

## ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ЦИКЛИНОВ И ЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (*Spermophilus undulatus*) ПРИ СПЯЧКЕ И ПРОБУЖДЕНИИ

© 2016 г. М.В. Онуфриев, Т.П. Семенова\*, М.А. Сергунькина, Е.П. Волкова,  
А.А. Яковлев, Н.М. Захарова\*, Н.В. Гуляева

\*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а;

\*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: n.m.zakharova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.16 г.

Проведено изучение особенностей экспрессии циклинов (Cicl A, Cicl B1) и циклин-зависимых протеиназ (Cdk 1, Cdk 2, Cdk 4, Cdk 5) в структурах головного мозга длиннохвостых сусликов (*Spermophilus undulatus*) в разные фазы годового цикла их жизнедеятельности. Установлено, что уровень экспрессии протеиназ во фронтальной области неокортекса, гиппокампе и каудальном отделе ствола различается в три–пять раз, что указывает на наличие региональных особенностей функционирования белков клеточного цикла в мозге гибернантов. При выходе из зимней спячки наиболее значимое повышение уровня экспрессии Cdk 1, Cdk 2 и Cdk 4 было выявлено в гиппокампе, что обусловлено наличием в субгранулярной зоне его зубчатой фасции прогениторных нейрональных клеток, способных делиться и давать жизнь новым нейронам на протяжении всей жизни. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в период зимней спячки и пробуждения в головном мозге длиннохвостого суслика происходят региональные изменения уровня экспрессии белков клеточного цикла, что обеспечивает его адекватную деятельность при новом функциональном состоянии гибернирующего животного.

*Ключевые слова:* гибернация, эраузал, суслики, циклин-зависимые протеиназы, циклины, неокортекс, гиппокамп, ствол.

Относительно недавно было показано, что белки клеточного цикла играют важную роль в функционировании центральной нервной системы [1]. Обнаружено их участие в регуляции процесса миграции нейронов, в передаче болевых импульсов [2,3]. Белок Cdk 1 в комплексе с циклином B1 участвует в запуске митоза, а вне этого комплекса – в регуляции морфологических перестроек клеток [4]. Киназа Cdk 5, структурно сходная с Cdk 1, в нервной системе специфично регулирует активность белков, связанных с морфологией нейронов, цитоскелетом, клеточной подвижностью [3], оказывает влияние на синаптическую пластичность. Продемонстрировано участие Cdk 5 в развитии дендритных шипиков в неокортексе и гиппокампе [5], в регуляции внутриклеточных реакций на дофаминовые сигналы [6].

Показано, что в головном мозге зимоспящих животных на протяжении гибернационного цикла существенно меняется интенсивность метаболических процессов и интенсивность энер-

гетического обмена [7]. Ведущая роль в функциональных нейрохимических процессах в мозге принадлежит, несомненно, белково-нуклеиновому метаболизму [8]. В течение баутов спячки наблюдается подавление синтеза белков в головном мозге сусликов и очень резкая активация образования белков при их пробуждении. Это позволяет предположить, что и уровень экспрессии белков клеточного цикла в головном мозге гибернантов зависит от изменения функционального состояния центральной нервной системы, обусловленного резким понижением или повышением температуры их мозга в период гибернации и выхода из нее.

В наших предыдущих исследованиях проведен анализ сезонных особенностей уровня мРНК актина в головном мозге гибернантов. Выявлена региональная специфичность распределения ее экспрессии в мозге якутских сусликов (*Spermophilus undulatus*). Установлено, что в гиппокампе уровень экспрессии этого белка был в четыре–пять раз выше, чем в других отделах

мозга на протяжении всего годового цикла жизнедеятельности гибернантов [9]. Характер изменения мРНК актина в период выхода животных из торпидного состояния был сопоставим с изменениями нейронов, выявленными в морфологических [10] и физиологических исследованиях [11–14]. На сегодняшний день в литературе мало данных, отражающих связь клеточного цикла с гипотермией. Движение клеток через фазы клеточного цикла координируется деятельностью специфических киназ (Cdk) и соответствующих им циклинов (Cicl). Прохождение клетки через фазу G2 и вход в митоз регулируется комплексом циклин B1/Cdk 1. Основными событиями этой фазы являются быстрый рост клетки, экспрессия белков, необходимых в митозе. Основным регулирующим циклином является циклин B1 в комплексе с Cdk 1. В последние годы были получены данные, характеризующие особенности пролиферации клеток у гибернантов. У находящихся в торпидном состоянии сусликов показана возможность остановки клеток тканей мозга в различных фазах, связанная с понижением метаболизма в их мозге [15]. Продемонстрировано замедление прохождения стадий клеточного цикла в культуре клеток яичника китайского хомячка под воздействием веществ, выделенных из мозга спящего суслика [16].

