкокортикоидной индукции ТАТ у самок и незначительно ингибировал ТАТ у самцов (Табл. 4).

Таблица 3. Частота возникновения опухолей печени у мышей GR после однократного введения азосоединений ОАТ и 3'МеДАБ в возрасте 12-ти суток

	масло		3'МеДАБ		ОАТ	
	Самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Частота возникновения опухолей печени	-	-	100% (6)	100% (5)	80% (15)	100% (6)
Кол-во узелков в печени на мышь	-	-	4,7±2,4	13,6±4,8	3,6±0,8	5,7±1,4
Из них размером более 2 мм	-	-	2,2±0,7	2,4±1,2	1,7±0,7	-

В последнее время при поиске причин возникновения многих заболеваний человека большое внимание исследователей уделяется факторам транскрипции. Известно около 270 заболеваний и синдромов непосредственно связанных с дисфункцией 164 транскрипционных факторов (Vaquerizas J.M., *et al.*, 2009). Для ряда факторов показана их ключевая роль в канцерогенезе. Например, наличие дополнительного аллеля C/EBPα обеспечивает двукратное снижение чувствительности к канцерогенам (Tan E.H., *et al.* 2005). А трансфекция малигнизированных клеток плазмидой, обеспечивающей высокий уровень экспрессии C/EBPα, приводит к снижению пролиферации и запуску процессов апоптоза. Экспрессия другого фактора HNF4α последовательно снижается в ходе гепатоканцерогенеза (Ning B.F., *et al.*, 2010), при этом восстановление экспрессии приводит к антионкогенному эффекту.

Таблица 4. Влияние ОАТ и 3'-МеДАБ на глюкокортикоидную индукцию тирозинаминотрансферазы (ТАТ) в печени 12-ти дневных самок и самцов мышей GR

	самцы	самки
Базальный уровень	15,8±5 (3)	15,4±3,4 (3)
Глюкокортикоидная индукция	137,5±2,9 (6)	127±5,3 (4)
Индукция + ОАТ	80,7±11,2 (5) **	77±6,6 (4) **
Индукция + 3'-МеДАБ	121,5±3,9 (6)	127±5,3 (4)

Роль факторов FOXA в канцерогенном процессе, по-видимому, неоднозначна и требует дальнейших исследований. Вероятно, FOXA белки не являются ключевыми транскрипционными факторами, запускающими процесс перерождения клетки, однако это не исключает наличия среди их мишеней антионкогенов. Например, известно, что нарушение экспрессии FoxA2 приводит к существенному снижению наработки ряда других печень-специфичных факторов транскрипции, обладающих опухолесупрессорными свойствами, например, HNF4a.

4. Иммуногистохимическая оценка содержания и локализации Д2-подобных рецепторов в яичниках дрозофилы – месте синтеза 20-гидроксиэкдизона

Ранее нами было установлено, что гормоны стресса дрозофилы (ювенильный гормон - ЮГ, 20-гидроксиэкдизон - 20Э и дофамин - ДА) взаимодействуют между собой. Мы показали, что (рис. 11):

