

of the human thalamus. New York, Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag, 1972.

19. Verhagen J.V., Giza B.K. and Scott T.R. Responses to taste stimulation in the ventroposteromedial nucleus of the thalamus in rats. *J. Neurophysiol.*, 2003, v. 89, № 1, p. 265–275.

Поступила в редакцию 19.08.09
Получена после доработки 06.03.10

QUANTITATIVE CHARACTERISTIC OF PRIMARY STRUCTURAL MODULES IN RELAY NUCLEI OF THALAMIC SENSORY SYSTEMS IN MAN

S.A. Yurieva

The module organization of neurons was studied in ventral posterior medial (VPM) and ventral posterior lateral (VPL) relay nuclei of thalamic sensory systems in adult man. Material, obtained from individuals aged 48–70 years, was fixed in 4% paraformaldehyde, sectioned at 40 μm and stained using Kluver—Barrér's method. The following parameters were deter-

mined: the numbers of neurons forming group and chain modules, profile field areas (PFA) of cell bodies of neurons forming modules, total number of satellite gliocytes and identified gliocytes (oligodendrocytes and astrocytes) in the module. Neuronal PFA was measured using digitizer on exact drawings of the cells made with the drawing device (at magnification of 1025). The data obtained were fed into the computer and processed using the program of non-parametric data analysis. Neurons, forming group and chain modules, were of medium size (201 to 350 μm^2) in both nuclei. Most of group and chain modules in human VPM and VPL thalamic nuclei consisted of 3–4 cells. In VPM nucleus, a single group module includes 8.4 satellite gliocytes, and a chain module — 8.6 gliocytes. In VPL nucleus these parameters are equal to 7.7 and 8.2, respectively. Oligodendrocyte number in the modules in VPM and VPL thalamic nuclei is 3 times greater than that of the astrocytes.

Key words: *thalamus, nuclear, structure module, morphometry.*

Laboratory of Brain Neuronal Structure, RAMS Scientific Center of Neurology, Moscow

© Коллектив авторов, 2010
УДК 575.113:611.018.8

С.В. Гуцина¹, О.В. Волкова¹, П.П. Кругляков² и К.Б. Магоулас³

КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА КАППА В (NF- κ B) В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ IN VITRO

¹ Кафедра гистологии и эмбриологии (зав. — академик РАМН проф. О.В. Волкова), педиатрический факультет, Российский государственный медицинский университет; ² кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — чл.-кор. РАМН проф. С.Л. Кузнецов), Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова; ³ Центр Нейронаук Университета Лондона (дир. — проф. Дж. Джованнони); e-mail: sguschin@mail.ru, kpp99@mail.ru, C.B.Magoulas@qmul.ac.uk

Ядерный фактор каппа В регулирует экспрессию множества анти/проапоптотических генов, в том числе и в нервных клетках. В механизме регуляции активности NF- κ B важное место занимают внутриядерные процессы ацетилирования. Цель работы — выявить транскрипционную активность NF- κ B в чувствительных нейронах *in vitro* и выяснить возможности регуляции активности NF- κ B путем модификации процессов ацетилирования с использованием трансгенной линии репортерных мышей, в которой активация NF- κ B приводит к экспрессии репортерного гена LacZ. Обнаружено, что экспрессия репортерного гена не проявлялась в трансгенных нейронах, культивируемых как в нормальной среде роста, так и после стимуляции TNF- α , но индуцировалась в большинстве нейронов при действии *in vitro* ингибитора гистоновых деацетилаз трихостатина А (TSA). Таким образом, транскрипционная активность NF- κ B ограничена в чувствительных нейронах вследствие репрессивного механизма, опосредованного гистоновыми деацетилазами.

Ключевые слова: *нейрон, транскрипционный фактор NF- κ B, репортерный ген.*

В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, направленным на изучение внутриклеточных процессов, лежащих в основе регенерации нервных проводников после травмы [9]. Известно, что некоторые цитокины, в частности группа нейротрофических факторов, необходимы как для выживания и дифферен-

цировки нейронов во время эмбриогенеза, так и для поддержания морфофункциональных свойств зрелых клеток [3, 7]. Чувствительные нейроны спинномозговых ганглиев (СМГ) отвечают усилением роста нейритов на введение в культуру наномолярных концентраций нейротрофических факторов [2].

