

УДК 577.175.14:577.25:577.175.823

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ мРНК ГЕНА *Il6st* И ГЛИКОПРОТЕИНА gp130 В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВЫРАЖЕННОСТИ ГИПЕРТРОФИРОВАННОЙ РЕАКЦИИ ЗАМИРАНИЯ (КАТАЛЕПСИИ)

© 2013 г. Н. А. Синякова*, Е. М. Кондаурова, А. В. Куликов, В. С. Науменко, М. А. Тихонова, Н. К. Попова

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090

Поступила в редакцию 17.10.2012 г.

Принята к печати 07.12.2012 г.

Гликопротеин gp130 осуществляет внутриклеточную трансдукцию сигнала с рецепторов цитокинов группы интерлейкина-6. Ранее показано, что ген *Il6st*, кодирующий белок gp130, сцеплен с наследственной предрасположенностью мышей к гипертрофированной реакции замирания (катаlepsии). Цель нашей работы — изучение уровня мРНК гена *Il6st*, а также плотности и степени гликозилирования белка gp130 в пяти отделах мозга у мышей некатаlepsической линии AKR/J и катаlepsических линий CBA/LacJ и конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 с CBA-вариантом гена *Il6st* в геноме AKR/J. Эти параметры изучали также у мышей линии ASC, полученной путем селекции бэк-кроссов между CBA и AKR на высокую предрасположенность к катаlepsии. Максимальные уровни негликозилированной, а также гликозилированной форм белка gp130 наблюдаются в среднем мозге всех исследованных линий. Наиболее высок уровень мРНК гена *Il6st* в среднем мозге, стриатуме и гипоталамусе мышей всех линий. Уровень мРНК гена *Il6st* в стриатуме мышей линии AKR.CBA-D13Mit76 более высок, чем у мышей линии AKR/J. Можно предположить, что имеется взаимосвязь между наследственной катаlepsией и повышением экспрессии гена *Il6st* в стриатуме.

Ключевые слова: ген *Il6st*, гликопротеин gp130, мозг, конгенные мыши, предрасположенность к катаlepsии.

Il6st GENE mRNA AND gp130 PROTEIN DISTRIBUTION IN THE BRAIN STRUCTURES IN MICE DIFFERING IN EXAGGERATED FREEZING REACTION (CATALEPSY), by N. A. Sinyakova*, E. M. Kondaurova, A. V. Kulikov, V. S. Naumenko, M. A. Tikhonova, N. K. Popova (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia; *e-mail: libra@ngs.ru). Glycoprotein gp130 is involved in the intracellular transduction of signals from receptors of interleukin-6 — related cytokines. The linkage between *Il6st* gene encoding gp130 and predisposition to excessive freezing (catalepsy) in mice was shown. The aim of present study was to investigate the *Il6st* mRNA concentration, the level and the rate of glycosylation of gp130 in five brain structures in catalepsy-resistant AKR/J mice strain and in catalepsy-prone CBA/LacJ, AKR.CBA-D13Mit76 with the CBA-derived *Il6st* gene variant in the AKR/J genome, and ASC created by selection of back-crosses between CBA and AKR strains on catalepsy. Highest concentrations of the nonglycosylated and the glycosylated gp130 protein levels were detected in the midbrain. High levels of *Il6st* mRNA were discovered in the midbrain, the striatum and the hypothalamus in all mouse strains. The level of *Il6st* mRNA in the striatum of AKR.CBA-D13Mit76 mice was significantly higher compared with AKR/J. An association between hereditary catalepsy and *Il6st* expression in the striatum in mice was suggested.

Keywords: *Il6st* gene, glycoprotein gp130, brain, congenic mice, predisposition to catalepsy.

DOI: 10.7868/S0026898413030154

Цитокины группы интерлейкина-6 (ИЛ-6), ИЛ-11, ИЛ-31, а также реснитчатый нейротрофический фактор (CNTF), фактор ингибирования

лейкоза (LIF), онкостатин-М (кардиотрофин) участвуют в регуляции важнейших физиологических функций. ИЛ-6 вовлечен в механизм воспа-

Принятые сокращения: ТРН — триптофангидроксилаза; ИЛ — интерлейкин; CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) — реснитчатый нейротрофический фактор; LIF (Leukemia Inhibitory Factor) — фактор ингибирования лейкоза; JAK (JANUS Kinase) — Янус-киназа.

