

Московский педагогический государственный университет
Биолого-химический факультет
Кафедра биоорганической химии и биотехнологии

Воздействие нейропептидов семакс и
RGR на содержание транскриптов гена
Cplx2 в головном мозге крыс в условиях
экспериментальной ишемии

Работу выполнила Куриченкова Екатерина Олеговна,
6 курс заочного отделения.

Научные руководители: д.б.н., профессор Кутузова Н.М.,
к.б.н., н.с. Отдела молекулярных основ генетики человека ИМГ РАН
Ставчанский В.В.

ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ

Ишемический инсульт является повреждающим фактором, нарушающим функционирование мозга и заметно влияющим на экспрессию генов в головном мозге. Нарушения при ишемическом инсульте провоцируются резким ухудшением мозгового кровотока, влекущим за собой:

1. кислородную и глюкозную недостаточность,
2. как следствие (1) – нарушение протекания ОВР в клетке и падение уровня АТФ,
3. как следствие (2) – нарушение работы ионных каналов,
4. изменение внутриклеточной среды,
5. изменения на уровне повреждённых тканей,
6. гибель нейронов.

Поиск новых подходов для лечения ишемии остаётся актуальной проблемой.

Глутамат-кальциевый каскад

Ключевой механизм развития ишемического повреждения – глутамат-кальциевый каскад, в ходе которого нарушается функционирование ионных каналов, происходит массивный приток Na^+ и Ca^{2+} в клетку, а из клетки высвобождаются возбуждающие аминокислоты, в первую очередь глутаминовая. Под её влиянием ионы кальция, продолжая прибывать извне, высвобождаются и из внутриклеточных депо. Это, во-первых, усиливает экзоцитоз, в том числе глутамата, а во-вторых, активирует (через связывание кальция с кальмодулином) гидролитические ферменты, разрушающие компоненты клетки.

КОМПЛЕКСИНЫ

Комплексины относятся к числу цитозольных белков, специфичных для нервной ткани и *регулирующих процесс экзоцитоза* путём взаимодействия с белковым комплексом SNARE, обеспечивающим высвобождение синаптических пузырьков в синаптическую щель. В связи с этим комплексины интересны как возможные участники процессов глутамат-кальциевого каскада.

Альтернативные транскрипты гена *Cplx2*

У крыс обнаружено два варианта транскриптов гена *Cplx2* – *Cplx2_v1* и *Cplx2_v2*, различающиеся 5'-концевыми участками (ген имеет альтернативные промоторы). Ген *Cplx2* человека также имеет два варианта транскриптов, обладающих высоким сходством с соответствующими транскриптами крыс. Факторы, определяющие транскрипцию по тому или иному пути, до конца не выяснены.