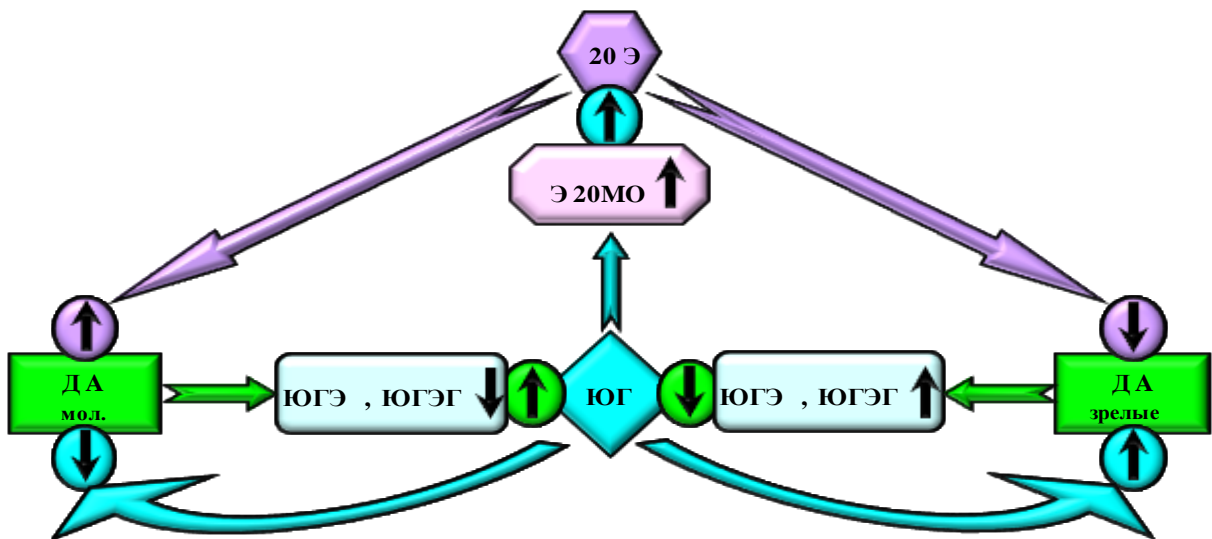


Рис. 11. Схема взаиморегуляции гонадотропинов (ЮГ и 20Э) и дофамина (ДА) у дрозофилы. Обозначения: ЮГЭ – ЮГ-эстераза, ЮГЭГ – ЮГ-эпоксидгидролаза (ферменты, деградирующие ЮГ); Э20МО – экдизон-20-монооксигеназа (фермент, конвертирующий прогормон экдизон в функционально активный 20Э); мол. – молодые.

- а) ДА регулирует титр ЮГ, ингибируя активность ферментов деградации (ЮГ-эстеразы и ЮГ-эпоксидгидролазы) и стимулируя синтез гормона у молодых самок и стимулируя деградацию и ингибируя синтез ЮГ - у половозрелых;
- б) в этой регуляции существует обратная связь - повышение титра ЮГ вызывает снижение уровня ДА у молодых самок и повышение у зрелых;
- в) 20Э регулирует титр ЮГ опосредованно через систему метаболизма ДА – увеличение титра 20Э повышает уровень ДА у молодых самок и снижает его у половозрелых, тем самым вызывая повышение титра ЮГ у тех и других;
- г) ЮГ регулирует титр 20Э, изменяя активность фермента его синтеза, экдизон-20-монооксигеназы;
- д) ДА влияет на уровень 20Э, опосредованно через систему метаболизма ЮГ.

Последнее заключение было сделано, поскольку обратная связь в регуляции уровня ДА 20-гидроксиэкдизоном не выявлена: повышение уровня ДА вызывает повышение титра 20Э у молодых самок (при наличии обратной связи он должен снижаться) и снижение титра 20Э у половозрелых (при наличии обратной связи он должен повышаться) (Rauschenbach et al., 2007b). Если это заключение несправедливо и ДА регулирует титр 20Э непосредственно, в фолликулярных клетках яичников (месте синтеза 20Э у насекомых) половозрелых самок должна быть высока экспрессия Д2-подобных рецепторов. В рамках этапа 3 настоящего проекта мы осуществили иммуногистохимический анализ яичников молодых самок *D. melanogaster* и не обнаружили в них продукта гена DD2R. Однако это не исключало возможности экспрессии гена *DD2R* в яичниках половозрелых мух. Для того чтобы это проверить, мы осуществили иммуногистохимический анализ яичников половозрелых самок

линии *Canton S D. melanogaster* с использованием кроличьих поликлональных антител против DD2R. Результаты представлены на рис 12.