Транскрипционный фактор — ядерный фактор каппа В (NF-κB) известен как регулятор каскадов воспаления и экспрессии различных цитокинов во многих типах клеток, в том числе в клетках нервной системы при травме [11]. NF-κB регулирует экспрессию генов многих ключевых белков в нейроне (например, NO-синтазы, калиевых каналов) и вовлечен в формирование нейропротективных механизмов ЦНС [4]. Однако имеющиеся данные об активации этого фактора в нейронах ПНС и его роли противоречивы в связи с многоуровневой системой регуляции транскрипционной активности NF-κB как в ядре, так и в цитоплазме клетки [8]. В последнее время появились работы, показывающие, что важное место в механизме регуляции активности NF-κB занимают внутриядерные процессы ацетилирования [12, 13]. Это — обратимый процесс, регулируемый группой гистоновых ацетилтрансфераз (HATs), которые способствуют ацетилированию, и гистоновых деацетилаз (HDACs), которые обеспечивают деацетилирование. Так, ацетилирование гистонов регулирует доступность NF-κB-зависимых генов, а прямое ацетилирование субъединиц NF-κB p65 и p50 регулирует транскрипционную активность, ДНК-связывающую активность и присоединение IκBα (ингибитор NF-κB) [13].

Для изучения NF-κB ранее применялись классические иммуноцитохимические методы и анализ ДНК-связывающей активности. Однако они способны лишь регистрировать наличие данного фактора в клетке. В настоящее время наиболее актуальными становятся исследования с применением линий репортерных трансгенных мышей, которые способны отражать реальную транскрипционную активность NF-κB и давать точную морфологическую картину ее распределения в клетках и тканях *in vivo* и *in vitro* путем изменения экспрессии репортерного гена.

Цель настоящей работы — выявить транскрипционную активность NF-κB в чувствительных нейронах *in vitro* с использованием трансгенной линии репортерных мышей NF-κB/LacZ и выяснить возможные пути регуляции данной активности.

Материал и методы. Трансгенная линия репортерных мышей NF-κB/LacZ предоставлена проф. Ф. Баркером (Университет Мак-Гила, г. Монреаль, Канада) и ранее описана [6]. Клетки животных этой линии экспрессировали ядерную форму репортерного гена LacZ, кодирующего фермент β-галактозидазу (β-гал) *E. coli* при активации NF-κB.

Позитивных мышей, несущих трансгенную конструкцию, идентифицировали методом полимеразной цепной реакции. Для этого геномную ДНК выделяли из биоптатов хвоста трансгенных мышей с помощью набора реагентов (Sigma, Великобритания), следуя протоко-

лу компании, и подвергали амплификации с использованием Thermo-start High Performance PCR Master Mix (ABgene, Великобритания) и праймеров к участкам 595–572 (CTTCCAGATAACTGCCGTCACCTCC) и 70–92 (CTTAATCGCCTTGCAGC ACATCC), режим нагрева: однократно 95 °C в течение 15 мин и 30 циклов 95 °C — 30 с, 60 °C — 30 с и 72 °C — 90 с.