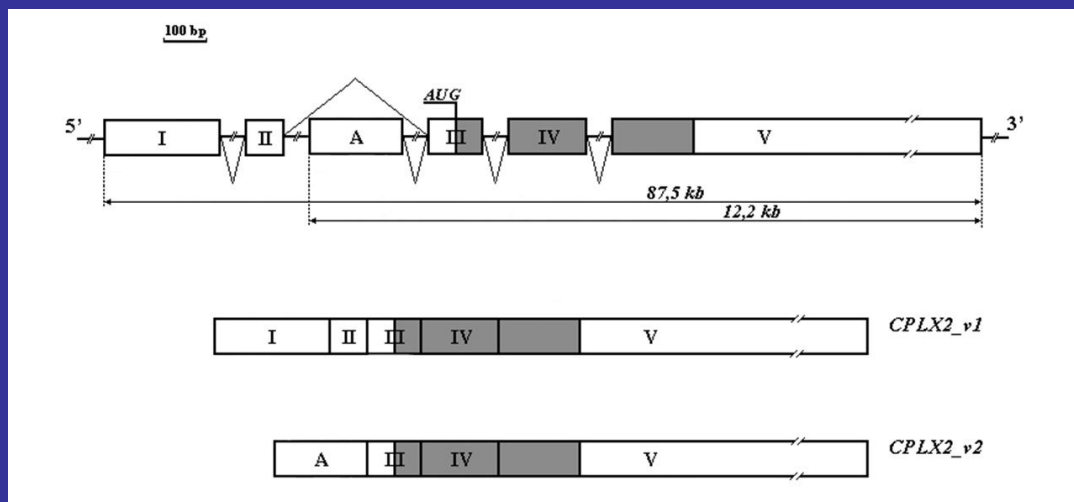


Рис. Структурная организация гена *Cplx2* человека

СЕМАКС И PGP

Семакс – нейропротекторный препарат, относящийся к числу регуляторных пептидов (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro). N-конец пептида содержит модифицированный фрагмент АКТГ (4-7), а С-конец содержит мотив Pro-Gly-Pro (PGP), задерживающий процесс деградации семакса. Также трипептид PGP обладает самостоятельным регуляторным действием.