* Эл. почта: libra@ngs.ru

ления и неспецифического иммунитета [1]. В нервной системе ИЛ-6, CNTF и LIF участвуют в механизмах пролиферации и дифференциации нейронов, воспалительных процессов, стресса и психопатологий [2–15]. Общим для рецепторов всех цитокинов группы ИЛ-6 является то, что в них имеется гликопротеин gp130, который передает внутриклеточный сигнал с этих рецепторов, активируя каскад реакций фосфорилирования в клетке. Гликопротеин gp130 кодируется геном *Il6st*, который у человека локализован на пятой хромосоме, а у мыши – 13-ой [12]. Активный гликопротеин gp130 содержит 11 потенциальных сайтов гликозилирования и расположен на цитоплазматической мембране [16]. К сожалению, функциональное значение гликозилирования gp130 не известно, если не считать того, что оно необходимо для стабилизации белка: негликозилированная форма быстро подвергается деградации [17]. Цитокины группы ИЛ-6 стимулируют образование сложного рецепторного комплекса, включающего gp130 и специфический для каждого цитокина рецепторный белок. Возникновение этого комплекса инициирует фосфорилирование цитоплазматического домена gp130 Янускиназами (JAK). Фосфорилированный gp130 активирует фактор транскрипции STAT и каскад SHP-2/Ras/Erk [16]. Играя, таким образом, ключевую роль, gp130 определяет механизм регуляции физиологических функций в норме и при патологии. Нокаут гена *Il6st* летален для организма [12], а удаление сайтов связывания STAT из молекулы gp130 уменьшает продолжительность жизни мышей и может приводить к возникновению дегенеративного артроза [18]. Предполагается, что gp130 играет важную роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, а также в поведении животных в норме и при патологии [19]. В то же время, данных о закономерностях экспрессии гена *Il6st*, а также о распределении гликозилированной и негликозилированной форм gp130 в различных структурах головного мозга у животных с наследственными нарушениями поведения далеко недостаточно.

Каталепсия (бытовые названия – животный гипноз, тоническая неподвижность, мнимая смерть) проявляется как состояние длительной неподвижности с признаками пластического тонуса мускулатуры и обычно наблюдается при тяжелых нарушениях функции нервной системы, например при блокаде D₂-рецепторов дофамина [20–27]. У мышей наследственная каталепсия наблюдается крайне редко: из 11 исследованных линий наследственная каталепсия проявляется только у мышей линии CBA/LacJ [28]. В последние годы обнаружено, что ген *Il6st* сцеплен с наследственной каталепсией у мышей. Исследования с помощью полногеномного QTL-анализа [29], длительной селекции [30] и создания кон-

генных линий мышей [31] позволили локализовать главный ген предрасположенности к каталепсии в дистальном фрагменте хромосомы 13, который содержит ген *Il6st*. Активация белка gp130 при воздействии ИЛ-6 вызывает выраженную каталепсию у мышей [32].

Цель нашего исследования – изучение уровня экспрессии гена *Il6st* и распределения гликозилированной и негликозилированной форм gp130 в структурах головного мозга у линий мышей, устойчивых или предрасположенных к каталепсии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Опыты проводили на половозрелых самцах (3–4 мес., весом 28 ± 0.5 г) инбредных линий AKR/J ($n = 23$), CBA/LacJ ($n = 21$), ASC ($n = 19$) и конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 ($n = 22$). Мыши линий AKR/J и CBA/LacJ поддерживаются в Институте цитологии и генетики СО РАН путем брат-сестринского инбридинга более 40 лет. Мыши линии AKR/J характеризуются устойчивостью к так называемой щипковой (pinch-induced) каталепсии. В то же время, мыши линии CBA/LacJ в высокой степени предрасположены к каталепсии: около 50% животных линии CBA/LacJ-замирают уже после нескольких щипков кожи загривка [28, 33, 34]. Линия ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) создана в лаборатории нейрогенетики поведения Института цитологии и генетики СО РАН в результате длительной селекции бэк-кроссов CBA × (CBA × AKR) на каталепсию. Эта линия несет 75% генома CBA и 25% генома AKR и характеризуется чрезвычайно высокой предрасположенностью к каталепсии: синдром проявляется у примерно 80% самцов и самок ASC [30, 31, 33]. Линия AKR.CBA-D13Mit76 получена в лаборатории нейрогенетики поведения Института цитологии и генетики СО РАН путем переноса фрагмента 111.35–116.16 Mb 13-ой хромосомы, маркированного микросателлитом D13Mit76, от линии CBA/LacJ в геном AKR/J с помощью девяти последовательных возвратных скрещиваний на AKR/J. Мыши линии AKR.CBA-D13Mit76 обладают хорошо выраженной предрасположенностью к каталепсии [31]. Указанный фрагмент фланкируется микросателлитами D13Mit74 и D13Mit214 и содержит ген *Il6st*, кодирующий белок gp130. Линии ASC и AKR.CBA-D13Mit76 поддерживаются в Институте цитологии и генетики СО РАН путем брат-сестринского инбридинга в течение 25 поколений.

В возрасте четырех недель животных отсаживали от матерей и содержали в клетках (50 × 30 × 25 см, по шесть особей одного пола в каждой) в стандартных условиях (при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности около 65% и при естественном освещении). Полноценный корм и воду

они получали без ограничения. За два дня до опыта каждое животное помещали в отдельную клетку, чтобы исключить влияние социальных взаимоотношений на исследуемые признаки. Содержание и экспериментальные процедуры проводили в соответствии с правилами Совета европейского сообщества (Директива 86/309/ЕЕС от 24 ноября 1986 г). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из опыта осуществляли в соответствии с требованиями “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. N 755).