Задача настоящего исследования состояла в проведении сравнительного анализа уровня экспрессии ряда циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ, входящих в группу белков клеточного цикла, в различных структурах головного мозга гибернантов (*Spermophilus undulatus*) в период их максимальной активности летом, во время зимней спячки и при выходе из нее.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на половозрелых якутских длиннохвостых сусликах (*Spermophilus undulatus*) обоего пола, массой 600–800 г ( $n = 28$ ), взятых в эксперимент в разные фазы годового цикла их жизнедеятельности [17]. Группа 1 – летние активные животные ( $n = 8$ ,  $t_{\text{мозга}} = 37\text{--}38^\circ\text{C}$ , середина июня – начало июля); группа 2 – зимние животные, взятые в эксперимент на 6-й–7-й день баута спячки ( $n = 10$ ,  $t_{\text{мозга}} = 1\text{--}2^\circ\text{C}$ , конец января – начало февраля); группа 3 – зимние животные, пробуждаемые в середине баута спячки, т.е. взятые в эксперимент в период выхода из торпидного состояния ( $n = 10$ ,  $t_{\text{мозга}} = +10^\circ\text{C}$ , конец января – начало февраля).

Сразу после декапитации мозг сусликов извлекали, охлаждали в ледяном изотоническом

растворе NaCl и на льду выделяли фронтальную кору, мозжечок, гиппокамп и ствол мозга. С помощью вестерн-блоттинга проведен анализ содержания белков клеточного цикла: циклин-зависимых протеинкиназ Cdk 1, Cdk 2, Cdk 4, которые напрямую участвуют в регуляции клеточного цикла, Cdk 5, участвующей в процессах нейронального созревания и нейромиграции, а также циклина A (Cicl A), циклина B1 (Cicl B1), которые так же, как и киназы, вовлечены в различные процессы, помимо контроля клеточного цикла. Использованные в работе биохимические методы подробно описаны нами в работе [9].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов Excel 2003 и Statistica 8.0. Для представления результатов в виде графиков использовали программу SigmaPlot 11.0.

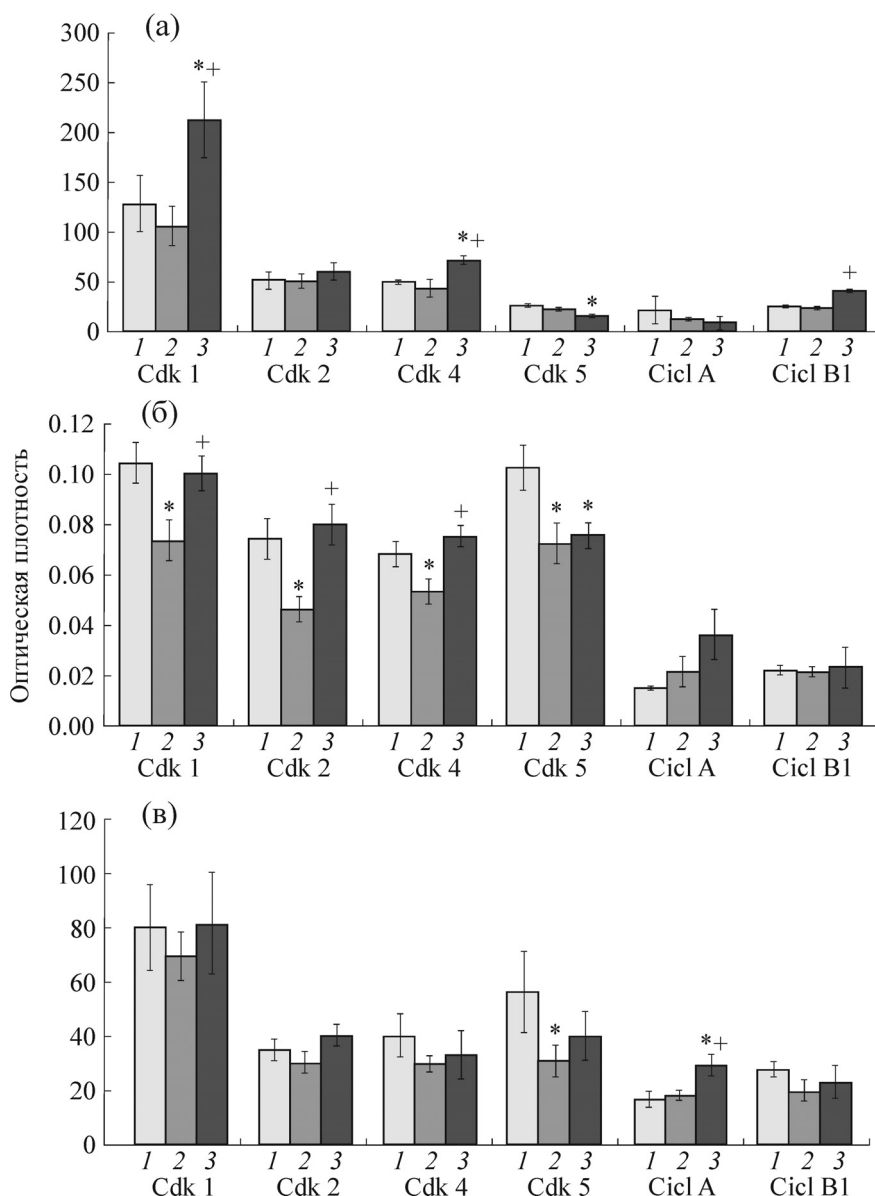
#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