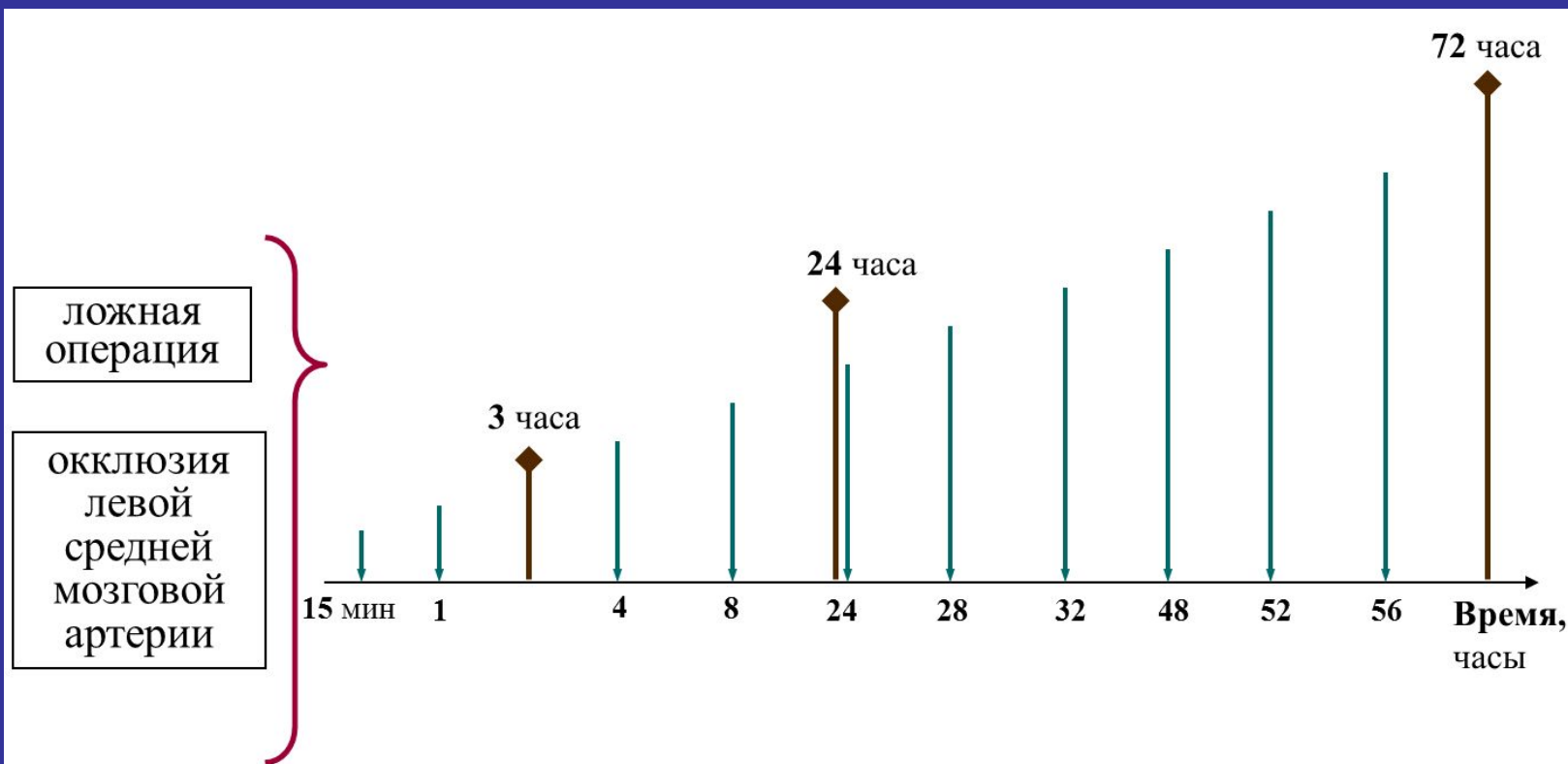


Цели и задачи исследования

С целью исследования изменения экспрессии гена *Cplx2* поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать качество препаратов тотальной РНК, выделенных из мозга экспериментальных животных, синтезировать на их основе препараты кДНК.
2. При помощи метода ОТ-ПЦР оценить изменение относительного содержания альтернативных транскриптов гена *Cplx2* в лобных долях коры и в подкорковых структурах головного мозга крыс в результате действия фокальной ишемии, а также введения семакса и PGP.

Схема эксперимента



↑ - декапитация

↓ - препараты (семакс, PGP или физиологический раствор)

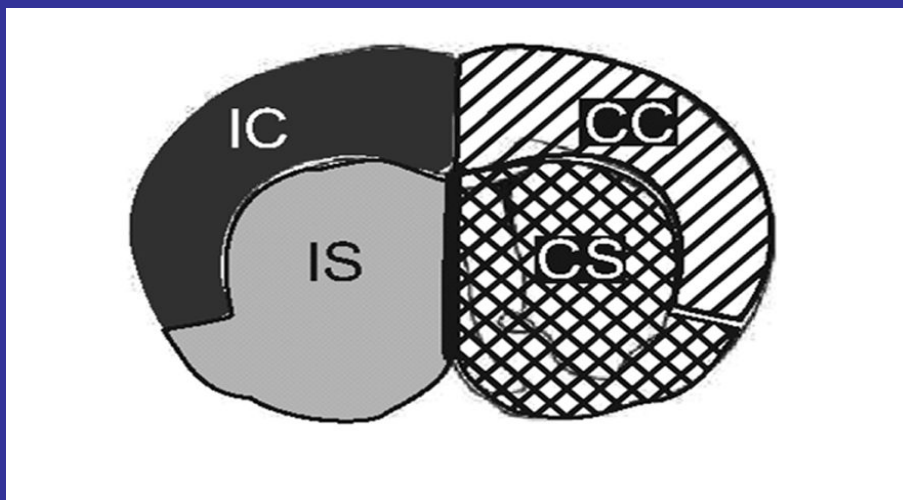


Схема участков головного мозга крыс, в которых исследовали изменение транскрипции после необратимой окклюзии левой средней мозговой артерии.

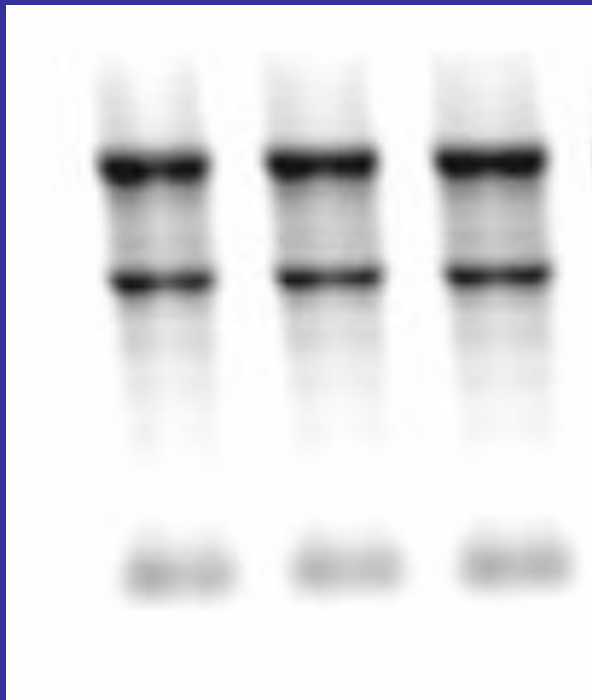
IC - лобно-теменная доля коры ипсилатерального полушария мозга;