Животных декапитировали, выделяли кору, гиппокамп, гипоталамус, средний мозг и стриатум, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Суммарную РНК выделяли при помощи гуанидинтиоционатного лизиса с последующей фенольной депротеинизацией и спиртовым осаждением [35]. Примеси геномной ДНК удаляли ДНКазой (“Promega”) (5 мкл 10-кратного буфера и 1 мкл ДНКазы, 15 мин 37°C , затем 10 мин при 60°C). РНК, свободную от ДНК, повторно экстрагировали и растворяли в 40 мкл обработанной диэтилпиروкарбонатом воды, определяли оптическую плотность (при длине волны 260 нм), разводили этой водой до концентрации 0.125 мкг/мкл и хранили при -70°C . Степень очистки общей РНК от геномной ДНК определяли при помощи ПЦР с праймерами, специфичными для β -актина (табл. 1) [36].

ОТ-ПЦР. Для синтеза кДНК использовали аликвоту 8 мкл (1 мкг) РНК, вырожденный олигодезоксирибонуклеотид длиной 6 п.н. в качестве затравки и 200 ед. обратной транскриптазы (M-MLV, “Биосан”, Новосибирск). Синтезированную кДНК хранили при -20°C . Примесь геномной ДНК в препаратах кДНК определяли, используя ПЦР с праймерами, специфичными для пятого и шестого экзонов триптофангидроксилазы 1 (TPH-1) мыши (табл. 1), которая не экспрессируется в головном мозге [37]. Ни в од-

ной из исследуемых проб концентрация геномной ДНК не превышала 80 копий на мкл.

Концентрацию мРНК определяли при помощи количественной ПЦР [38, 39]. В качестве внешнего стандарта брали геномную ДНК мыши (линия C57BL/6J) в известных концентрациях, в качестве внутреннего стандарта – кДНК РНК-полимеразы II. Нуклеотидные последовательности праймеров, температуры отжига и размеры ампликонов приведены в табл. 1. Количество ампликонов определяли по их флуоресценции после электрофореза в 1.5% агарозе, окрашенной бромистым этидием, и калибровали на флуоресценцию внешних стандартов. Экспрессию генов нормировали на 100 копий РНК-полимеразы II (RpolII) [39], уровень конститутивной экспрессии которой значительно выше такового у других генов “домашнего хозяйства” [40].

Ранее показано, что чувствительность данного метода сопоставима с чувствительностью ПЦР в реальном времени [39].

Белок выделяли из соответствующих структур мозга, которые гомогенизировали в НВ-буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, pH 7.2, 300 мМ сахарозу, 1 мМ EDTA, 5 мМ β -меркаптоэтанол и ингибиторы протеаз (“GE Healthcare”, США). Центрифугировали при 2500 об/мин 20 мин при 4°C , супернатант центрифугировали при 16500 об/мин при 4°C в течение часа. Осадок растворяли в 100 мкл однократного раствора Леммли, содержащего 62 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 10% сахарозы, 2% SDS, 5% β -меркаптоэтанол. Количество белка оценивали спектрофотометрически (при длине волны 280 нм). Пробы разводили до минимальной концентрации, характерной для проб из данной структуры мозга (другими словами, минимальное значение количества белка принималось за условный “ноль”, и все пробы разводились до этого значения).

Двуслойный электрофорез в ПААГ проводили в 10%-ном разделяющем (при 150 В) и 4%-ном концентрирующем (при 200 В) гелях [41]. В качестве маркера использовали смесь Full Range

Таблица 1. Последовательности и характеристики использованных праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{\text{отжига}}, ^{\circ}\text{C}$	Длина ампликона, п.н.
β -актин	F 5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' R 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	61	285
<i>TPH-1</i>	F 5'-GCTTCAAAGACAATGTCTATCGTAGAAG-3' R 5'-GGCGTGGGTCTGGGTAGAGTTTGT-3'	60	164 без интрона 315 с интроном
<i>RpolII</i>	F 5'-GTTGTCGGGCAGCAGAATGTAG-3' R 5'-TCAATGAGACCTTCTCGTCCTCC-3'	63	188
<i>Il6st</i>	F 5'-ATTTGTGTGCTGAAGGAGGC-3' R 5'-AAAGGACAGGATGTTGCAGG-3'	63	186

