

УДК 612.83:591.1 : 57.045:616.74 – 007.43

ПОЛНОГЕНОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ПОЯСНИЧНОМ ОТДЕЛЕ СПИННОГО МОЗГА МЫШИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭФФЕКТОВ НЕВЕСОМОСТИ

© 2011 г. Р. Р. Исламов, А. А. Ризванов, О. В. Тяпкина, Б. С. Шенкман,
член-корреспондент РАН И. Б. Козловская, член-корреспондент РАН Е. Е. Никольский,
академик А. И. Григорьев

Поступило 18.04.2011 г.

В космосе или в условиях моделирования невесомости на Земле в организме человека развиваются как адаптивные, так и патологические нарушения, затрагивающие разные функциональные системы. Одним из наиболее ярких проявлений воздействия невесомости является гипогравитационный двигательный синдром, который характеризуется изменениями морфологических (атрофия, искажения фенотипа мышечных волокон) и функциональных (снижение тонуса и силы, повышение утомляемости) свойств скелетных мышц [1, 2]. Механизмы возникновения этих изменений в скелетных мышцах в условиях невесомости на сегодняшний день изучены недостаточно. Есть основания полагать, что один из факторов, инициирующих развитие гипогравитационного двигательного синдрома, имеет невральное происхождение [3]. Для установления механизмов развития патологических изменений в нервно-мышечной системе требуются комплексные молекулярные исследования, в том числе и на генетическом уровне. В этом плане представляется перспективным исследование транскриптома спинного мозга животных, находившихся в условиях реальной или смоделированной невесомости на Земле. Решение этой задачи представляется вполне реальным, поскольку интенсивное развитие технологической матричной гибридизации (гибридизация *in situ*, макро- и микроаррей-технологии для скрининга генов) позволило создать коммерческие чипы, содержащие полный набор генов, или части генома, необходимые для решения конкретной задачи.

*Казанский государственный медицинский университет
Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра Российской Академии наук
Институт медико-биологических проблем
Российской Академии Наук, Москва*

Расшифровка генетического кода мыши в 2002 г. открыла уникальную возможность проведения полногеномных исследований биологических объектов на клеточном, тканевом или органном уровнях после экспериментальных воздействий на целый организм (Sanger Mouse Genomes Project, <http://www.sanger.ac.uk/modelorgs/mouse-genomes/>). Исследования, проводимые на мышах, свидетельствуют, что мышь – вполне приемлемая модель для изучения патогенеза заболеваний человека, поскольку геномы мыши и человека совпадают примерно на 80%. Следовательно, данные, полученные в опытах на мышах об экспрессии генов, могут быть с достаточной вероятностью применены к человеку. В последнее время произошел существенный прогресс в геномике микрогравитации, однако исследования генома преимущественно были сфокусированы на костной ткани, скелетной мышце и иммунной системе [4].

В настоящей работе нами было впервые выполнено полногеномное исследование экспрессии генов (с помощью чипа MouseRef-8, Illumina) в поясничном отделе спинного мозга мышей после 30 сут антиортостатического вывешивания. Половозрелых мышей-самцов c57black/6 массой 25 г подвешивали за хвост, создавая условия, позволяющие животным опираться только на передние лапы ($n = 4$) [5]. Контрольная группа мышей ($n = 4$) находилась в стандартных условиях содержания лабораторных животных. Через 30 сут подопытных и контрольных мышей наркотизировали и выделяли поясничный отдел спинного мозга. Все процедуры с животными, проведенные в соответствии с международными биоэтическими нормами [6], были одобрены Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике (протокол № 279 от 17 января 2011 г.).

Определение уровня экспрессии мРНК конкретных генов с помощью чипа MouseRef-8 в поясничном отделе спинного мозга мышей.

