

С.В. Гущина¹, О.В. Волкова¹, П.П. Кругляков² и К.Б. Магоулас³

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА КАППА В (NF-κB) В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ (ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — академик РАМН проф. О.В. Волкова) педиатрического факультета Российского государственного медицинского университета, Москва; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. С.Л. Кузнецов) Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова; ³ Центр Нейронаук Университета Лондона (дир. — проф. Дж. Джованнони), e-mail: sguschin@mail.ru; С.В.Магоулас@qmul.ac.uk

Ядерный фактор каппа В (NF-κB) — транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию большого набора генов, участвующих в иммунных и воспалительных процессах. Предполагается, что после повреждения нерва высвобождение специфических цитокинов оказывает стимулирующее действие и активирует NF-κB в нейронах спинномозговых узлов (СМУ), что может оказать протекторное действие на чувствительные нейроны. Однако сложность данного фактора приводит к противоречивым заключениям о роли NF-κB в поврежденных нейронах СМУ. Цель работы — выяснить, активизируется ли NF-κB в чувствительных нейронах зрелых СМУ при повреждении периферического нерва с использованием трансгенной линии репортерных мышей, в которой активация NF-κB приводит к экспрессии репортерного гена *lac-z*. Было обнаружено, что экспрессия β-галактозидазы (β-гал) не проявлялась ни в поврежденных нейронах СМУ, ни в нейронах с контралатеральной стороны. Однако мощная экспрессия β-гал выявлялась в поврежденной мышечной ткани. Это может отражать репрессивное влияние дополнительных сигнальных молекул на активность NF-κB в чувствительных нейронах.

Ключевые слова: нейрон, транскрипционный фактор NF-κB, спинномозговые узлы, репортерный ген.

Раскрытие молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию генов в посттравматических нейронах и необходимых для роста регенерирующих отростков, является актуальной задачей нейробиологии [1, 12]. Травма периферических отростков зрелых чувствительных нейронов стимулирует синтез ряда нейропротекторных цитокинов, гены которых, в свою очередь, «запускаются» транскрипционным ядерным фактором каппа В (NF-κB) [9].

Ядерный транскрипционный фактор NF-κB — семейство белков, которые формируют активный димер в ответ на различные стимулы и регулируют экспрессию многочисленных генов-мишеней. В нестимулированных клетках NF-κB находится в неактивной форме гетеродимера, содержащего р50- и р65- субъединицы и формирующего комплекс с ингибиторным протеином IκBα [3]. Множество внеклеточных агентов могут активировать NF-κB, при этом IκBα фосфорилируется и подвергается деградации, что способствует перемещению NF-κB в ядро и присоединению к специфической нуклеотидной последовательности в регуляторных участках генов-мишеней. В большинстве случаев это приводит к повышению экспрессии NF-κB-зависимых генов, среди которых как антиапоптозные, так и проапоптозные гены, в том числе кодирующие цитокины, хемокины и ростовые факторы [10].

В нервной системе NF-κB изучали в связи с его участием в клеточных реакциях при различных нейродегенеративных состояниях [8], а также с возможностью его вовлечения во внутриклеточные процессы зрелых чувствительных нейронов после повреждения нерва [7]. Однако методы иммуногистохимии и анализа ДНК-связывающей активности, применяемые ранее для изучения NF-κB, недостаточны для определения его реальной способности индуцировать экспрессию генов-мишеней. Для инициации этого процесса необходимы дополнительные модификации фактора(ов), как до, так и после присоединения его к ДНК [13], а также взаимодействия с дополнительными белками — коактиваторами и корепрессорами [2].

Цель настоящей работы — выявить реальную транскрипционную активность NF-κB в нейронах спинномозговых узлов после рассечения периферического нерва.