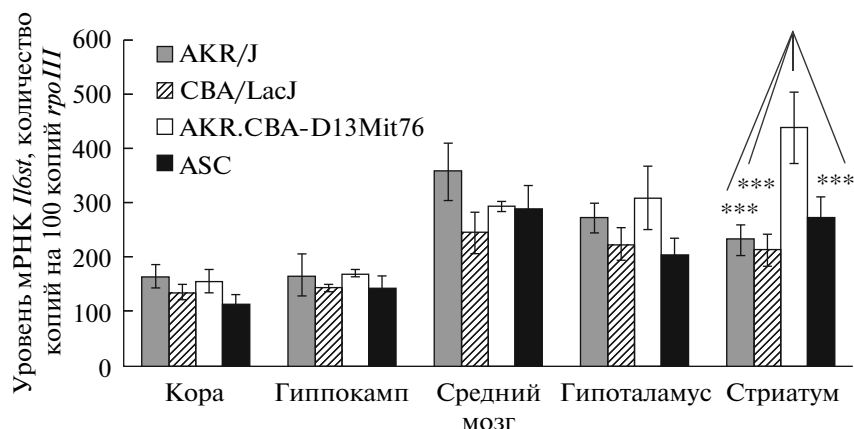


Рис. 1. Уровень содержания мРНК гена *Il6st* в различных отделах мозга у интактных мышей с различной предрасположенностью к катаlepsии. Число животных (*n*): AKR/J – 11, CBA/LacJ – 10, AKR.CBA-D13Mit76 – 10 и ASC – 9. *** $p < 0.001$ – по сравнению с AKR/J, CBA/LacJ и ASC.

RPN800E (“GE Healthcare”). Белок переносили на мембрану (в течение ночи) при силе тока 50 мА. На нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL помещали фрагмент концентрирующего геля, покрывали двумя листами плотной бумаги и смачивали раствором буфера для переноса, содержащего 0.19 М глицина, 25 мМ Трис, pH 8.3, и 20% метанола.

Для иммунодетекции белка мембрану регидрировали в буфере PBST (Phosphate Bufferd Saline with Tween 20), pH 7.5, содержащем 10 мМ NaCl, 8 мМ Na_2HPO_4 , 2 мМ NaH_2PO_4 , 0.001% Tween 20 (“Amresco”, США). Затем мембрану инкубировали в обезжиренном 5%-ном молоке, разведенном в указанном буфере, в течение часа. Отмывали мембрану тем же буфером, наносили смесь первичных поликлональных антител кролика к белку gp130 мыши (“Abscam”, Великобритания) (при разведении 1 : 3000 – в случае среднего мозга и гипоталамуса; 1 : 1500 – в случае стриатума, коры и гиппокампа) и поликлональных антител кролика к β -тубулину (“Abscam”) (в разведении 1 : 14000), который использовали в качестве внутреннего контроля, и инкубировали 2 ч при 22°C. Отмывали мембрану в течение 25 мин буфером PBST, добавляли смесь вторичных поликлональных антител козы, направленных против иммуноглобулинов кролика и конъюгированных с пероксидазой хрена (“Santa Cruz”, США) (в разведении 1 : 20000) и инкубировали в течение часа. Повторяли отмывку мембраны в течение 25 мин. Наносили ECL-систему детекции (“GE Healthcare”) на 5 мин в темной комнате. На мембрану помещали светочувствительную пленку Hyperfilm ECL (“GE Healthcare”) и проявляли фотохимическим способом в течение 30–60 с.

Проявленную пленку сканировали, денситометрировали и количественно оценивали содержание белка при помощи программы Scion Image. Полосы с мол. м. около 130 кДа относили к глико-

зилированной форме белка gp130, около 100 кДа – к негликозилированной, что соответствует теоретически ожидаемым результатам [42]. Экспрессию белка выражали в относительных единицах и нормировали на экспрессию тубулина, которая конститутивна для мозга [43].

При статистическом анализе данных уровень мРНК гена *Il6st* и белка gp130 представляли как среднее \pm ошибка средней. Уровень мРНК гена *Il6st* у нативных животных сравнивали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся наблюдений (измерения, выполненные при изучении различных структур мозга одного и того же животного, использовались как повторяющиеся наблюдения), а уровень белка gp130 – при помощи однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением по Фишеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень мРНК Il6st у мышей с различной предрасположенностью к катаlepsии

Нами показано, что уровень мРНК *Il6st* зависит от специфики линии мышей ($F_{3,31} = 3.48$, $p < 0.05$), от исследуемой структуры мозга ($F_{4,124} = 20.38$, $p < 0.001$) и от эффекта взаимодействия факторов генотипа и структуры мозга ($F_{12,124} = 2.17$, $p < 0.05$). Наибольшая экспрессия гена *Il6st* наблюдается в стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге (рис. 1). У мышей всех исследованных линий содержание мРНК гена *Il6st* в среднем мозге достоверно выше, чем в коре или гиппокампе, а у мышей линий AKR/J, AKR.CBA-D13Mit76 и ASC содержание этой мРНК выше в гипоталамусе, чем в коре (табл. 2). Экспрессия гена в стриатуме мышей линии AKR.CBA-D13Mit76 выше, чем мышей остальных исследованных линий ($p < 0.001$) (рис. 1).