Таблица 1. Результаты анализа экспрессии мРНК генов с помощью микрочипов MouseRef-8 gene expression array ("Шумина"). Данные представлены в виде среднего арифметического значения уровня экспрессии гена \pm стандартное отклонение ($M \pm s$). К/О – отношение уровня экспрессии гена в контрольной группе мышей к уровню экспрессии в экспериментальной группе. p – статистическая значимость различий

Ген	GeneBank, №	Экспрессируемый продукт	Опыт	Контроль	К/О	p
MPZ	NM_008623.2	Белок миелина 0	154.3 \pm 97.8	1144.0 \pm 261.1	7.4	<0.01
PMP22	NM_008885.1	Белок 22 периферического миелина	190.1 \pm 62.3	824.4 \pm 199.3	4.3	<0.01
PLEKHA4	NM_148927.1	Белок, содержащий гомологичный плекстрину домен (специфически связывающий фосфоинозитид); семейство А, член 4	103.9 \pm 30.6	450.1 \pm 174.4	4.3	0.01
PMP2	NM_001030305.2	Белок 2 периферического миелина	86.5 \pm 32.1	325.4 \pm 128.5	3.8	0.01
MFAP5	NM_015776	Ассоциированный с микрофибриллами белок 5	68.2 \pm 8.1*	191.3 \pm 33.4	2.8	<0.01
DHH	NM_007857	Desert hedgehog (ушастый еж)	81.6 \pm 7.5	224.8 \pm 33.9	2.8	<0.01
OGN	NM_008760.2	Остеоглицин	76.9 \pm 10.5	207.7 \pm 39.7	2.7	<0.01
IGF2	NM_010514.1	Фактор роста инсулиноподобный 2	340.7 \pm 64.2	884.9 \pm 442.1	2.6	0.05
MGLAP	NM_008597.2	Белок матрикса Gla	155.9 \pm 17.5	329.4 \pm 117.1	2.1	0.03
UACA	NM_0028283	Увальный аутоантиген, содержащий спирализованные домены и повторы анкирина	169.2 \pm 26.2	346.2 \pm 93.8	2.0	0.01
CD9	NM_007657.2	Антиген CD9	353.2 \pm 69.6	704.8 \pm 127.0	2.0	0.01
THEM5	NM_025416.1	Надсемейство тиоэстераз, член 5	72.4 \pm 6.9*	141.1 \pm 25.9	1.9	<0.01
CLDN19	NM_001038590.1	Клаудин 19 (транскрипционный вариант 1)	69.1 \pm 8.4*	133.8 \pm 42.9	1.9	0.03
DRP2	NM_010078.1	Относящийся к дистрофину белок 2	102.5 \pm 8.3	196.3 \pm 38.0	1.9	<0.01
VIM	NM_011701.3	Виментин	143.9 \pm 15.9	275.1 \pm 84.7	1.9	0.03
PRX	NM_198048.1	Периаксин (транскрипционный вариант 1)	75.0 \pm 10.7	142.0 \pm 24.4	1.9	<0.01
CATNAL1	NM_018761.2	Катенин (связанный с кадгерин белок), альфа-подобная цепь 1	184.3 \pm 18.7	348.6 \pm 23.9	1.9	<0.01
RIKEN	NM_145555	кДНК A330049M08 и A330049M08RIK гена RIKEN	84.8 \pm 6.8	159.7 \pm 42.7	1.9	0.02