Для получения первичной культуры чувствительных нейронов СМГ выделяли в стерильных условиях у зрелых трансгенных мышей на уровне L_{1V}–L_{4V} и помещали в среду Хэнкса (Sigma, Великобритания) на лед. Для диссоциации нейронов ганглии переносили в среду Хэнкса, содержащую 0,125% коллагеназы (Sigma, Великобритания) на 1 ч 30 мин при температуре 37 °C, промывали и помещали в свежую среду Хэнкса, содержащую 0,25% трипсина на 10 мин при 37 °C. После этого старую среду удаляли, а ганглии снова заливали средой F-12 (Sigma, Великобритания), содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку. Трипсинизированные СМГ механически диссоциировали в суспензию клеток, используя пипетку и шприц в среде F-12/DMEM, модифицированной добавлением N2, 1% альбумина (5-я фракция) и 1% раствора пенициллина/стрептомицина (все Sigma, Великобритания). Полученную клеточную суспензию наслаивали на раствор 15% бычьего сывороточного альбумина и центрифугировали 900 об/мин, 10 мин. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в среде роста и помещали на покровные стекла, предварительно обработанные полилизинем (5 мг/мл) (Sigma, Великобритания) и ламином (1 мг/мл). Плотность клеточной популяции составляла приблизительно 800 клеток/плашку. Клетки в среде роста помещали в инкубатор при 37 °C и 5% CO₂.

Для индукции активности NF-κB культуру нейронов трансгенных репортерных мышей инкубировали в течение 16 ч на стерильных покровных стеклах в нормальной среде роста, с добавлением трихостатина А (Trichostatin A — TSA, Sigma, Великобритания, 5 мкмоль) (наиболее эффективного и хорошо изученного ингибитора histone deacetylase — HDAC, способного увеличивать индуцированную активность NF-κB в разных типах клеток [13]) или олигопептида SN50 (Sigma, Великобритания, 20 мкмоль — специфического ингибитора ядерной транслокации NF-κB в разных типах клеток), а затем стимулировали TNF-α (фактор некроза опухоли-альфа) (Sigma, Великобритания) (30 нг/мл) в течение следующих 24 ч инкубации и определяли аккумуляцию β-гал методом окрашивания с X-гал (4-хлор-5-бром-3-индолил-3-β-галактозидаза) (Sigma, Великобритания).

Определение β-гал в первичной культуре чувствительных нейронов трансгенных NF-κB/LacZ репортерных мышей проводили методом окраски с X-гал [6]. Культуру нейронов на предметных стеклах фиксировали 5 мин в 0,5% глутаральдегиде на фосфатно-солевом буфере (PBS) при 4 °C и инкубировали в растворе, содержащем 80 ммоль Na₂HPO₄, 20 ммоль NaH₂PO₄, 2 ммоль MgCl₂, 0,2% Nonidet P-40, 1% диоксид хлората натрия, 5 ммоль феррицианид калия, 5 ммоль ферроцианид калия и 800 мкг/мл X-гал (Sigma, Великобритания) в течение 4–16 ч при 37 °C. Предметные стекла с клетками промывали в PBS и докрашивали с помощью красителя Nuclear Fast Red (Sigma, Великобритания).

Результаты исследования. В ходе экспериментов было обнаружено отсутствие транскрипции репортерного гена LacZ в нейронах, культивируемых в нормальной среде роста