У торпидных животных при изменении температуры мозга от 37–38 до 1–2°C выявлено достоверное понижение уровня экспрессии Cdk 1 в гиппокампе на 30% ( $P < 0,05$ ) по сравнению с летним периодом. Во фронтальной области неокортекса и стволе понижение уровня Cdk 1 проявляется в виде тенденции. Выход животных из состояния спячки сопровождается достоверным повышением уровня экспрессии Cdk 1 в коре и гиппокампе ( $P < 0,05$ ).

Достоверное понижение уровня экспрессии циклин-зависимой киназы Cdk 2 во время спячки на 37,2% ( $P < 0,05$ ) по сравнению с летним периодом отмечено только в гиппокампе, в остальных отделах головного мозга ее уровень практически не изменяется. У выходящих из состояния спячки животных увеличение экспрессии Cdk 2 на 72,6% отмечено также в гиппокампе, в других отделах мозга изменения носят характер тенденции (см. рисунок).

Уровень экспрессии Cdk 4 во время спячки достоверно понижается по сравнению с летом на 22,1% ( $P < 0,05$ ) в гиппокампе, в стволе и неокортексе понижение выражено незначительно. У выходящих из торпидного состояния животных уровень экспрессии Cdk 4 достоверно ( $P < 0,05$ ) возрастает по сравнению со спячкой в гиппокампе и фронтальной области неокортекса.

Уровень экспрессии Cdk 5 в период зимней спячки достоверно понижается в гиппокампе (на 30,9%,  $P < 0,05$ ) и каудальном отделе мозгового ствола (на 44,8%,  $P < 0,05$ ), а во фронтальной области неокортекса – в виде тенден-



Особенности экспрессии белков клеточного цикла во фронтальной области неокортекса, гиппокампе и стволе головного мозга якутских сусликов в период спячки и пробуждения. Цифрами обозначены экспериментальные группы: 1 – летние активные животные, 2 – зимние животные в состоянии торпора, 3 – зимние животные, выходящие из торпидного состояния. \* –  $P < 0,05$  – достоверность отличия данных по критерию Манна–Уитни от группы 1; + –  $P < 0,05$  – достоверность отличия данных по критерию Манна–Уитни от группы 2.

ции. У выходящих из торпора животных достоверное увеличение уровня экспрессии Cdk 5 (на 31,9%,  $P < 0,05$ ) развивается только в гиппокампе (см. рисунок).

Уровень экспрессии циклинов в мозге гибернантов у животных всех экспериментальных групп в 5–10 раз ниже, чем у описанных выше циклин-зависимых протеинкиназ. Низкие значения экспрессии циклинов B1 и A по сравнению с остальными исследованными белками отражают слабую их представленность в мозге,

что, очевидно, связано с редкими делениями в нем клеток.

