

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Болдирєв Олексій Ігорович

УДК 577.352:577.218

**ЕКСПРЕСІЯ ТА ФУНКЦІЯ НИЗЬКОПОРОГОВИХ КАЛЬЦІЄВИХ
КАНАЛІВ У ТАЛАМУСІ ТА СОМАТОСЕНСОРНІЙ КОРІ ГОЛОВНОГО
МОЗКУ ЩУРІВ В ОНТОГЕНЕЗІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ
АБСАНСНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ**

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Міжнародному центрі молекулярної фізіології НАН України

- Науковий керівник:** - доктор біологічних наук, професор
Шуба Ярослав Михайлович,
Міжнародний центр молекулярної
фізіології НАН України, заступник
директора
- Офіційні опоненти:** - доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович
в. о. завідувача кафедри біофізики ННЦ
«Інститут біології» Київського
національного університету імені Тараса
Шевченка
- доктор біологічних наук, професор
Філоненко Валерій Вікторович
завідувач відділу сигнальних систем
клітини Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України

Захист відбудеться «21» червня 2016 р. о 16.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті www.biph.kiev.ua/Спеціалізована_вчена_рада

Автореферат розісланий «20» травня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



к. б. н О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми

Потенціалкеровані кальцієві канали є родиною іонних каналів, воротний механізм яких спрацьовує під впливом змін трансмембранного потенціалу. Вхід іонів кальцію через ці канали призводить до функціональної відповіді клітин, що виражається в генерації потенціалів дії в нейронах та міоцитах, екзоцитозі, скороченні м'язів, специфічній експресії генів, тощо [Zamponi, 2015].

Підродина низькопорогових потенціалкерованих кальцієвих каналів (НПКК) ссавців, яку ще називають каналами Т-типу, кодується трьома генами – *Cacna1g*, *Cacna1h* і *Cacna1i*, які відповідають за експресію трьох ізоформ основної пороформууючої $\alpha 1$ -субодиниці цих каналів – $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ $Ca_v3.3$. Ці канали диференційовано представлені в багатьох типах клітин по всьому організму людини і ссавців, але всі одночасно вони у визначених пропорціях присутні лише у різних нейронах головного мозку. Зокрема, важлива роль Т-каналів виявлена в таламусі, де вони беруть участь у генерації ритмічної електричної активності нейронів, що відповідає за переключення періодів сну й неспання [Bessaïh et al., 2008]. Т-канали мають найменшу провідність щодо іонів кальцію серед усіх потенціал керованих кальцієвих каналів, що може вказувати на їх залучення в більш тонку "настройку" кальційзалежних клітинних процесів, порівняно з іншими "постачальниками" і джерелами внутрішньоклітинного кальцію [Perez-Reyes, 2003].

НПКК відзначаються вкрай складним патерном експресії генів, який не тільки є тканиноспецифічним, а і може змінюватися у часі та просторі в залежності від онтогенезу, фізіологічного стану клітини та при патологіях. Більше того, поряд з такими іонними каналами, як серцевий калієвий канал HERG чи потенціалкеровані натрієві канали, НПКК привертають до себе все більше уваги, як важливі детермінанти каналопатій – патологічних станів, які специфічно пов'язані з дисфункцією тих чи інших іонних каналів. З того, що вже відомо про функції Т-каналів, зрозуміло, що вони задіяні: 1) в тонкій регуляції мембранного потенціалу клітин та ритмогенезі в мозку та серці; 2) у постачанні іонів кальцію в клітину, які в якості вторинних посередників беруть участь у регуляції вивільнення додаткової кількості кальцію з цистерн ендоплазматичного ретикулуму, стимуляції синаптичної передачі, активації експресії генів тощо. Тому вивчення цих каналів є вкрай важливим для розуміння внутрішньоклітинної сигналізації та побудови моделі впливу іонів кальцію на молекулярні процеси в клітині.

Дисфункція НПКК в значній мірі визначає етіологію таких патологічних станів як епілепсія, біль, серцево-судинні захворювання, рак. Мутації в генах Т-каналів корелюють з такими захворюваннями як епілепсія з абсансами, аутизм [Splawski et al., 2006], гіперальдостеронізм [Scholl et al., 2015], патологічний біль [Waxman and Zamponi, 2014], деякі види раку [Gackière et al., 2013; Dziegielewska et al., 2014].