Материал и методы. Исследование проведено с использованием репортерной модели генетически модифицированных мышей NF-κB/LacZ в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.)». Эта линия мышей предоставлена проф. Ф. Баркером (Университет Мак-Гилла, г. Монреаль, Канада) [4]. Для их генерации был использован трансген, включающий в себя: 1 — три тандема копий HIV-LTR — промотера, содержащего 6 копий NF-κB связываемых последовательностей; 2 — минимальный SV40-промотор и 3 — репортер-

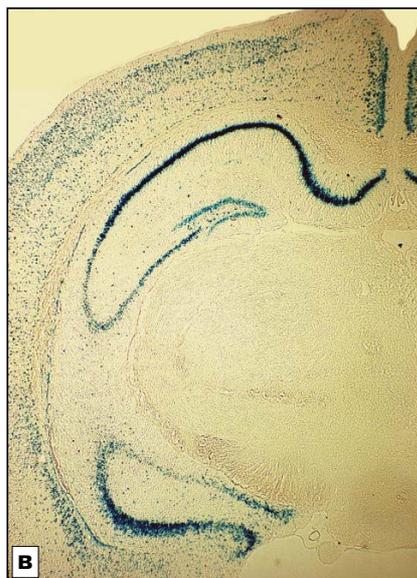
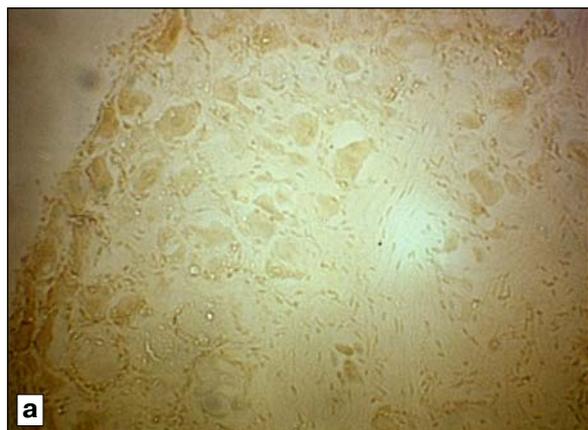


Рис. 1. Отсутствие экспрессии β -галактозидазы в спинномозговых узлах трансгенных NF- κ B/LacZ репортерных мышей через 2 сут после перерезки периферического нерва.

а — контрлатеральные узлы; б — узлы со стороны повреждения; в — контрольный срез головного мозга NF- κ B/LacZ-репортерных мышей. Окраска методом X-гал. Ув.: а, б — 200; в — 40.

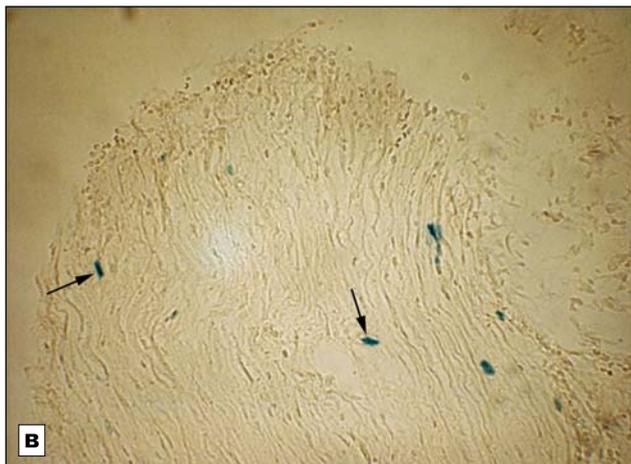
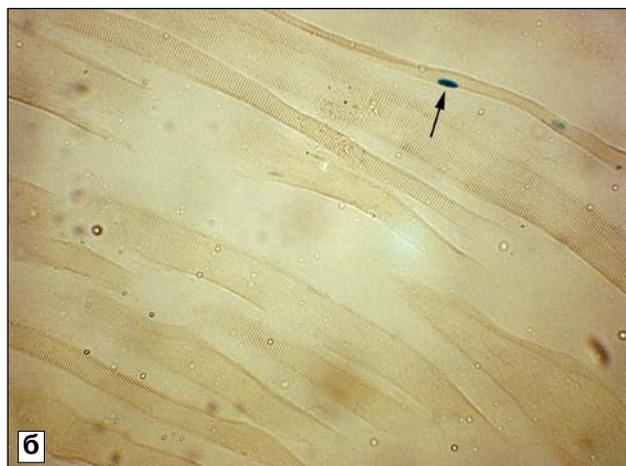
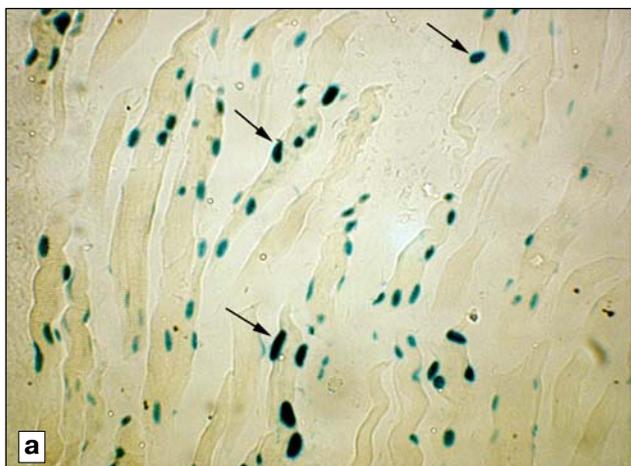