Таблица 1. Окончание

Ген	GeneBank, №	Экспрессируемый продукт	Опыт	Контроль	К/О	p
SMTN	NM_013870.1	Смуфелин	89.2 ± 7.0	166.6 ± 26.0	1.9	<0.01
АННАК	NM_009643.1	Десмойкин (нуклеопротеин АННАК) (транскрипционный вариант 1)	87.8 ± 7.4	162.5 ± 40.7	1.8	0.01
IFITM2	NM_030694.1	Индукцированный интерфероном трансмембранный белок 2	142.2 ± 17.7	250.5 ± 75.4	1.8	0.04
ENO3	NM_007933.2	Енолаза 3; бета, мышечная	84.6 ± 5.7	146.3 ± 48.1	1.7	0.05
COL4A1	NM_009931.1	Проколлаген IV, цепь "альфа 1"	120.3 ± 7.4	206.6 ± 18.1	1.7	<0.01
HSPG2	NM_008305.2	Перлекан (гепарансульфат протеогликан 2)	78.3 ± 3.5*	133.6 ± 20.7	1.7	<0.01
IFITM3	NM_025378.1	Индукцированный интерфероном трансмембранный белок 3	193.2 ± 24.7	329.5 ± 87.9	1.7	0.03
SPON2	NM_133903.2	Белок межклеточного матрикса спондин 2	88.0 ± 8.7	149.2 ± 43.6	1.7	0.04
S100A11	NM_016740.3	Кальгиззарин (кальций-связывающий белок A11 типа S100)	143.9 ± 26.6	243.7 ± 56.8	1.7	0.03
IGFBP6	NM_008344.1	Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 6	73.3 ± 3.6*	123.0 ± 39.1	1.7	0.05
PLEKHA4	NM_148927.1	Белок, содержащий гомологичный плекстрину домен (специфически связывающий фосфоинзитид); член семейства А	69.0 ± 1.6*	109.8 ± 13.6	1.6	<0.01
ANXA3	NM_013470.1	Аннексин А3	186.7 ± 16.0	296.2 ± 19.6	1.6	<0.01
SMTN	NM_013870.1	Смуфелин	74.9 ± 3.3*	118.1 ± 22.3	1.6	0.01
VWF	NM_011708.2	Гомолог фактора фон Виллебранда	100.8 ± 12.4	156.1 ± 42.8	1.5	0.05
IGFBP7	NM_008048.1	Связывающий инсулиноподобный фактор роста белок 7	120.6 ± 14.2	184.7 ± 44.0	1.5	0.04
PLEKHG2	NM_138752.1	Белок, содержащий гомологичный плекстрину домен (с доменом rhogef); семейство G, член 2	103.0 ± 9.8	157.4 ± 11.9	1.5	<0.01
UTS2	NM_011910.1	Уротензин 2	331.8 ± 82.4	506.7 ± 53.2	1.5	0.02
PRX	NM_019412.1	Периаксин (транскрипционный вариант 2)	65.6 ± 3.4*	99.3 ± 7.4	1.5	<0.01
LOX	NM_010728.1	Лизилоксидаза	64.6 ± 6.1*	97.1 ± 15.5	1.5	0.01
CNNM2	NM_033569.1	Циклин М2 (бивалентный транспортер катионов)	266.5 ± 17.4	141.9 ± 21.4	0.5	<0.01

* Экспрессия мРНК гена на уровне базового фонового уровня микроципа.

Общую РНК выделяли из спинного мозга мышей с помощью набора RNaseasy Kit в соответствии с инструкциями фирмы-производителя ("Qiagen") и определяли ее количество с помощью прибора Nanodrop ("Thermo Scientific"). РНК также характеризовали с помощью чипов Agilent RNA 6000 Nano Kit в соответствии с инструкциями фирмы-производителя ("Agilent"). 400 нг выделенной РНК использовали для амплификации с помощью набора Illumina® TotalPrep™ RNA Amplification Kit ("Ambion"). Полногеномное исследование экспрессии мРНК (транскриптома) в поясничном отделе спинного мозга мышей проводили с помощью чипа Illumina MouseRef-8 v.2 Expression BeadChips, позволяющего одновременно анализировать 8 образцов на одном чипе и получать информацию об экспрессии 25 697 транскриптов, аннотированных в базе данных RefSeq и представляющих 16 948 уникальных гена из базы данных NCBI RefSeq (Build 36.2, Release 22) [7]. Эксперименты были выполнены в соответствии с инструкциями фирмы-производителя (Illumina). Анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета GenomeStudio software ("Illumina") и Microsoft Office Excel 2007. Данные были нормализованы с помощью алгоритма quantile [8]. Значимыми считались различия уровня мРНК в ≥ 1.5 раза при уровне статистической достоверности $p \leq 0.05$.