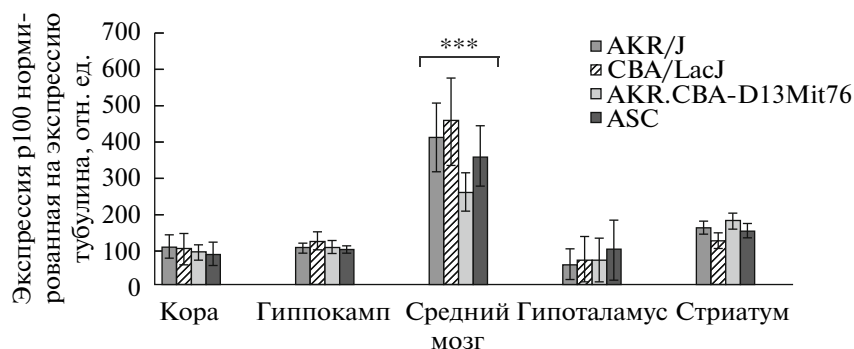


Рис. 2. Уровень содержания негликозилированной формы белка gp130 – p100 в различных отделах мозга мышей линий АКР/Ј, СВА/ЛаСЈ, АКР.СВА-D13Mit76 и АСС. Число животных (*n*): АКР/Ј – 12, СВА/ЛаСЈ – 11, АКР.СВА-D13Mit76 – 12 и АСС – 10.

*** $p < 0.001$ – по сравнению с корой, гиппокампом, гипоталамусом и стриатумом соответствующих линий.

Уровень белка gp130 у мышей с различной предрасположенностью к катаlepsии

Содержание как гликозилированной (gp130), так и негликозилированной (p100) форм белка достоверно выше в среднем мозге по сравнению с другими отделами мозга. Концентрация p100 (рис. 2) в этом отделе мозга превышает концентрацию в остальных отделах мозга у мышей линий АКР/Ј ($F_{4.53} = 7.69, p < 0.001$), СВА/ЛаСЈ ($F_{4.52} = 8.05, p < 0.001$), АКР.СВА-D13Mit76 ($F_{4.60} = 6.57, p < 0.001$) и АСС ($F_{4.49} = 6.93, p < 0.01$). Аналогичная закономерность наблюдается в случае

gp130 (рис. 3) у всех линий мышей – АКР/Ј ($F_{4.52} = 5.9, p < 0.001$), СВА/ЛаСЈ ($F_{4.49} = 4.97, p < 0.01$), АКР.СВА-D13Mit76 ($F_{4.58} = 3.046, p < 0.05$) и АСС ($F_{4.49} = 4.08, p < 0.01$). Доля гликозилированных молекул (в %) неодинакова в разных структурах мозга: в стриатуме мозга линий АКР/Ј ($F_{4.52} = 7.95, p < 0.001$); СВА/ЛаСЈ ($F_{4.49} = 3.47, p < 0.05$); АКР.СВА-D13Mit76 ($F_{4.58} = 3.77, p < 0.01$) и АСС ($F_{4.48} = 4.097, p < 0.01$) (рис. 4) она меньше.

Не обнаружено межлинейных различий в содержании негликозилированной (кора – $F_{3.41} < 1$,

Таблица 2. Статистически значимые различия по уровню мРНК гена *Irf6* между отделами мозга у интактных мышей с различной предрасположенностью к катаlepsии

Линия мышей	Отделы мозга	Уровень значимости
АКР/Ј	Кора – средний мозг	$p < 0.001$
	Кора – гипоталамус	$p < 0.05$
	Гиппокамп – средний мозг	$p < 0.001$
	Гиппокамп – гипоталамус	$p < 0.05$
	Средний мозг – стриатум	$p < 0.01$
СВА/ЛаСЈ	Кора – средний мозг	$p < 0.05$
	Гиппокамп – средний мозг	$p < 0.05$
АКР.СВА-D13Mit76	Кора – средний мозг	$p < 0.001$
	Кора – гипоталамус	$p < 0.05$
	Кора – стриатум	$p < 0.001$
	Гиппокамп – средний мозг	$p < 0.05$
	Гиппокамп – стриатум	$p < 0.01$
АСС	Кора – средний мозг	$p < 0.01$
	Кора – гипоталамус	$p < 0.01$
	Кора – стриатум	$p < 0.001$
	Гиппокамп – средний мозг	$p < 0.01$
	Гиппокамп – гипоталамус	$p < 0.01$
	Гиппокамп – стриатум	$p < 0.001$
	Средний мозг – стриатум	$p < 0.001$
	Гипоталамус – стриатум	$p < 0.001$

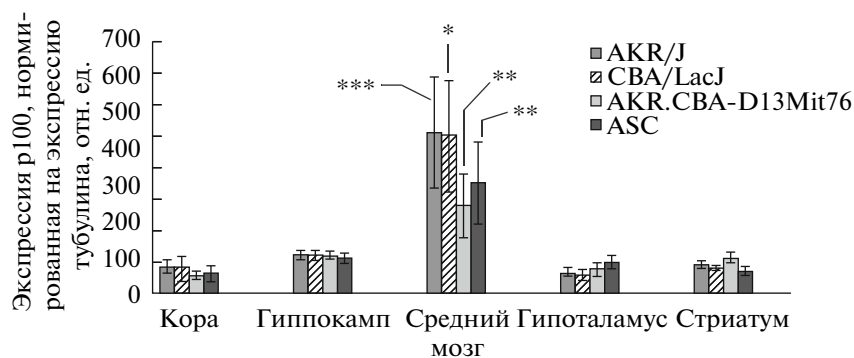


Рис. 3. Уровень содержания гликозилированной формы белка gp130 в различных отделах мозга мышей линий AKR/J, CBA/LacJ, AKR.CBA-D13Mit76 и ASC. Число животных (n) как на рис. 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – по сравнению с корой, гиппокампом, гипоталамусом и стриатумом соответствующих линий.