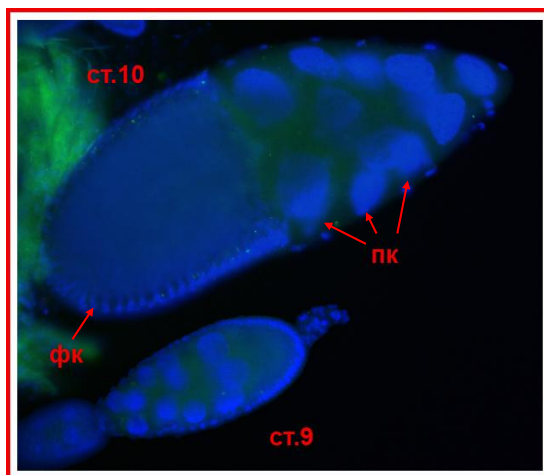


Рис. 12. Иммуногистохимическое окрашивание яйцевых камер стадий 9 (СТ.9) и 10 (СТ.10) 5-суточных самок *D. melanogaster* линии *Canton S* с использованием антител против DD2R. Стрелками показаны ядра питающих (ПК) и фолликулярных (ФК) клеток.

Ясно видно, что в фолликулярных клетках яйцевых камер (месте синтеза 20Э) половозрелых (5-суточных) самок дрозофилы Д2-подобные рецепторы отсутствуют. Таким образом, мы можем заключить, что ДА, действительно, регулирует уровень 20Э опосредованно через систему метаболизма ЮГ. Еще одно подтверждение этому заключению мы получили, измерив уровень 20Э у самок со сниженным числом DD2R в железе, синтезирующей ЮГ.

5. Измерение титра 20-гидроксиэкдизона у самок дрозофилы со сниженной посредством РНК-интерференции экспрессией гена DD2R в железе, синтезирующей ювенильный гормон.

Мы использовали трансгенную линию *D. melanogaster*, *UAS-ds-DD2R*, несущую генетическую конструкцию - антисмысловой супрессор гена Д2-подобного рецептора *D. melanogaster* (*DD2R*) (Draper et al., 2007). Для того, чтобы снизить число Д2-подобных рецепторов только в железе, синтезирующей ЮГ, мы использовали линию *D. melanogaster*, несущую генетическую конструкцию с драйвером *Aug21-Gal4*, экспрессирующимся специфически в *CA*. При скрещивании этих линий в поколении F1 получают особи, у которых супрессор гена *DDR2* активен только в клетках *CA* (Gruntenko et al., 2010) и в них снижено число DD2R (рис. 13).

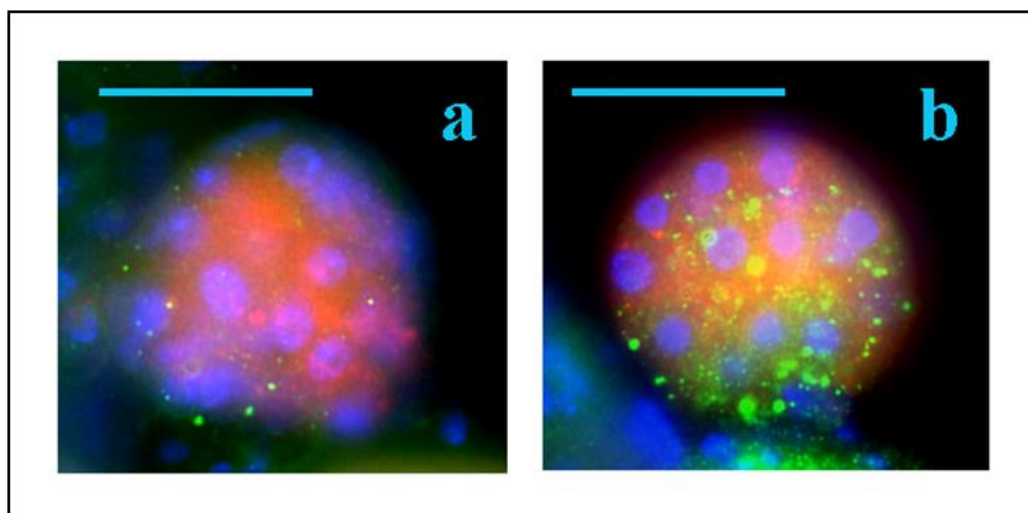


Рис. 13. Иммуногистохимическое окрашивание corpus allatum 5-суточных самок *D. melanogaster* *Aug21>;UAS-ds-DD2R;UAS-RFP* (a) с активным супрессором гена *DD2R* в СА и контрольных *Aug21>;w1118;UAS-RFP* (b) с использованием антител против *DD2R* (зеленый сигнал).