После 30 сут антиортостатического вывешивания сравнительный анализ транскриптом выявил изменения в экспрессии некоторых генов у подопытных животных по сравнению с контрольными (табл. 1). Статистически достоверные различия были обнаружены в экспрессии 38 генов, из которых у 37 генов имело место подавление экспрессии, а для одного гена – усиление. Установлено достоверное уменьшение мРНК генов, кодирующих белки миелина (MPZ, PMP2, PMP22, C1orf130, PRX), молекулы внеклеточного матрикса (MFAP5, MGLAP, OGN, COL4A1, HSPG2, LOX), цитоскелета и клеточной адгезии (VIM, DRP2, CLDN19, CD9, SPON2, SMTN), внутриклеточных сигнальных каскадов (PLEKHA4, CTNLI1, S100A11, ANXA3, UACA), транспорта нейромедиаторов (SLC6A13), а также факторов роста (IGF2, IGF6) и морфогенетических белков (DHH). Усиление экспрессии установлено для гена CNNM2 (трансмембранный переносчик двухвалентных катионов).

С позиции углубления наших представлений о патогенезе двигательных нарушений в условиях гипогравитации особый интерес представляют данные о снижении в группе подопытных животных экспрессии пяти генов, ответственных за образование миелиновой оболочки. Известно, что нарушение миелинизации сопровождается замедлением скорости проведения возбуждения по аксонам, что приводит к изменению характери-

стик паттернов нервных импульсов, имеющих отношение к реализации нейротрофического контроля скелетной мышцы со стороны мотонейронов [9]. Эти данные дают серьезное основание думать, что снижение уровня мРНК генов, кодирующих белки миелина, может сопровождаться нарушением миелинизации в ЦНС и являться одним из факторов, лежащих в основе развития гипогравитационного двигательного синдрома.

Следует также отметить снижение уровня экспрессии мРНК генов, кодирующих молекулы внеклеточного матрикса. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными об уменьшении средних значений площадей поперечных срезов поясничного отдела спинного мозга на 14.5% и содержания общего белка на 21% [3]. Возможно, утолщение поясничного отдела спинного мозга становится менее выраженным вследствие дефицита протеогликанов, что в свою очередь приводит к снижению объема межклеточной жидкости.

Очевидно, что для подтверждения полученных данных об активности генов в поясничном отделе спинного мозга мышей в условиях смоделированной невесомости необходимо провести дополнительные исследования экспрессии выявленных генов-мишеней с помощью микроаррея, полимеразной цепной реакции в реальном времени и вестерн-блоттингом, после чего можно будет делать утвердительные заключения об участии тех или иных генов в патогенезе гипогравитационного двигательного синдрома. Тем не менее ценность полногеномного скрининга экспрессии генов в настоящем исследовании заключается в установлении потенциальных генов, вовлеченных в развитие патологических изменений со стороны нервно-мышечной системы в условиях невесомости.

Авторы выражают благодарность коллективу ЗАО "Геноаналитика", а также сотрудникам ГНЦ РФ ИМБП РАН Н.М. Фокиной и А.А. Ивановой за помощь в выполнении экспериментов.

Исследование поддержано грантами: РФФИ 10-04-01423-а (Исламов Р.Р.), ФЦП № 02.740.11.0302, № 14.740.11.0177, № 16.512.11.2101 (Исламов Р.Р.), Президента РФ ИШ-64631.2010.7. (Никольский Е.Е.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fitts, R. H., Riley D. R., Widrick J.J.* // J. Appl. Physiol. 2000. V. 89. № 2. P. 823–839.
2. *Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С.* // Рос. физиол. журн. 2004. Т. 90. № 5. С. 508–521.
3. *Islamov, R.R., Mishagina E.A., Tyapkina O.V., et al.* // Acta Astronaut. 2011. V. 68. P. 1469–1477.
4. *Nichols, H.L., Zhang N., Wen X.* // Physiol. Genomics. 2006. V. 26. № 3. P. 163–171.
5. *Morey-Holton E.R., Globus R.K.* // J. Appl. Physiol. 2002. V. 92. № 4. P. 1367–1377.

6. *Генин А.М., Ильин А.Е., Капланский А.С. и др.* // Авиакосм. и экол. медицина. 2001. Т. 4. С. 14–20.
7. *Pruitt K.D., Tatusova T., Maglott D.R.* // Nucl. Acids. Res. 2007. V. 35. Database issue D. 61–65.
8. *Schmid R., Baum P., Ittrich C., et al.* // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 349.
9. *Резвяков Н.П., Никольский Е.Е.* // Физиол. журн. СССР. 1978. Т. 64. № 8. С. 1117–1123.