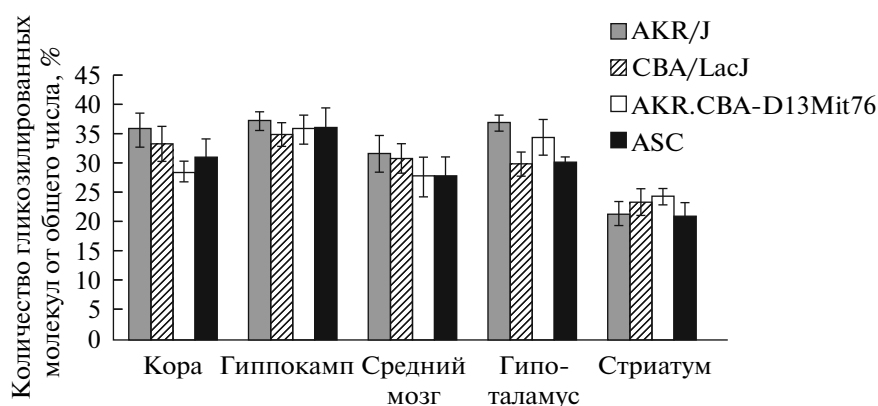


Рис. 4. Процентное соотношение гликозилированной формы gp130 в различных отделах мозга мышей линий AKR/J, CBA/LacJ, AKR.CBA-D13Mit76 и ASC. Число животных (n) – как на рис. 2.

гиппокамп – $F_{3,41} < 1$, средний мозг – $F_{3,43} < 1$, гипоталамус – $F_{3,44} < 1$, стриатум – $F_{3,42} < 1$) и гликозилированной (кора – $F_{3,40} < 1$, гиппокамп – $F_{3,43} < 1$, средний мозг – $F_{3,43} < 1$, гипоталамус – $F_{3,41} < 1$, стриатум – $F_{3,41} = 2.1$, $p > 0.05$) форм белка, а также в величинах доли гликозилированного белка gp130 (кора – $F_{3,39} = 1.43$, $p > 0.05$, гиппокамп – $F_{3,43} < 1$, средний мозг – $F_{3,43} < 1$, гипоталамус – $F_{3,41} = 2.73$, $p > 0.05$, стриатум – $F_{3,41} < 1$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важная роль ИЛ-6 в возникновении нейродегенеративных и психических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, депрессия и шизофрения, не вызывает сомнения [44]. Учитывая ключевую роль белка gp130 в механизме трансдукции сигнала от рецептора ИЛ-6, можно ожидать, что этот белок участвует в механизмах нарушения функций нервной системы. В настоящей работе мы исследовали особенности экспрессии гена *Il6st* и белка gp130 в структурах головного мозга линий

мышей, различающихся по предрасположенности к наследственной катаlepsии, которая является признаком значительных нарушений функционирования головного мозга.

Обнаружено, что у интактных мышей всех исследованных линий усиливается экспрессия гена *Il6st* в среднем мозге по сравнению с интенсивностью этого процесса в передней коре и гиппокампе (т.е. у мышей в норме). Эти результаты получены впервые, поскольку до настоящего времени сравнения уровня мРНК этого гена в разных районах мозга у взрослых мышей не проводили. При анализе экспрессии гена на транскрипционном уровне мы обнаружили достоверное увеличение уровня мРНК гена *Il6st* в стриатуме у мышей конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 – при сравнении с мышами других линий. Известно, что стриатум входит в состав базальных ганглиев, участвующих в контроле двигательной активности, и нарушение его работы приводит не только к катаlepsии, но и к паркинсонизму [45, 46], болезни Гентингтона [47], синдрому Туретта [48]. Мыши конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 отличаются от родительской линии AKR только дисталь-

ным фрагментом хромосомы 13, содержащим ген *I16st* и полученным от СВА [31]. Поэтому увеличение экспрессии гена *I16st* в стриатуме мышей АКР.СВА-D13Mit76 — по сравнению с животными линии АКР — может быть интерпретировано как доказательство участия данного гена в механизме предрасположенности к наследственной каталепсии у мышей. Однако различий по уровню мРНК гена *I16st* между животными АКР и другими каталептическими линиями СВА и ASC, несущими, как и животные линии АКР.СВА-D13Mit76, СВА-вариант гена *I16st*, не обнаружено. Этот факт свидетельствует о том, что между каталепсией и геном *I16st* взаимосвязь более сложная и, возможно, оно включает взаимодействия этого гена с другими генами.