В рамках этапов 2 и 3 настоящего проекта мы показали, что у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R* повышена активность щелочной фосфатазы (ЩФ – фермента, регулирующего пул дофамина) и снижены активность тирозиндекарбоксилазы (ТДК – фермента, лимитирующего скорость синтеза октопамина), и уровень деградации ЮГ, по сравнению с контрольными особями (*Aug21>;w1118*).

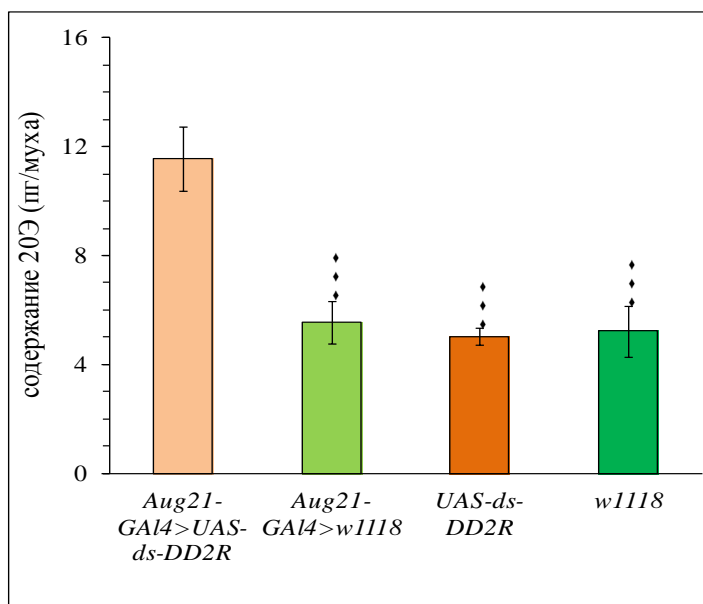


Рис. 14. Содержание 20-гидроксиэктизона (20Э) у 5-суточных самок *D. melanogaster* *Aug21>;UAS-ds-DD2R* со сниженным числом *DD2R* в СА, контрольных самок *Aug21>;w1118* и самок родительских линий *UAS-ds-DD2R* и *w1118*. ♦ – достоверность отличий от самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R*

Это свидетельствует, как мы показали ранее (Rauschenbach et al., 2007a; Bogomolova et al., 2009; Gruntenko et al., 2010) о повышении продукции ЮГ.

На настоящем этапе исследований мы измерили у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R* с повышенным титром ЮГ и контрольных мух (*Aug21>;w1118*) уровень 20-гидроксиэкдизона. Результаты показаны на рис. 14.

Ясно, что уровень 20Э у самок *Aug21>;UAS-ds-DD2R* со сниженным числом DD2R в железе, синтезирующей ЮГ, вдвое превышает уровень гормона у самок всех контрольных групп (*Aug21>;w1118*, *UAS-ds-DD2R* и *w1118*). Контрольные группы по этому параметру не различаются. Таким образом, мы полностью подтвердили нашу гипотезу о том, что дофамин регулирует уровень 20Э опосредованно через систему метаболизма ЮГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работ, проведенных на 4-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 тканей печени, почки и надпочечников самцов крыс шестимесячного возраста с использованием антител против транскрипционных факторов SF1 и LRH, а так же контрольных – IgG кролика. Из данного материала получены специфические библиотеки для системы SOLiD. Качество полученного материала проверено тестовым лигированием – «WFA» на системе SOLiD.
2. В тканях 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 ключевого гена биосинтеза катехоламинов тирозин-гидроксилазы (TH). Мы не выявили различий в базальном уровне мРНК *Th* в надпочечниках крыс WAG и НИСАГ в возрасте 1,5 и 4 месяца, а в 7 месяцев мы наблюдали небольшое (на 23%), но достоверное снижение уровня мРНК *Th* в надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с крысами WAG. Повышение экспрессии гена *Th* в этом органе у обеих линий крыс при стрессе водной депривации не достигало статистически достоверного уровня. В гипоталамусе, но не в продолговатом мозге у молодых крыс НИСАГ уровень мРНК *Th* оказался втрое повышен по сравнению с таковым у крыс WAG. К возрасту 4 мес повышенный вдвое уровень мРНК *Th* мы наблюдали в продолговатом мозге крыс НИСАГ, но не в гипоталамусе. Однако стресс водной депривации вызвал повышение содержания мРНК *Th* в гипоталамусе крыс НИСАГ втрое, в то время как у крыс WAG оно вообще не изменилось. Это наблюдение подтверждает повышенную реактивность симпатической нервной системы крыс НИСАГ. К возрасту 7 мес содержание мРНК *Th* в мозговых структурах крыс НИСАГ, как и в надпочечниках, оказывается даже ниже, чем у крыс WAG. 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.
3. Изучалась связь между гепатоканцерогенностью азосоединений ОАТ и 3'-МеДАБ для мышей линии GR и одним из ранних событий воздействия этих факторов – их влиянием на ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора FoxA. При введении мышам однократно в возрасте 12 дней 3'-МеДАБ вызывал опухоли печени у самцов и самок в 100% случаев, наравне с известным мышинным гепатоканцерогеном ОАТ. При этом ОАТ снижал ДНК-связывающую активность FOXA в печени в 2,5-3 раза и, как следствие, снижал на 40% уровень глюкокортикоидной индукции печень-специфического гена TAT. В отличие от этого,