Таким образом, анализ результатов исследования показал, что характер экспрессии белков клеточного цикла и Cdk 5 существенно различается по уровню в различных отделах головного мозга гибернантов. Обнаружено, что у активных летних животных показатели уровня экспрессии одного и того же белка могут различаться в три–пять раз между корой, гиппокампом и стволом, что указывает на наличие

регион-специфических особенностей функционирования белков клеточного цикла в мозге зимоспящих животных. Подтверждением этого служат также данные о неоднородном характере изменения их уровня при понижении температуры мозга во время спячки (рисунок).

Так, в гиппокампе во время гибернации, в условиях понижения температуры мозга до 1–2°C, или при выходе из нее (при  $t_{\text{мозга}}$  10–12°C) отмечены достоверные изменения уровня экспрессии Cdk 1, Cdk 2 и Cdk 4 по сравнению с предшествующим состоянием. Понижение уровня экспрессии Cdk 5 выражено в виде тенденции. В отличие от этого, во фронтальной области неокортекса и каудальном отделе мозгового ствола у торпидных животных отличий в уровне экспрессии исследуемых белков по сравнению с летом не выявлено.

Тот факт, что уровень экспрессии белков клеточного цикла наиболее высок в гиппокампе, возможно связан с тем, что в головном мозге млекопитающих в субгранулярной зоне зубчатой фасции гиппокампа способность к генерации новых нервных клеток сохраняется на протяжении всей жизни [18,19]. В этой области головного мозга млекопитающих прогениторные нейрональные клетки продолжают делиться и давать жизнь новым нейронам [20]. Экспериментально показано, что в гиппокампе физиологические и поведенческие стимулы, такие как гипоксия [21], обучение [22] или обогащенная внешняя среда [23], способны усиливать нейрогенез. В то же время снижение нейрогенеза всегда сопровождает депрессивные состояния. Трансформация нейрональных прегениторов в зрелые клетки осуществляется при содействии множества химических факторов. Особое место среди них принадлежит нейромедиаторам, в частности дофамину и серотонину [24]. В наших экспериментах повышение в гиппокампе гибернантов уровня экспрессии исследуемых циклин-зависимых протеинкиназ развивалось в условиях увеличения температуры мозга в начальный период их пробуждения и выхода из торпидного состояния. Нейрогенез в гиппокампе вызывает особый интерес в связи с участием последнего в формировании эмоциональных состояний, а также в регуляции процессов обучения и памяти [25]. Наряду с этим в период пробуждения в гиппокампе зимоспящих животных отмечено увеличение уровня норадреналина [26], изменение чувствительности опиоидных [14] и адренорецепторов [12], быстрое восстановление шипикового аппарата в полях CA1 и CA3 [10]. Многие исследователи подчеркивают специфическую роль гиппокампа в регуляции зимней спячки [27]. Можно предположить,