В то же время, мы обнаружили, что уровень белка в среднем мозге резко повышен и у мышей некаталептической, и у мышей каталептических линий, если сравнивать этот уровень с уровнем в других структурах мозга. Мы полагаем, что повышенный уровень содержания белка gp130 в среднем мозге можно объяснить тем, что количество нейронов, в которых идет экспрессия gp130, в нем больше, чем в других структурах.

Неожиданным результатом данного исследования явилось то, что корреляции между уровнем мРНК гена *I16st* и концентрацией белка gp130 не наблюдается. Действительно, концентрация гликозилированной формы белка gp130 и его негликозилированной формы — p100 — в среднем мозге в несколько раз выше, чем в стриатуме и гиппокампе, в то время как уровень мРНК гена *I16st* в этих структурах не различается. Хотя уровень мРНК в стриатуме мышей АКР.СВА-D13Mit76 значительно выше, чем у животных других линий, данная линия не отличается от других по уровню гликозилированной и негликозилированной форм gp130 в этой структуре. Это отсутствие корреляции свидетельствует о существенном вкладе процесса трансляции и посттрансляционных механизмов в регуляции уровня gp130 в мозге мышей. Не выявлено также межлинейных различий по содержанию негликозилированной и гликозилированной форм белка. Тем не менее, мыши данных линий могут различаться по функциональной активности данного белка. Ранее показано, что мыши линии АКР.СВА-D13Mit76 более чувствительны к действию бактериального эндотоксина — липополисахарида, чем животные линии АКР [49, 50].

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-00266) и программы президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” (№ 6.9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naka T., Nishimoto N., Kishimoto T. 2002. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthr. Res.* **4**, s233–s242.
2. Marz P., Heese K., Dimitriades-Schmulz B., Rose-John S., Otten U. 1999. Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression. *Gli.* **26**, 191–200.
3. Campbell I.L., Abraham C.R., Masliah E., Kemper P., Inglis J.D., Oldstone M.B., Mucke L. 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10061–10065.
4. Godbout J.P., Johnson R.W. 2004. Interleukin-6 in the aging brain. *J. Neuroimmunol.* **147**, 141–144.
5. Kiuchi B.N., Nakajima K., Ichiba M., Fukada T., Narimatsu M., Mizuno K., Hibi M., Hurano T. 1999. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J. Exp. Med.* **189**, 63–73.
6. Yamamori T., Fukada K., Aebersold R., Korshing S., Fann M.J., Patterson P.H. 1989. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science.* **246**, 1412–1416.
7. Landis S.C. 1992. Cellular and molecular mechanisms determining neurotransmitter phenotypes in sympathetic neurons. In: *Determinants of Neuronal Identity*. Eds Shankland M., Macagno E.R. San Diego CA: Acad Press, pp. 497–523.
8. Bonni A., Suh Y., Nadal-Vicens M., Bhatt A., Frank D.A., Rozovsky I., Stahl N., Yancopoulos G.D., Greenberg M.E. 1997. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by JAK-STAT signaling pathway. *Science.* **278**, 477–483.
9. Koblar S.A., Turnley A.M., Classon B.J., Reid K.L., Ware C.B., Cheema S.S., Murphy M., Bartlett P.F. 1998. Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 3178–3181.
10. Rubio-Perez J.M., Morillas-Ruiz M.M. 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer’s disease, role of cytokines. *Sci. World J.* Article ID 756357. Doi 10.1100/2012/756357.
11. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochem. Biophys. Acta.* **1813**, 878–888.
12. Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem.* **149**, 1–38.
13. Smith J.A., Das A., Ray S.K., Banik N.L. 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain. Res. Bull.* **87**, 10–20.
14. Neurath M.F., Finotto S. 2011. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 83–89.
15. Turnbull A.V., Rivier C. 1995. Regulation of the HPA axis by cytokines. *Brain Behav. Immun.* **9**, 253–275.
16. Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Scharper F., Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/JAK/STAT pathway. *Biochem. J.* **334**, 297–314.
17. Waetzig G.H., Charlanis A., Rosenstiel P., et al. 2010. N-linked glycosylation is essential for the stability but