Рис. 2. Экспрессия β -галактозидазы (β -гал) в мышечной ткани и проксимальном отрезке рассеченного нерва трансгенных мышей.

а — мощная экспрессия β -гал в ядрах поврежденной мышечной ткани (стрелки); б — экспрессия β -гал в мышце на контрлатеральной (неповрежденной) стороне отсутствует; в — окрашенные β -гал клетки выявляются в проксимальном сегменте поврежденного седалищного нерва (стрелки). Окраска методом X-гал. Ув. 200.

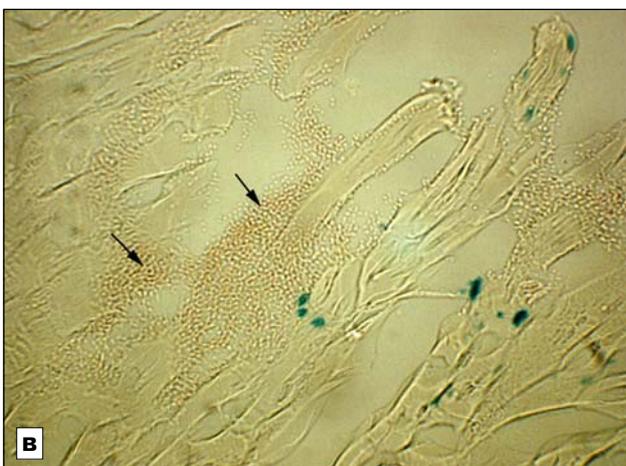
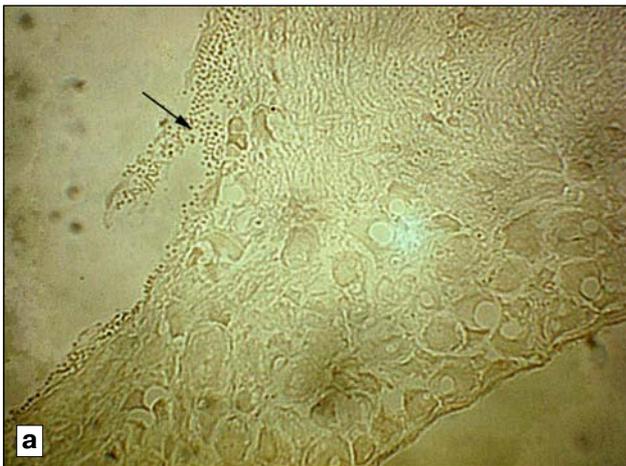


Рис. 3. Экспрессия β-галактозидазы (β-гал) в нейронах спинномозговых узлов и в мышечной ткани NF-κB/LacZ-репортерных мышей в модели экспериментального воспаления периферического нерва.