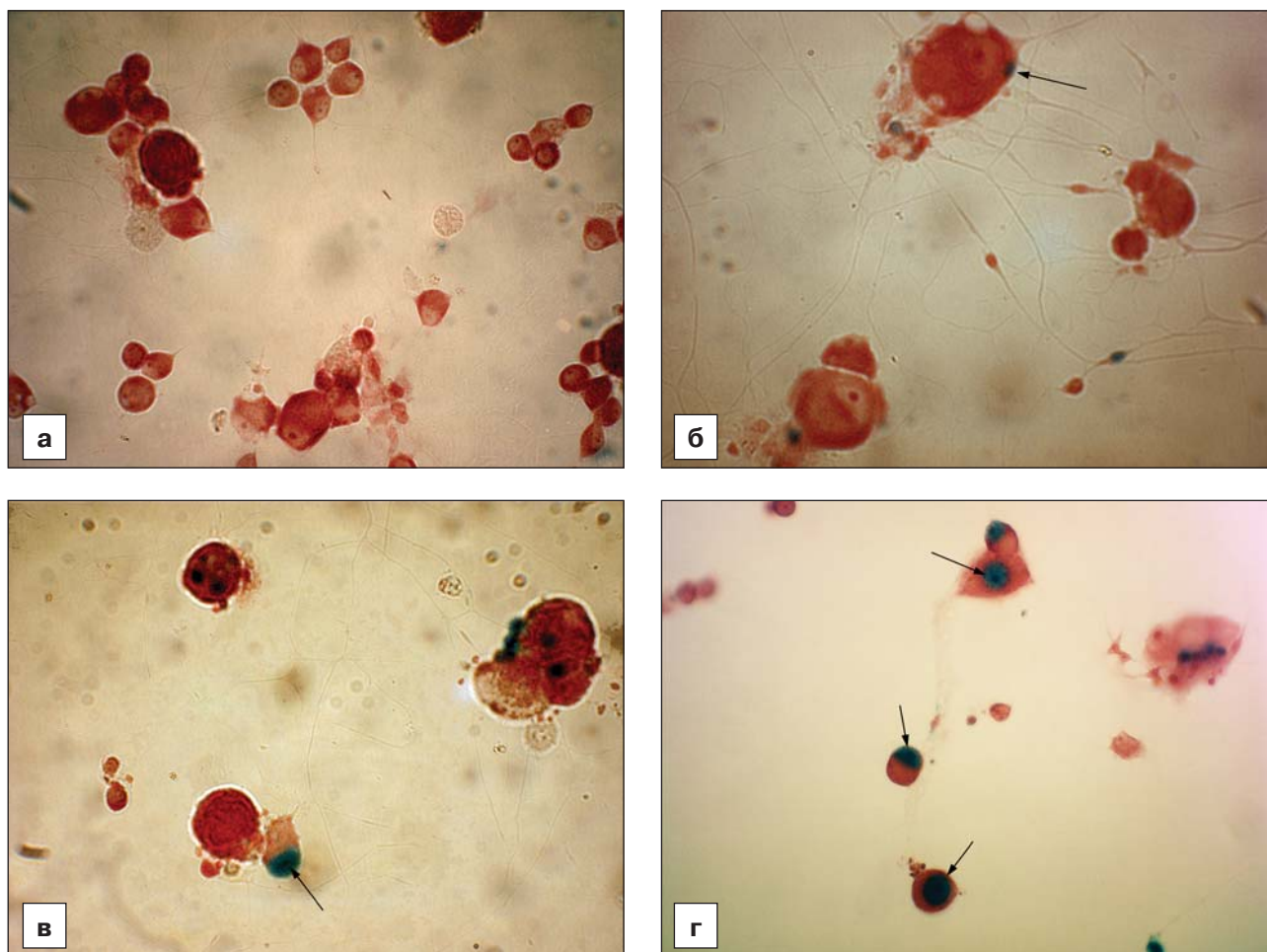


Рис. 1. Первичная культура чувствительных нейронов спинномозговых ганглиев трансгенных мышей репортерной линии NF-κB/LacZ.

а — контроль; б — при инкубации с фактором некроза опухоли α (TNF- α) (30 нг/мл) 24 ч, стрелка — β -галактозидаза (β -гал)-позитивная ненейронная клетка; в — при инкубации с трихостатином А (TSA) (5 мкмоль) 24 ч, стрелка — β -гал-позитивный нейрон; г — при одновременной инкубации с TNF- α (30 нг/мл) и TSA (5 мкмоль) 24 ч, стрелки — β -гал-позитивные нейроны. Ув. 400.