- not the signaling function of the interleukin-6 signal transducer glycoprotein 130. *J. Biol. Chem.* **285**, 1781–1789.
18. Naka T, Kishimoto T. 2001. Joint disease caused by defective gp130-mediated STAT signaling. *Arthritis Res.* **4**, 154–156.
 19. Chesnokova V., Melmed S. 2002. Minireview: neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology.* **143**, 1571–1574.
 20. Ahlenius S., Hillegaart V. 1986. Involvement of extrapyramidal motor mechanisms in the suppression of locomotor activity by antipsychotic drugs: a comparison between the effects produced by pre- and post-synaptic inhibition of dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **24**, 1409–1415.
 21. Klemm W.R. 1989. Drug effects on active immobility responses: what they tell us about neurotransmitter systems and motor functions. *Prog. Neurobiol.* **32**, 403–422.
 22. Wadenberg M.L. 1996. Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**, 325–339.
 23. Caroff S.N., Mann S.C., Keck P.E. Jr., Francis A. 2000. Residual catatonic state following neuroleptic malignant syndrome. *J. Clin. Psychopharm.* **20**, 257–259.
 24. Lee J.W. 2007. Catatonic variants, hyperthermic extrapyramidal reactions, and subtypes of neuroleptic malignant syndrome. *Ann. Clin. Psychiatry.* **19**, 9–16.
 25. Lee J.W. 2010. Neuroleptic-induced catatonia: clinical presentation, response to benzodiazepines, and relationship to neuroleptic malignant syndrome. *J. Clin. Psychopharmacol.* **30**, 3–10.
 26. Paparrigopoulos T., Tzarellas E., Ferentinos P., Mourikis I., Liappas J. 2009. Catatonia as a risk factor for the development of neuroleptic malignant syndrome: report of a case following treatment with clozapine. *World J. Biol. Psychia.* **10**, 70–73.
 27. Porsolt R.D., Moser P.C., Castagné V. 2010. Behavioral indices in antipsychotic drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**, 632–638.
 28. Kulikov A.V., Kozlachova E.Yu., Maslova G.V., Popova N.K. 1993. Inheritance of predisposition to catalepsy in mice. *Behav. Genet.* **23**, 379–384.
 29. Куликов А.В., Базовкина Д.В., Муазан М.-П., Мормэд П. 2003. Картирование гена предрасположенности к катаlepsии у мышей с помощью полиморфных микросателлитных маркеров. *Докл. акад. наук.* **393**, 134–137.
 30. Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. 2006. Selective breeding for catalepsy changes the disruption of microsatellite D13Mit76 alleles linked to the 5-HT_{1A} serotonin receptor gene in mice. *Genes Brain Behav.* **5**, 596–601.
 31. Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. 2008. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice. *Genes Brain Behav.* **7**, 506–512.
 32. Bazovkina D.V., Tibeikina M.A., Kulikov A.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. 2011. Effect of lipopolysaccharide and interleukin-6 on cataleptic immobility and locomotor activity in mice. *Neurosci. Lett.* **487**, 302–304.
 33. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. 2005. Селекция на предрасположенность к катаlepsии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей. *Генетика.* **41**, 1222–1228.
 34. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. 1989. Генетический контроль катаlepsии у мышей. *Генетика.* **25**, 1402–1408.
 35. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
 36. Науменко В.С., Куликов А.В. 2006. Количественное определение экспрессии гена 5-HT_{1A} серотонинового рецептора в головном мозге. *Молекуляр. биология.* **40**, 37–44.
 37. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. 2005. Quantitative RT-PCR of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as a standard. *J. Neurosci. Meth.* **141**, 97–101.
 38. Kulikov A.V., Naumenko V.S. 2007. Problems of mRNA Quantification in the Brain Using RT-PCR. In: *New Messenger RNA Research Communications*. Ed. Kwang L.B. Nova Science Publishers, pp. 53–68.
 39. Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. 2008. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain. *J. Neurosci. Meth.* **17**, 197–203.
 40. Radonić A., Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **313**, 856–862.
 41. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
 42. Taga T., Hibi M., Hirata Y., Yamasaki K., Yasukawa K., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* **58**, 573–581.
 43. Bauer D.E., Haroutunian V., McCullumsmith R.E., Meador-Woodruff J.H. 2009. Expression of four proteins in elderly patients with schizophrenia. *J. Neural. Transm.* **116**, 487–491.
 44. Spooen A., Kolmus K., Laureys G., Clinckers R., De Keyser J., Haegeman G., Gerlo S. 2011. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev.* **67**, 157–183.
 45. Galvan A., Wichmann T. 2007. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin. Neurophysiol.* **119**, 1459–1474.
 46. Surmier D.J., Plotkin J., Shen W. 2009. Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection. *Curr. Opin. Neurosci.* **19**, 621–628.
 47. Kumar P., Kalonia H., Kumar A. 2010. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol. Rep.* **61**, 1–14.
 48. Kataoka Y., Kalanithi P.S.A., Grantz H., Schwartz M.I., Saper C., Leckman J.F., Vaccarino F.M. 2010. Decreased number of parvalbumin and cholinergic interneurons in the striatum of individuals with Tourette syndrome. *J. Comp. Neurol.* **518**, 277–291.
 49. Kulikov A.V., Sinyakova N.A., Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Popova N.K. 2010. Association of glycoprotein gp130 with hereditary catalepsy in mice. *Genes Brain Behav.* **9**, 997–1003.
 50. Куликов А.В., Науменко В.С., Цыбко А.С., Синякова Н.А., Базовкина Д.В., Попова Н.К. 2010. Роль гликопротеида gp130 в регуляции серотониновой медиаторной системы головного мозга мышей. *Молекуляр. биология.* **44**, 904–910.