3'МеДАБ не изменял ни активность FOXA белков, ни степень глюкокортикоидной индукции TAT.

4. В отчетный период осуществлен иммуногистохимический анализ яичников половозрелых самок *D. melanogaster* с использованием кроличьих антител против рецептора дофамина 2R (DD2R) и измерен титр 20-гидроксиэкдизона (20Э) у самок дрозофилы со сниженной экспрессией гена DD2R в железе, синтезирующей ювенильный гормон. Впервые продемонстрировано, что в фолликулярных клетках яичников (месте синтеза 20Э) половозрелых самок дрозофилы отсутствуют Д2-подобные рецепторы. Впервые показано, что у самок дрозофилы с повышенным в результате снижения числа DD2R в *corpus allatum* титром ЮГ, уровень 20Э резко повышен. Таким образом подтверждено, что дофамин регулирует уровень 20Э опосредованно, через систему метаболизма ЮГ.

Таким образом, все задачи, поставленные на данном этапе решены. По результатам работы за период четвертого этапа было опубликовано три статьи в ведущих российских и зарубежных журналах (всего за время выполнения проекта были опубликованы 11 статей, из них 5 – в ведущих зарубежных журналах). В исследованиях активное участие принимали молодые ученые, в том числе аспиранты и студенты старших курсов. Полученные результаты уже используются в учебном процессе (курсах молекулярной биологии, компьютерной геномики; спецкурсах «Основные молекулярно-генетические процессы», «Новейшие молекулярно-генетические технологии»). За период четвертого этапа защищена одна кандидатская диссертация (всего за время выполнения проекта – 5 кандидатских диссертаций) и утверждена тема докторской диссертации.

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. 68-75.
2. Бузуева И.И., Филюшина Е.Е., Шмерлинг М.Д., Маркель А.Л., Якобсон Г.С. Возрастные особенности структурной организации мозгового вещества надпочечника у крыс гипертензивной линии НИСАГ. Бюлл. exper. биол. мед. 2006. 142. 604-606.
3. Маркель А.Л., Дымшиц Г.М., Шмерлинг М.Д., Якобсон Г.С. Гены, стресс, гипертония. Бюллетень СО РАМН. 2002. 2. 35-40.
4. 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. exper. биол. и мед. 2006. 141. 3. 244-247.
5. 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. 1423-1432.
6. Bogomolova E.V., Adonyeva N.V., Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Yu. Effects of 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone on octopamine metabolism in females of *Drosophila*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2009. 70. 244-253.
7. Bownes M. The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. J. Insect Physiol. 1989. 35. 409-413.
8. Chrousos P., Gold P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA. 1992. 267. 1244-1252.
9. 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.
10. Goldstein D.S. Stress, catecholamines and cardiovascular disease. Oxford University Press, New York 1993.
11. Goldstein D.S. 2001. The autonomic nervous system in health and disease. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.