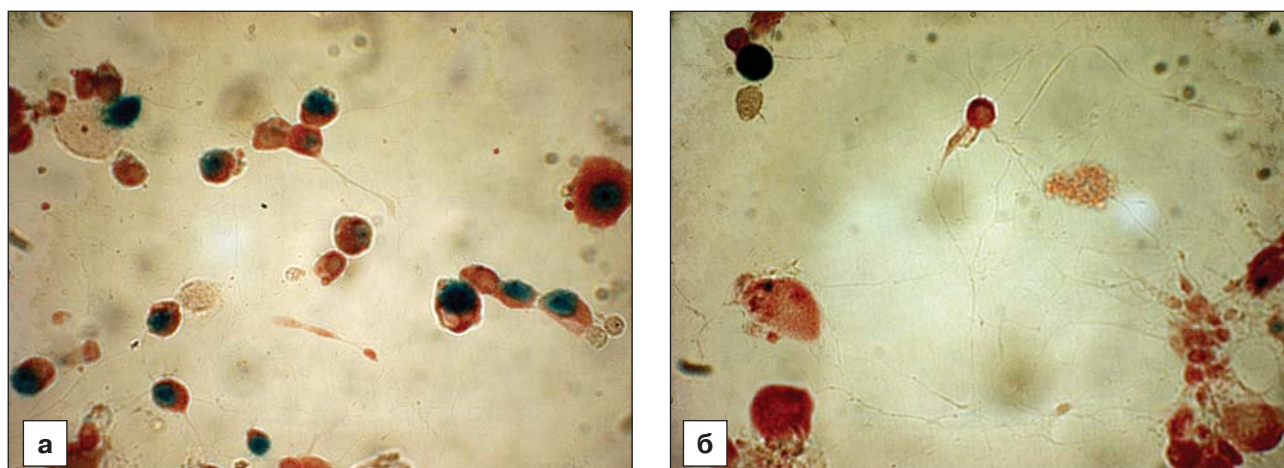


Рис. 2. SN50 элиминирует экспрессию LacZ в трансгенных чувствительных нейронах *in vitro*, индуцированную трихостатином А (TSA).

а — 16 ч преинкубации с TSA (5 мкмоль) и 24 ч инкубации с фактором некроза опухоли α (TNF- α) (30 нг/мл); б — при одновременной инкубации с SN50 (20 мкмоль), TNF- α (30 нг/мл) и TSA (5 мкмоль) 24 ч. Ув. 400.

(рис. 1, а). После стимуляции TNF- α культуры чувствительных нейронов (см. рис. 1, б) экспрессия β -гал выявлялась в большинстве ненейрональных клеток, которые окружали и были связаны с телами нейронов и могли попасть в культуру в результате неполного ресуспендирования ганглиев. Эти клетки можно идентифицировать как клетки-сателлиты, основываясь на их строении и местоположении. Однако не было выявлено значительной транскрипционной активности репортерного гена LacZ в нейронах СМГ, культивируемых с добавлением TNF- α .

В ходе исследования нами было обнаружено влияние TSA на индукцию экспрессии репортерного гена LacZ в нейронах, одновременно стимулированных TNF- α . При 24 ч инкубации культуры нейронов только с TSA лишь 3–5% клеток проявляли активность β -гал (см. рис. 1, в). Значительное количество чувствительных нейронов (20–22%) проявляли положительную реакцию при инкубации культуры нейронов с добавлением TSA и TNF- α одновременно (см. рис. 1, г). Повышение времени инкубации с TSA до 40 ч не давало никакого изменения доли проявления β -gal-положительных клеток.

Максимальный эффект TSA проявлялся при 16-часовой преинкубации культуры нейронов в присутствии TSA перед добавлением TNF- α . В этом случае практически все нейроны (приблизительно 90%) проявляли мощную ядерную активность β -гал (рис. 2, а).

Мы обнаружили, что индуцированная активность репортерного гена LacZ в трансгенных чувствительных нейронах ингибируется при добавлении в среду олигопептида SN50, специфического ингибитора ядерной транслокации NF- κ B в разных типах клеток. После проникновения в клетку SN50 маскирует последовательность ядерной локализации (nuclear-localization sequences — NLS) на NF- κ B-субъединице, необходимую для перемещения NF- κ B в ядро. Лишь единичные β -gal-положительные клетки (3%) были обнаружены при добавлении в среду SN50 одновременно с TSA и TNF- α (см. рис. 2, б). Более того, активность β -гал в чувствительных нейронах полностью исчезала при 16-часовой преинкубации культуры нейронов с SN50 перед добавлением TSA и TNF- α .