а — отсутствие экспрессии β-гал в нейронах спинномозгового узла со стороны инъекции адьюванта Фрейнда; б — отсутствие экспрессии β-гал в мышечной ткани бедра со стороны инъекции; в — одиночные β-гал-позитивные ядра мышечных волокон; стрелки — клетки воспалительного инфильтрата. Окраска методом Х-гал. Ув. 200.

ный ген — бактериальный ген *LacZ*, кодирующий фермент β-галактозидазу (β-гал) *E. coli*. Эта генетическая конструкция была модифицирована включением последовательности ядерной локализации (Т-антиген SV40) и приводила к экспрессии ядерной формы β-гал при активации NF-κB.

Позитивных мышей, несущих трансгенную конструкцию, идентифицировали методом полимеразной цепной реакции. Для этого геномную ДНК выделяли из материала биоптатов хвоста трансгенных мышей с помощью набора реагентов (Sigma, Великобритания), следуя протоколу компании, и подвергали амплификации с использованием Thermo-start High Performance PCR Master Mix (ABgene, Великобритания) и праймеров к участкам 595–572 (СТТССАГАТААСТGCCGТСАСТСС) и 70–92 (СТТААТСССТТГСАГСАСАТСС), режим нагрева: однократно 95 °С в течение 15 мин и 30 циклов 95 °С — 30 с, 60 °С — 30 с и 72 °С — 90 с.

У трансгенных мышей 2–6 мес (n=65) под изофлюрановым наркозом в асептических условиях перерезали левый седалищный нерв на уровне середины бедра. Правый седалищный нерв оставляли не оперированным. У мышей подопытной группы через 2 (n=30) и 7 (n=35) сут после травмы нерва и у интактных животных (n=36) под изофлюрановым наркозом после ламинэктомии выделяли спинномозговые узлы на уровне L_{IV}–L_V с левой стороны и помещали в фосфатно-солевой буфер (PBS), 2 мМ MgCl₂ на льду для последующего анализа β-гал методом Х-гал (4-хлор-5-бром-3-индолил-β-гал). Для анализа β-гал брали также проксимальный отрезок рассеченного нерва и участки травмированной и нормальной мышечной ткани.

Воспаление периферического нерва моделировали на трансгенных NF-κB/LacZ-репортерных мышах в условиях изофлюранового наркоза путем введения полной формы адьюванта Фрейнда (complete Freund's adjuvant — CFA; Sigma, Великобритания). Для этого анестезированным мышам были сделаны инъекции 200 мкл CFA в изотоническом растворе хлорида натрия (1:1) в подошвенную область левой задней конечности (n=38). Контрольные животные (n=32) получали инъекции 200 мкл изотонического раствора. У животных подопытной и контрольных групп через 24 ч после инъекции под изофлюрановым наркозом после ламинэктомии выделяли спинномозговые узлы на уровне L_{IV}–L_V с левой стороны для последующего анализа β-гал.

Определение β-гал в тканях и спинномозговых узлах трансгенных NF-κB/LacZ-репортерных мышей проводили методом окраски с Х-гал [4]. Криостатные срезы фиксировали 5 мин в 0,5% глутаральдегиде на PBS при 4 °С и затем инкубировали в растворе, содержащем 80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ MgCl₂, 0,2% Nonidet P-40, 1 % диоксихлат натрия, 5 мМ феррицианид калия, 5 мМ ферроцианид калия и 800 мкг/мл Х-гал (Sigma, Великобритания) в течение 4–16 ч при 37 °С.

Результаты исследования. Для выявления активности β-гал проводили окраску спинномозговых узлов (L_V) Х-гал через 2 сут после перерезки седалищного нерва. β-гал-позитивных нейронов не была обнаружена в узлах ни со стороны повреждения нерва, ни с контрлатеральной

неповрежденной стороны (рис 1, а, б). Тот же результат был получен после проведения окраски узлов через 1 нед после травмы.