12. Goldstein D.S., McEwen B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 2002. 5. 55–58.
13. Goldstein D.S., Kopin I.J. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007. 10. 109 - 120.
14. Granger N.A., Sturgis S.L., Ebersohl R., Geng C., Sparks T.C. Dopaminergic control of *corpora allata* activity in the larval tobacco hornworm, *Manduca sexta* *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1996. 32. 449-466.
15. 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*^{56f}. *Insect Mol. Biol.* 2003. 12. 353-363.
16. 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. 902-908.
17. Gruntenko N., Rauschenbach I. 20-hydroxyecdysone, Juvenile Hormone and Biogenic Amines: Mechanisms of Interaction in Control of *Drosophila* Reproduction under Normal and Stressful Conditions In: *Ecdysone, structure and function* (ed. G. Smagghe). Springer Science + Business Media B.V. 2009. 317-334
18. Gruntenko N.E., Wen D., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Liu Y., He Q., Faddeeva N.V., Fomin A.S., Li S., Rauschenbach I.Yu. Altered juvenile hormone metabolism, reproduction and stress response in *Drosophila* adults with genetic ablation of the corpus allatum cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2010. 40. 891-897.
19. Handler A.M. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 1982. 93. 73-82.
20. 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.
21. Hirashima A., Raushenbach I.Yu., Sukhanova M. Jh. Ecdysteroids in stress responsive and nonresponsive *Drosophila virilis* lines under stress conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2000. 64. 2657-2662.
22. Hirashima A., Suetsugu E., Hirokado S., Kuwano E., Taniguchi E., Eto M. Effect of octopamine on the activity of juvenile-hormone esterase in the silkworm

- Bombyx mori* and the red flour beetle *Tribolium freemani*. Gen. Comp. Endocrinol. 1999. 116. 373-381.
23. Kaatz H., Eichmuller S, Kreissl S. Stimulatory effect of octopamine on juvenile hormone biosynthesis in honey bees (*Apis mellifera*): physiological and immunocytochemical evidence. J. Insect Physiol. 1994. 40. 856-872.
 24. Korner P., Bobik A., Oddie C., Friberg P. Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. Hypertension. 1993. 22. 243–252.
 25. Kuo T.B.J., Lai C.J., Shaw F.-Z., Lai C.-W., Yang C.C.H. Sleep-related sympathovagal imbalance in SHR. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2004. 286. 1170–1176.
 26. Kvetnansky R., Sun C.L., Lake C.R., Thoa N., Torda T., Kopin I.J. Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. Endocrinology. 1978. 103. 1868-1874.
 27. Kvetnansky R., Sabban E.L., Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. Physiol Rev. 2009. 89. 535-606.
 28. Lafon-Cazal M., Baehr J.C. Octopaminergic control of *corpora allata* activity in an insect Experientia. 1988. 44. 895-896.
 29. McEwen B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. N. Engl. J. Med. 1998. 338. 171-179.
 30. 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.
 31. Mathias C.J. Role of sympathetic efferent nerves in blood pressure regulation and in hypertension. Hypertension. 1991. 18. 22-30.
 32. Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M., Caron M. G. Dopamine receptors: from structure to function Physiol. Rev. 1998. 78. 189-225.
 33. Moura E., Costa P., Moura D., Guimaraes S., Vieira-Coelho M.A. Decreased tyrosine hydroxylase activity in the adrenals of spontaneously hypertensive rats. Life Sci. 2005. 76. 2953–2964.
 34. Nankova B.B., Tank A.W., Sabban E.L. Transient or sustained transcriptional activation of the genes encoding rat adrenomedullary catecholamine biosynthetic enzymes by different durations of immobilization stress. Neuroscience. 1999. 94. 803-808.