Обсуждение полученных данных. Данное экспериментальное исследование посвящено проблеме выявления транскрипционной активности NF- κ B в чувствительных нейронах в модели *in vitro*. Ранее на основании методов иммуноцитохимии и EMSA (анализ электрофоретиче-

ской подвижности фрагментов ДНК в геле) [1] показано активирование этого фактора в культуре чувствительных нейронов при действии TNF- α . Добавление TNF- α в среду роста нейронов в определенной степени имитирует условия окружения посттравматических нейронов СМГ *in vivo*, когда они подвергаются действию провоспалительных цитокинов. На основании результатов данных методов, были сделаны заключения об активации данного фактора в посттравматических нейронах СМГ.

Полученные нами результаты экспериментов *in vitro* с использованием первичной культуры чувствительных нейронов СМГ мышей трансгенной линии NF- κ B/LacZ показали, что NF- κ B не способен транскрибировать репортерный ген LacZ в нейронах в норме, что свидетельствует об отсутствии транскрипционной активности NF- κ B в чувствительных нейронах в нормальных условиях роста *in vitro*.

Известно, что ацетилирование гистонов (H3, H4), окружающих промоторы различных NF- κ B-зависимых генов, имеет важное значение для осуществления полного доступа к ним NF- κ B и других компонентов основного транскрипционного комплекса [5]. В проделанной работе продемонстрировано, что отсутствие активности NF- κ B в зрелых нейронах СМГ после действия TNF- α регистрируется в результате репрессивного механизма, регулируемого процессами ацетилирования и деацетилирования. В частности, мы показали, что TSA, являющийся ингибитором гистоновых деацетилаз, значительно усиливает индукцию активности NF- κ B, вызванную TNF- α в культуре нейронов СМГ. Наши результаты согласуются с данными других исследователей, что ингибирование гистоновых деацетилаз TSA увеличивает индуцированную активность NF- κ B в разных типах клеток [13] и изменяет уровни экспрессии около 2% генов [10], включая экспрессию NF- κ B-зависимых репортерных генов [5].

Мы показали, что наблюдаемый эффект TSA специфичен для активности NF- κ B, так как ингибитор NF- κ B — SN50 нивелирует дерепрессивное действие TSA в культуре нейронов СМГ. Эксперимент с SN50 выявил зависимость степени экспрессии репортерного гена в культуре трансгенных чувствительных нейронов от продолжительности действия ингибитора. Этот феномен находит свое объяснение, если принять во внимание следующее: деацетилирование и конденсация хроматина, окружающего промотор репортерного гена LacZ, делают невозможным экспрессию NF- κ B-зависимого гена [14], даже если NF- κ B конститутивно находится в ядре нейрона.

Добавление к клеткам TSA блокирует активность HDAC и приводит к гиперацетилированию гистонов и деконденсации хроматина, что делает промотор доступным для NF-κB и других необходимых кофакторов при стимуляции нейронов TNF-α. В это же время, IκBα входит в ядро и переносит NF-κB назад в цитоплазму. При этом новые молекулы NF-κB не могут транслоцироваться в ядро в связи с блокадой специфическим ингибитором SN50, в результате ядерный пул NF-κB истощается.

При внесении SN50, TSA и TNF-α одновременно молекулы NF-κB, конститутивно представленные в ядре, связываются с промотором репортерного гена NF-κB, в результате чего обнаруживается небольшое количество клеток, экспрессирующих β-гал в первые минуты стимуляции. В связи с присутствием ингибитора ядерная транслокация NF-κB и соответственно экспрессия β-гал прекращаются, но все еще регистрируются в единичных клетках. Однако при 16-часовой преинкубации клеток в присутствии SN50 ядерный пул NF-κB истощается, и после добавления TSA и TNF-α не наблюдается экспрессии β-гал ни в нейронах, ни в клетках-сателлитах, так как ни в ядре, ни в цитоплазме нет молекул NF-κB, способных связаться с промотором.