В качестве положительного контроля для выявления активности β -гал использовали срезы головного мозга. Известно, что нейроны головного мозга проявляют высокую конститутивную NF- κ B-активность. Как и ожидалось, экспрессия репортерного гена *lacZ* проявлялась в головном мозгу NF- κ B/LacZ-репортерных мышей и особенно отчетливо — в нейронах коры большого мозга и гиппокампа (см. рис 1, в).

Кроме этого, для выявления активности β -гал были исследованы образцы мышечной ткани, окружающей участок повреждения нерва, а также проксимальный отрезок перерезанного нерва. На срезах мышечной ткани, взятой на уровне верхней части бедра в участке повреждения, отчетливая экспрессия репортерного гена *lacZ* была выявлена в ядрах мышечных волокон (рис 2, а), в то время как в неповрежденной мышце контралатеральной стороны экспрессия репортерного гена *lacZ* отсутствовала (см. рис 2, б). β -гал-позитивные клетки встречались также в проксимальном отрезке расщепленного нерва (см. рис 2, в).

На следующем этапе работы активность NF- κ B в нейронах спинномозговых узлов индуцировали путем экспериментально вызванного воспаления. На срезах спинномозговых узлов и мышечной ткани задней части бедра через 2 сут после инъекции адьюванта Фрейнда была обнаружена морфологическая картина воспаления, характеризующаяся массивной клеточной инфильтрацией (рис. 3). Однако даже в этом случае экспрессия репортерного гена *lacZ* в клетках спинномозгового узла не проявлялась. Только единичные β -гал-позитивные ядра выявлялись в мышечной ткани конечности, в которую была сделана инъекция.

Обсуждение полученных данных. Полученные данные показали, что NF- κ B транскрипционно не активен как в норме, так и после повреждения периферического нерва, что было подтверждено неспособностью NF- κ B транскрибировать репортерный ген *lacZ* в нейронах спинномозговых узлов мышей трансгенной линии NF- κ B/LacZ.

Было также обнаружено, что в модели экспериментально вызванного воспаления периферического нерва экспрессия репортерного гена не активировалась в чувствительных нейронах, хотя считается, что воспаление способно индуцировать NF- κ B-сигнальные каскады в других типах клеток [6].

Мы показали, что конститутивная транскрипционная активность NF- κ B выявляется в нейронах головного мозга, следовательно, отсутствие активности NF- κ B в спинномозговых узлах в нашем эксперименте не является следствием неадекватного окрашивания X-гал. Более того, мы показали, что ненейрональные клетки давали положительную окраску X-гал в участке повреждения седалищного нерва. Особенно отчетливо проявлялся репортерный ген *lacZ* в ядрах поврежденной мышечной ткани, вероятно, в результате индукции NF- κ B цитокинами воспаления и/или процессов регенерации мышечной ткани.

Мы также не исключали возможности, что отсутствие выявляемой транскрипционной активности в зрелых чувствительных нейронах связано с особенностями линии репортерных мышей, используемой в нашем эксперименте. Однако в работах на других NF- κ B-репортерных моделях также не было описано наличия активности NF- κ B в зрелых чувствительных нейронах [5, 14]. Рассечение седалищного нерва приводило к активации транскрипционной активности NF- κ B в некоторых мотонейронах [11].