35. Ning B.F., Ding J., Yin C., Zhong W., Wu. K., Zeng. X., Yang W., Chen Y.X., Zhang J.P., Zhang X., Wang H.Y., Xie W.F. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2010. 70. 7640-7651.
36. O'Connor D.T., Takiyyuddin M.A., Printz M.P., Dinh T.Q., Barbosa J.A., Rozansky D.J., Mahata S.K., Wu H., Kennedy B.P., Ziegler M.G., Wright F.A., Schlager G., Parmer R.J. Catecholamine storage vesicle protein expression in genetic hypertension. *Blood Press.* 1999. 8. 285-295.
37. Pastor D., Piulachs M.D., Cassier P., Andre M., Belles X. *In vivo* and *in vitro* study of the action of dopamine on oocyte growth and juvenile hormone production in *Blattella germanica* C. R Acad. Sci. III. 1991. 313. 207-212.
38. Postlethwait J.H., Parker J. Regulation of vitellogenesis in *Drosophila* Molecular biology of invertebrate development. Eds O'Connor J. D., Alan R. New York: Liss Inc. 1987. 29-42.
39. Rachinsky A. Octopamine and serotonin influence on *corpora allata* activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Insect Physiol.* 1994. 40. 549-554.
40. Rapp J.P. Genetic analysis of inherited hypertension in the Rat. *Physiol. Rev.* 2000. 80. 135-172.
41. Rassler B. The renin-angiotensin system in the development of salt-sensitive hypertension in animal models and humans. *Pharmaceuticals.* 2010. 3. 940-960.
42. Rauschenbach I.Yu., Bogomolova E.V., Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Chentsova N.A. Effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on alkaline phosphatase activity in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *J. Insect Physiol.* 2007a. 53. 587-591.
43. Rauschenbach I.Yu., Chentsova N.A., Alekseev A.A., Gruntenko N.E., Adonyeva N.V., Karpova E.K., Komarova T.N., Vasiliev V.G., Bownes M. Dopamine and octopamine regulate 20-hydroxyecdysone level in vivo in *Drosophila*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2007b. 65, 95-102.
44. Rauschenbach I.Y., Khlebodarova T.M., Chentsova N.A., Gruntenko N.E., Grenback L.G., Yantsen E.I., Filipenko M.L. Metabolism of the juvenile hormone in *Drosophila* adults under normal conditions and heat stress. *J. Insect Physiol.* 1995. 41. 179-189.
45. Reja V., Goodchild A.K., Pilowsky P.M. Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR. *Hypertension.* 2002. 40. 342-347.

46. Richard D.S., Jones J.M., Barbarito M.R., Cerula S., Detweiler J.P., Fisher S.J., Brannigan D.M., Scheswohl D.M. Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: further evidence for the relative roles of ecdisteroids and juvenile hormones. *J. Insect Physiol.* 2001. 47. 905-913.
47. Roskopf D., Schürks M., Rimmbach C., Schäfers R. Genetics of arterial hypertension and hypotension. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2007. 374. 429–469.
48. Roux J., Pictet R., Grange T. Hepatocyte nuclear factor 3 determines the amplitude of the glucocorticoid response of the rat tyrosine aminotransferase gene. *DNA Cell Biol.* 1995. 14. 385-96.
49. Sabban E.L. Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene expression. *Endocrine Regulations.* 2007. 41. 61–73.
50. Sabban E.L., Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001. 24. 91-98.
51. Selye H. *The stress of life.* McGraw Hill, New York 1975.
52. Simonet G., Poels J., Claeys I., Van Loy T., Franssens V., De Loof A., Vanden Broeck J. Neuroendocrinological and molecular aspects of Insect reproduction. *J. Neuroendocrinol.* 2004. 16. 649-659.
53. Soller M., Bownes M., Kubli E. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.* 1999. 208, 337-351.
54. Tan E.H., Hooi S.C., Laban M., Wong E., Ponniah S., Wee A., Wang N.D. CCAAT/enhancer binding protein alpha knock-in mice exhibit early liver glycogen storage and reduced susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005. 65. 10330-10337.
55. Woodring J, Hoffmann KH. The effects of octopamine, dopamine and serotonin on juvenile hormone synthesis, in vitro, in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 1994. 40. 797-802.
56. Vallone D., Picetti R., Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000. 24. 125-132.
57. Vaquerizas J.M., Kummerfeld S.K., Teichmann S.A., Luscombe N.M. A census of human transcription factors: function, expression and evolution *Nat. Rev. Genet.* 2009. 10. 252-63.