что повышение уровня экспрессии белков Cdk 1, Cdk 2 и Cdk 4 в гиппокампе мозга сусликов в период увеличения  $t_{\text{мозга}}$  от 1–2 до 10°C отражает развитие морфофункциональных перестроек, необходимых либо для формирования новых [28], либо восстановления старых межнейрональных связей [11,14,29,30], характерных для периода максимальной активности животных в летний период, что обеспечивает адекватную его деятельность при новом функциональном состоянии гибернирующего животного.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. O. Steward and E. M. Shuman, *Neuron* **40**, 347 (2003).
2. M. Piper and C. Holt, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **20**, 505 (2004).
3. О. А. Гомазков, *Нейрогенез как адаптивная функция мозга* (ИКАР, Москва, 2013).
4. C. D. Knights and R. G. Pestell, *Cancer drug discovery and development: molecular targeting in oncology*, Ed. by H. L. Kaufman, S. Walder, and K. Antman (Humana Press, New Jersey, 2003).
5. G. D. Pappas, V. Kriho, and C. Pesold, *Neurocytol.* **30**, 413 (2001).
6. J. A. Bibb, G. L. Snyder, and A. Nishi, *Nature* **402**, 669 (1999).
7. K. B. Storey and J. M. Storey, *Biol. Rev. Camp. Philos. Soc.* **79**, 207 (2004).
8. М. М. Демин, Т. Х. Шортанова, и Э. З. Эмирбеков, *Нейрохимия зимней спячки млекопитающих* (Наука, Л., 1988).
9. М. В. Онуфриев, Т. П. Семенова, Е. П. Волкова и др., *Нейрохимия* **2**, 11 (2016).
10. V. I. Popov, N. I. Medvedev, and I. V. Patrushev, *Neuroscience* **149**, 549 (2007).
11. Т. П. Семенова, I. A. Anoshkina, B. H. Khomut, and S. G. Kolaeva, *Behav. Processes* **56**, 195 (2001).
12. Т. П. Семенова, *Журн. высш. нерв. деятельности* **54**, 174 (2004).
13. Т. П. Семенова, М. М. Kozlovskaya, and A. V. Zuykov, *Bull. Exp. Biol. Med.* **140**, 705 (2005).
14. Т. П. Семенова and N. M. Zakharova, *Neurosci. Behav. Physiol.* **45**, 658 (2015).
15. V. I. Popov, I. V. Kraev, D. A. Ignat'ev, and M. G. Stewart, *Neural Plasticity*, 867525 (2011).
16. D. A. Amorese, H. Swan, and J. R. Bamburg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6375 (1982).
17. Н. М. Захарова, *Фундаментальные исследования* **6**, 1401 (2014).
18. И. В. Викторов, *Изв. РАН. Сер. Биол.* **6**, 646 (2001).
19. S. G. Kernie, and J. M. Parent, *Neurobiol. Dis.* **37**, 267 (2010).
20. C. M. Schneider-Mizell, J. M. Parent, E. Ben-Jacob, et al., *Phys. Biol.* **7**, 046008 (2010).

21. C. Wang, M. Zhang, and C. Sun, *Neurosci. Lett.* **488**, 70 (2011).
22. T. J. Shors, G. Miesegaes, and A. Beylin, *Nature* **410**, 372 (2001).
23. S. Rizzi, P. Bianchi, and S. Guidi, *Brain Res.* **1415**, 23 (2011).
24. A. Soumier, M. Benasr, L. K. Goff, and A. Daszuke, *Eur. Neuropsychopharm.* **20**, 336 (2010).
25. W. Deng, *J. Neurosci.* **29**, 13532 (2009).
26. Л. И. Муравьева и А. Ю. Буданцев, *Успехи соврем. биологии* **96**, 117 (1983).
27. K. L. Drew, C. L. Buck, B. M. Barnes, et al., *J. Neurochem.* **102**, 1713 (2007).
28. A. B. Thompson, P.-O. Montiglio, and M. M. Humphries, *Physiology & Behavior* **110–111**, 115 (2013).
29. H. Zhao, D. J. Bucci, M. Weltzin, and K. L. Drew, *Behav. Brain Res.* **151**, 219 (2004).
30. L. E. Clemens, G. Heldmaier, and C. Exner, *Phys. Behav.* **98**, 78 (2009).

## The Character of Change in the Expression of Cyclin and Cyclin-Dependent Protein Kinases in the Brain of Long-Tailed Ground Squirrel (*Spermophilus undulatus*) during Hibernation and Arousal

**M.V. Onufriev\*, T.P. Semenova\*\*, M.A. Sergunkina\*, E.P. Volkova\*, A.A. Yakovlev\*, N.M. Zakharova\*\*, and N.M. Guljaeva\***

*\*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

*\*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The peculiarities of the expression of cyclins (Cyclin A, Cyclin B1) and cyclin-dependent protein kinases (Cdk 1, Cdk 2, Cdk 4, Cdk 5) in brain regions of the long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*) during different phases of the annual cycle of their activity have been investigated. It was found that the expression levels of protein kinase in the frontal neocortex, hippocampus, and caudal brain stem differed by a factor of three or more of the five. This is evidence of region-specific peculiarities of the activity of proteins involved in the cell cycle in the brain of hibernators. During arising out of winter hibernation the most considerable increase in the expression level of Cdk 1, Cdk 2 and Cdk 4 was revealed in the hippocampus, which was due to the presence in the dentate sub-granular zone of neural progenitor cells able to divide giving rise to new nerve cells throughout the life. The results obtained indicate that during winter hibernation and arousal, region-specific changes occur in the expression level of cell cycle proteins in the brain providing an adequate performance of its activity in the novel functional state of a hibernating animal.

*Key words: hibernation, arousal, long-tailed ground squirrels, cyclin-dependent protein kinases, cyclins, neocortex, hippocampus, brain stem*