Дитяча абсансна епілепсія людини – це поширене захворювання, на яке страждають близько 0,05% дітей по всьому світу [Callenbach et al., 1998]. Вона характеризується наявністю абсансів – коротких (4-20 секунд) періодів несвідомості, які можуть повторюватися в пацієнта від 5 до 100 разів на день. Значна кількість пацієнтів видужує після віку 15-17 років без терапії або внаслідок лікування анти-епілептичними препаратами [Berg et al., 2014]. Проте в інших пацієнтів абсанси змінюються конвульсивними формами епілепсії після настання пубертатного періоду [Vouma et al., 1996]. Етіологія абсансної епілепсії залишається невідомою, хоча виявлені генетичні кореляції захворювання з декількома нуклеотидними поліморфізмами в генах Т-каналів. Також на зв'язок НПКК з абсансною епілепсією вказують дослідження на тваринних моделях цього захворювання [Tsakiridou et al., 1995], участь НПКК-залежної таламічної активності у нападах [Lujtelaar, 2003], і те, що деякі антиепілептичні препарати є блокаторами Т-струму [Broicher et al., 2007]. Але яким саме чином Т-канали залучені в етіологію абсансної епілепсії, залишається невідомим.

Інбредна лінія щурів WAG/Rij є загально визнаною спадковою моделлю абсансної епілепсії з високим ступенем відповідності захворюванню людини. Абсанси в щурів лінії WAG/Rij за електроенцефалографічними показниками та чутливістю до антиепілептичних препаратів досить повно відповідають абсансам у дітей [Lujtelaar, 2003]. Разом з тим відоме тільки одне дослідження, в якому вивчалися функція і експресія генів НПКК у сітчастому та бічному колінчастому ядрі таламусу в цій моделі абсансної епілепсії [Broicher et al., 2008]. Також залишається невідомою роль Т-каналів у первинному джерелі генерації абсансної активності в щурів лінії WAG/Rij, що встановлене в соматосенсорній корі, яка представляє верхню губу та вібриси [Meeren et al., 2002].

Відсутність надійних селективних фармакологічних активаторів та блокаторів окремих підтипів Т-каналів та всієї підродини утруднює пошук лікарських засобів для корекції патологічних станів, пов'язаних з дисфункцією кальцієвих каналів Т-типу. Саме тому актуальним є пошук внутрішніх клітинних механізмів, які впливають на посилення чи послаблення активності НПКК. До таких механізмів належить регуляція експресії генів каналів Т-типу за допомогою транскрипційних факторів [Trimarchi et al., 2009]. Зараз вже очевидно, що подібний вплив можуть здійснювати й ендогенні малі інтерференційні РНК. Проте досі нема літературних даних щодо взаємодії таких малих РНК з мРНК Т-каналів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконувалася в рамках фундаментальної теми № 0110U006269 «Іонні канали та кальцієвий гомеостаз як мішені модуляторного впливу ендогенних та екзогенних біологічно активних речовин»

Метою дослідження було виявити зміни експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі та сомато-сенсорній корі

щура під час нормального онтогенезу та в спадковій моделі абсансної епілепсії – лінії щурів WAG/Rij, з'ясувати потенційні механізми регуляції їх експресії та провести кореляцію між профілями експресії каналів, функціональними характеристиками нейронів і вираженістю епілептичного фенотипу.

Задачі дослідження:

1. Дослідити нейрон-специфічну експресію генів, що кодують $\alpha 1$ -субодиниці $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ низькопорогових кальцієвих каналів, у гальмівних ГАМК-ергічних та збуджувальних глутаматергічних нейронах таламуса та порівняти її з електрофізіологічними характеристиками цих нейронів
2. Дослідити зміни експресії генів, що кодують $\alpha 1$ -субодиниці $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ низькопорогових кальцієвих каналів, у тканині таламусу щурів різного віку
3. Визначити рівень експресії мРНК кальцієвих каналів Т-типу в таламусі та сомато-сенсорній корі щурів лінії WAG/Rij та дослідити Т-струми в нейронах цих ділянок мозку.
4. Оцінити можливий вплив мікроРНК на експресію Т-типу кальцієвих каналів

Об'єкт дослідження – низькопорогові кальцієві канали в нейронах головного мозку щурів

Предмет дослідження – кальцієві струми, рівень експресії мРНК і білка низькопорогових кальцієвих каналів в нервовій тканині та окремих нейронах таламуса і соматосенсорної кори щурів ліній Wistar WAG/Rij різного віку.