Эти данные подтверждают гипотезу о том, что репрессия транскрипционной активности NF-κB в зрелых чувствительных нейронах осуществляется на уровне регуляции внутриядерного ацетилирования/деацетилирования белков, что может являться уникальной характеристикой нейронов СМГ в отличие от нейронов ЦНС. Увеличение уровня ацетилирования с помощью блокатора гистоновых деацетилаз HDAC снимает репрессию репортерного гена и запускает экспрессию NF-κB-зависимого гена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гушина С.В., Магоулас К.Б., Юсаф Н. и др. Посттравматическая активность сигнальных путей ядерного фактора κB в зрелых чувствительных нейронах. Бюл. exper. биол., 2010, т. 148, № 4, с. 460–465.
2. Чалисова Н.И. и Хавинсон В.Х. Исследование цитокинов в культуре нервной ткани. Рос. физиол. журн., 1999, т. 85, № 1, с. 29–35.
3. Чумасов Е.И. и Чалисова Н.И. Современные аспекты культивирования нервных тканей. Арх. анат., 1985, т. 89, вып. 9, с. 87–93.
4. Чурилова А.В., Рыбникова Е.А., Глуценко Т.С. и др. Влияние умеренной гипобарической гипоксии в режиме преколонизации на экспрессию транскрипционных факторов pCREB и NF-κB в гиппокампе мозга крыс до и после тяжелой гипоксии. Морфология, 2009, т. 136, № 6, с. 38–42.
5. Ashburner B.P., Westerheide S.D. and Baldwin A.S. Jr. The p65 (RelA) subunit of NF-κappaB 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.
6. Bhakar A. L., Tannis L. L., Zeindler C. et al. Constitutive nuclear factor-κappa B activity is required for central neuron survival. J. Neurosci., 2002, v. 22, № 19, p. 8466–8475.
7. Davies A. M. Neurotrophins: more to NGF than just survival. Curr. Biol., 2000, v. 10, № 10, p. 374–376.
8. Lezoualc'h F. and Behl C. Transcription factor NF-κappaB: friend or foe of neurons? Mol. Psychiatry, 1998, v. 3, № 1, p. 15–20.
9. Makwana M. and Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. FEBS J., 2005, v. 272, № 11, p. 2628–2638.
10. Marks P. A., Richon V. M., Breslow R. et al. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. Curr. Opin. Oncol., 2001, v. 13, № 6, p. 477–483.
11. Mattson M. P. and Camandola S. NF-κappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. J. Clin. Invest., 2001, v. 107, № 3, p. 247–254.
12. Natoli G. Tuning up inflammation: how DNA sequence and chromatin organization control the induction of inflammatory genes by NF-κappaB. FEBS Lett., 2006, v. 580, № 12, p. 2843–2849.
13. Quivy V. and Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF-κappaB-mediated transactivation by protein acetylation. Biochem. Pharmacol., 2004, v. 68, № 6, p. 1221–1229.
14. Sacconi S., Pantano S. and Natoli G. Two waves of nuclear factor κappaB recruitment to target promoters. J. Exp. Med., 2001, v. 193, № 12, p. 1351–1359.

Поступила в редакцию 25.02.09
Получена после доработки 16.04.10

CELLULAR ASPECTS OF REGULATION OF NUCLEAR FACTOR KB (NF-κB) TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY IN SENSORY NEURONS *IN VITRO*

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

Nuclear factor κB (NF-κB) controls the expression of multiple anti/apoptotic genes, including those in the nervous cells. Intranuclear deacetylation and acetylation events are implicated in the regulation of NF-κB transcriptional activity. The goal of the work was to demonstrate the transcriptional activity of NF-κB in the sensory neurons *in vitro* and to find out whether NF-κB activity could be controlled by modification of acetylation processes, using 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 the reporter gene was absent in transgenic neurons cultured in normal growth medium or stimulated by TNF-α. However, NF-κB transcriptional activity in most neurons was induced by *in vitro* exposure to Trichostatin A, which is a specific inhibitor of histone deacetylases. Taken together our results show that the transcriptional activity of NF-κB is limited in sensory neurons due to a transcriptional repression mechanism mediated by histone deacetylases.

Key words: neuron, transcription factor NF-κB, 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, Blizzard Institute of Cell and Molecular Science, Barts and The London Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, University of London, London, U.K.