Исследования последних лет обнаружили, что опосредованный NF- κ B транскрипционный ответ включает внутриядерную модификацию самого фактора, а также участие различных белковых коактиваторов и корепрессоров [2]. Возможно, что в чувствительных нейронах спинномозговых узлов транскрипционная активность NF- κ B репрессирована действием дополнительных сигнальных каскадов, например p38 MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа) [13]. Это может указывать на то, что *in vivo* функции NF- κ B ограничены в зрелой периферической нервной системе в отличие от таковых в ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чельшев Ю.А. Факторы поддержания регенерации периферических нервных проводников. Успехи физиол. наук, 1995, т. 26, № 3, с. 57–77.
2. Ashburner B.P., Westerheide S.D. and Baldwin A.S., Jr. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. Mol. Cell. Biol., 2001, v. 21, № 20, p. 7065–7077.
3. Baldwin A.S., Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. Annu. Rev. Immunol., 1996, № 14, p. 649–683.
4. Bhakar A.L., Tannis L.L., Zeindler C. et al. Constitutive nuclear factor- κ B activity is required for central neuron survival. J. Neurosci., 2002, v. 22, № 19, p. 8466–8475.
5. Carlsen H., Moskaug J.O., Fromm S.H. et al. In vivo imaging of NF- κ B activity. J. Immunol., 2002, v. 168, № 3, p. 1441–1446.

6. Inglis J. J., Nissim A., Lees D.M. et al. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, v. 7, № 4, p. 807–816.
7. Ma W. and Bisby M.A. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res.*, 1998, v. 797, № 2, p. 243–254.
8. Memet S. NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem. Pharmacol.*, 2006, v. 72, № 9, p. 1180–1195.
9. Murphy P.G., Borthwick L.S., Johnston R.A. et al. Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J. Neurosci.*, 1999, v. 19, № 10, p. 3791–3800.
10. Pahl H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 1999, v. 18, № 49, p. 6853–6866.
11. Pollock G., Pennypacker K.R., Memet S. et al. Activation of NF-kappaB in the mouse spinal cord following sciatic nerve transection. *Exp. Brain Res.*, 2005, v. 165, № 4, p. 470–477.
12. Raivich G. and Makwana M. The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain. Res. Rev.*, 2007, v. 53, № 2, p. 287–311.
13. Saha R.N., Jana M., Pahan K. et al. MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF-kappaB in primary human astrocytes via acetylation of p65. *J. Immunol.*, 2007, v. 179, № 10, p. 7101–7109.
14. Schmidt-Ullrich R., Memet S., Lilienbaum A. et al. NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development*, 1996, v. 122, № 7, p. 2117–2128.

Поступила в редакцию 25.02.10
Получена после доработки 02.03.10

TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B (NFκB) IN POSTTRAUMATIC

SENSORY NEURONS (HISTOCHEMICAL STUDY)

S.V. Gushchina, O.V. Volkova, P.P. Kruglyakov and C.B. Magoulas

Nuclear factor kappa B (NFκB) is a ubiquitous nuclear transcription factor that regulates the expression of a number of genes involved in cell survival, immune and inflammatory processes. It has been hypothesized that after nerve injury, the release of specific cytokines may provide a stimulus for activation of the transcription factor NF-κB in adult dorsal root ganglia (DRG) neurons exerting the protective effect on the sensory neurons. However, the complexity of this transcription factor has led to some misleading conclusions about NF-κB signalling in injured DRG neurons. The goal of the present study is to find out whether NF-κB is involved in the transcriptional regulation of genes in adult primary sensory neurons after peripheral nerve transection. In this series of experiments, we used a transgenic line of NF-κB reporter mice in which activation of NF-κB drives the expression of the *lac-z* gene. We show that the expression of β-galactosidase (β-gal) is not detected in injured DRG neurons and contralateral neurons. However, a strong β-gal expression was detected in the muscle at the injury site. It may reflect the repressive influence of additional signalling cascades on NF-κB activity in sensory neurons.

Key words: *neuron, transcription factor NF-κB, dorsal root ganglion, reporter gene.*

Department of Histology and Embryology, Pediatric Faculty, Russian State Medical University, Moscow, Department of Histology, Cytology and Embryology, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Centre for Neuroscience & Trauma, Blizard Institute of Cell and Molecular Science

Barts and The London School of Medicine and Dentistry Queen Mary, University of London, London, U.K.