Методи дослідження. **Біофізичні:** електрофізіологічне вимірювання струмів через мембрану клітини, метод «петч-клемп», електрофорез ДНК і білків; **біохімічні та імунохімічні:** виділення окремих клітин з ядер таламусу та кори головного мозку щура, виділення РНК з нервової тканини головного мозку, виділення білків з нервової тканини, імунохімічне визначення білків методом «вестерн-блот»; **молекулярно-біологічні:** зворотна транскрипція із полімеразною ланцюговою реакцією, полімеразна ланцюгова реакція для кДНК з однієї клітини, кількісна полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР у реальному часі); **біоінформаційні:** пошук сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК у відкритих базах даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі:

- вперше проведено дослідження експресії мРНК низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі на різних етапах онтогенезу і встановлено, що різні субодиниці кальцієвих каналів Т-типу змінюють свою експресію в таламусі та соматосенсорній корі головного мозку в процесі розвитку організму щура,
- встановлено зміни експресії мРНК і білка низькопорогових кальцієвих каналів у соматосенсорній корі щурів зі спонтанними абсансами, зокрема

збільшення кількості мРНК і білка каналу $Ca_v3.1$ у соматосенсорній корі щурів лінії WAG/Rij і пов'язано це збільшення з абсансним фенотипом.
 - вперше виявлено посттранскрипційну регуляцію мРНК низькопорогового кальцієвого каналу $Ca_v3.2$ за допомогою мікроРНК gno-miR-1 в корі головного мозку та таламусі щура.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в дисертації результати можуть бути використані для подальших досліджень біофізичних і молекулярних механізмів, що лежать в основі залежних від віку особливостей регуляції концентрації іонів кальцію в нейронах таламусу, а також патогенезу абсансної епілепсії. Знання щодо зміни експресії низькопорогових кальцієвих каналів розширюють уявлення про їхню роль у формуванні нервової системи і можуть бути використані при пошуку нових регуляторів транскрипції і трансляції T-каналів. Результати дисертації також можуть бути використані при розробці терапевтичних засобів лікування патологій, пов'язаних з гіперактивністю низькопорогових кальцієвих каналів.

Особистий внесок здобувача. Головна ідея та задачі досліджень були сформульовані науковим керівником д.б.н., проф. Шубою Я.М. Аналіз літературних даних, проведення біофізичних експериментів на поодиноких нейронах таламусу, вивчення експресії мРНК у тканині та окремих клітинах, імунохімічний аналіз вмісту білка, а також статистична обробка та аналіз одержаних результатів проводилися дисертантом самостійно. Автор висловлює щире подяку к.б.н. О.К. Щегловітову і д.м.н. В.Є. Досенку за допомогу в оволодінні методиками, а також Б.Р. Шаропову, К.Л. Гулак, Н.Л. Штефан, М.Ю. Батюку, Д.О. Дринь, к.б.н. О.В. Дергаю, к.б.н. М.В. Дергаю, к.б.н. О.П. Любановій за допомогу в експериментах, аналізі та інтерпретації отриманих результатів, формулюванні основних положень та підготовці матеріалів до друку.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи було представлено на семінарах Сектору нейрофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця (2005, 2011, 2012, 2015) та наступних наукових конференціях: Physiological society International Workshop on Molecular Physiology of Membrane Transport and Cellular Signalling (Яремче, 2007), 7th FENS forum of European neuroscience, (Амстердам, Нідерланди, 2010), The Bridges in Life Sciences 6th Annual Scientific Meeting, (Братислава, Словаччина, 2011), 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine" (Турин, Італія, 2011), V З'їзд Українського біофізичного товариства, (Луцьк, 2011), V Congress of Ukrainian Society for Neuroscience (Київ, 2011), III Конгрес фізіологів СНГ, (Ялта, 2011), VI конгрес патофізіологів України, (Місхор, 2012), I і III Всеукраїнські конференції молодих вчених "Фізіологія: від молекул до організму"(Київ, 2011, 2013), XI міжнародна наукова

конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 2015).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт, у тому числі 5 статей у наукових журналах.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, експериментальних результатів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 108 сторінках стандартного тексту. Вона містить 25 рисунків та 1 таблицю. Список використаної літератури охоплює 123 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали і методи досліджень

Всі дослідження проводилися на щурах ліній Wistar WAG/Rij, що утримувалися у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Для дослідження використовувалися самці щурів віком 1, 5, 10, 15, 25, 30 постнатальних днів, а також 3 і 6 місяців.

Тканину головного мозку виділяли для дослідження окремих нейронів, виділення тотальної РНК або білку. Для різних досліджень відбирали ситчасте та латеродорзальне ядро таламуса, зону соматосенсорної кори, яка відповідає за верхню губу та вібриси ("кортикальний фокус"). Для дослідження мРНК і мікроРНК виділяли тотальну РНК з тканин мозку.

Для подальшої ампліфікації отримували на основі РНК компліментарну до неї кДНК за допомогою методу зворотної транскрипції з оліго-дТ та випадковими гексамерними праймерами. Для отримання кДНК з мікроРНК gno-mir-1 зворотну транскрипцію ставили зі спеціальними «петлевими праймерами» [Kramer et al., 2011].

Якісний склад мРНК трьох субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів визначали за допомогою стандартної полімеразної ланцюгової реакції. Кількість мРНК визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Склад мРНК окремих нейронів визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції поодиноких клітин (методика "single-cell RT-PCR").

Для виявлення білку $Ca_v3.1$ у тканині соматосенсорної кори використовували імунохімічний метод "вестерн-блот". Білок визначали за допомогою специфічних первинних і вторинних антитіл.

Кальцієвий струм через низькопорогові кальцієві канали вимірювали за допомогою методу «петч-клемп» у конфігурації «ціла клітина». Виміри здійснювали у спеціальній камері під візуальним контролем через

інвертований фазово-контрастний мікроскоп, а також при постійній заміні рідкого середовища навколо клітин завдяки системі зміни розчинів.

Для біонформаційного пошуку сайтів для мікроРНК використовували сервіс TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), якість спарювання для знайдених сайтів перевіряли, використовуючи програму RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>).

Результати досліджень та їх обговорення

Модифікація методу полімеразної ланцюгової реакції для оцінки експресії генів у окремих нейронах. Для визначення складу ізоформ $\alpha 1$ -субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів ми розробили модифікацію полімеразної ланцюгової реакції після зворотної транскрипції – ПЛР для однієї клітини. Теоретична роздільна здатність ПЛР становить 1 молекулу ДНК, тому принципових заперечень для ампліфікації кДНК, отриманої з мРНК однієї клітини (від десятків до тисяч молекул одного типу) не існує. Головною методичною складністю є відбір та збереження РНК та кДНК до початку ПЛР. Для роботи із гостро ізольованими нейронами ми модифікували варіант методу, що застосовувався Takazawa [Takazawa et al, 2004]. Спочатку клітину після вимірювання струмів засмоктували у додаткову скляну мікропіпетку діаметром 8-16 мкм, що містила дистильовану воду із інгібітором РНКаз. Вміст мікропіпетки об'ємом 1-5 мкл додавали до заздалегідь приготованої суміші, що містила буферний розчин для зворотної транскрипції, дНТФ, оліго-дТ та випадковий гексамерний праймери. Реакція зворотної транскрипції ставилася негайно після додавання ревертази, без стадії виділення РНК. Після неї ставили першу ПЛР із сумішшю праймерів до досліджуваних кДНК, а далі другу вже для кожної пари праймерів окремо. Проте об'єм реакції було дуже складно контролювати, а від'єднання вимірювального електроду та додатковий час для засмоктання більшою мікропіпеткою могло призводити до втрати частини мРНК та до забруднення проби зовнішньою РНК. Для подолання цієї проблеми було порівняно клітини, відібрані до мікропіпетки, заповненої деіонізованою водою та у внутрішньоелектродному розчині, що містив 125 мМ іонів цезію та 10 мМ іонів тетраетиламонію. Таке порівняння не виявило різниці у експресії β -актину в обох варіантах процедури відбору. Таким чином, подальші забори клітин здійснювали прямо у вимірювальний скляний електрод.