CC - лобно-теменная доля коры контралатерального полушария мозга;

IS - подкорковые структуры ипсилатерального полушария мозга;

CS - подкорковые структуры контралатерального полушария мозга

Проверка качества препаратов тотальной РНК



<- 28S

<- 18S

<- 5S

Электрофореграмма
препаратов суммарной
РНК лобно-теменной
доли коры крыс.
28S, 18S, 5S –
субъединицы
рибосомной РНК.

Подбор праймеров

Real-time PCR (Sybr Green I)

1. Подбор праймеров,
2. Подбор условий для проведения ПЦР в реальном времени (концентрация кДНК, температурный профиль реакции),
3. Определение эффективности PCR и оценка уровня относительной экспрессии с помощью программы REST (relative expression software tool),
4. Обработка полученных данных с использованием программы REST.

Динамика изменений относительного содержания мРНК гена *Cplx2* у крыс, подвергнутых фокальной ишемии

Кора	3ч	24ч	72ч
Ишемия			
<i>Cplx2_v1</i>	0.8 ± 0.10	0.5 ± 0.12*	2.3 ± 1.36
<i>Cplx2_v2</i>	0.9 ± 0.14	0.5 ± 0.11*	2.6 ± 1.56

Подкорка	3ч	24ч	72ч
Ишемия			
<i>Cplx2_v1</i>	0.7 ± 0.28	0.7 ± 0.15	0.9 ± 0.19
<i>Cplx2_v2</i>	0.7 ± 0.27	0.7 ± 0.13	0.9 ± 0.23

Динамика изменений относительного содержания мРНК гена *Cplx2* в коре головного мозга крыс с фокальной ишемией, вызванных применением семакса и PGP

Кора	3ч	24ч	72ч
Семакс			
<i>Cplx2_v1</i>	0.9 ± 0.20	0.8 ± 0.36	0.6 ± 0.37
<i>Cplx2_v2</i>	0.9 ± 0.21	0.8 ± 0.28	0.6 ± 0.38
PGP			
<i>Cplx2_v1</i>	1.0 ± 0.15	0.7 ± 0.25	0.2 ± 0.12*
<i>Cplx2_v2</i>	1.1 ± 0.16	0.6 ± 0.20	0.2 ± 0.12*

Динамика изменений относительного содержания мРНК гена *Cplx2* в подкорке головного мозга крыс с фокальной ишемией, вызванных применением семакса и PGP

Подкорка	3 ч	24 ч	72 ч
Семакс			
<i>Cplx2_v1</i>	1.0 ± 0.47	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.18
<i>Cplx2_v2</i>	1.0 ± 0.43	1.3 ± 0.29	0.9 ± 0.24
PGP			
<i>Cplx2_v1</i>	1.7 ± 0.62	1.4 ± 0.38	1.1 ± 0.25
<i>Cplx2_v2</i>	1.7 ± 0.58	1.3 ± 0.38	1.3 ± 0.34

Выводы

1. Подготовлена панель образцов кДНК для анализа экспрессии генов в условиях экспериментальной ишемии головного мозга крыс и воздействия пептидов семакс и PGP.
2. Под воздействием ишемии относительное содержание транскриптов гена *Cplx2* в коре головного мозга спустя сутки после окклюзии снижается в 2 раза. При этом влияния ишемии на содержание мРНК гена *Cplx2* в подкорковых структурах не обнаружено.
3. В условиях фокальной ишемии оба исследуемых пептида вызывают снижение содержания мРНК гена *Cplx2* в коре головного мозга крыс спустя 72 часа после окклюзии. Эффект PGP оказывается более выраженным, чем эффект семакса. Влияния препаратов в подкорке не наблюдается.
4. Не обнаружено различий в характере изменений экспрессии альтернативных транскриптов гена *Cplx2* в условиях эксперимента.

Спасибо за внимание!