З метою запобігти ампліфікації геномної ДНК було використано праймери, що гібридизуються із матрицею на стику екзонів кДНК. Такі праймери добре паруються із кДНК, яка отримана шляхом зворотної транскрипції зрілої процесованої мРНК. При цьому вони мають неспарену ділянку на 3'-кінці відповідної геномної ДНК, яка містить послідовності інтронів, тому приєднання ДНК-полімерази і подальша ампліфікація ДНК, що використовує геномну ДНК як матрицю, стає неможливою.

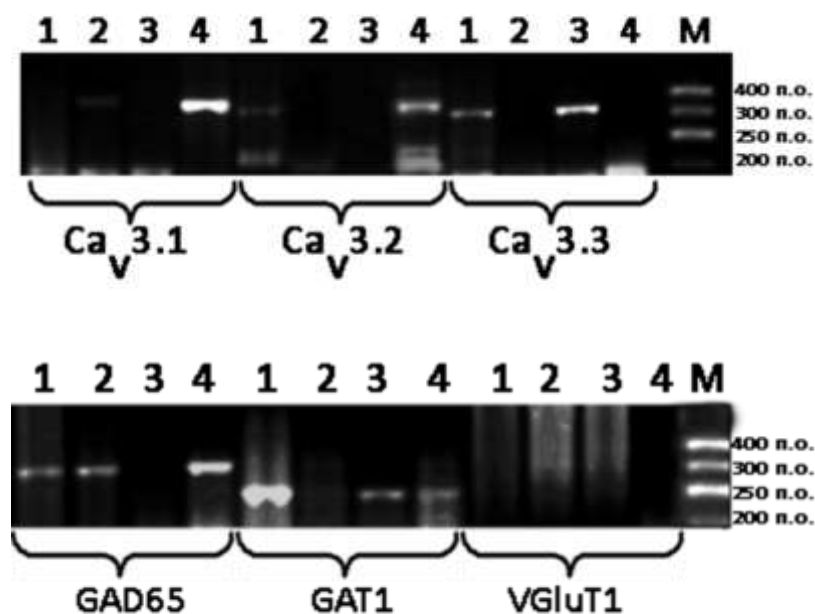


Рис. 1. Зразок агарозного гелю після електрофорезу продуктів ПЛР для однієї клітини. 1-4 – окремі клітини. Верхня панель – ізоформи каналів Т-типу; нижня панель – маркери ГАМК-ергічних (GAD65 і GAT1) і глутаматергічних нейронів (VGluT1).

тривалістю у 50-55 циклів.

Метод було відпрацьовано в дослідженні диференціальної експресії нейрональної форми синаптичного білка інтерсектина у таламусі мишей та в досліді з аналізу наявності експресії мРНК ванілоїдних рецепторів надродини іонних каналів транз'єнтного рецепторного потенціалу [Дребот та інші, 2008; Tsyba et al, 2008].

Нейрон-специфічна експресія альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі. Серед нейронів таламусу виділяють 3 основні групи: релейні таламокортикальні (передають сигнали від нижчих відділів ЦНС до кори великих півкуль), сітчасті (регулюють електричну активність в таламокортикальній петлі, гальмуючи її) та локальні інтернейрони [Steriade, 2001]. Таламокортикальні нейрони секретують збуджувальний нейромедіатор глутамінову кислоту, а інші нервові клітини таламусу – гальмівний медіатор γ -аміномасляну кислоту (ГАМК). Ми виділяли окремі нейрони з таламусу щурів та вимірювали низькопорогові кальцієві струми. Для оцінки властивостей струмів ми використовували імпульсний протокол та вимірювали вольт-амперну характеристику. Після запису струмів цитоплазма клітини аналізувалась на наявність мРНК ізоформ каналів Т-типу та маркерів нейромедіаторів ГАМК та глутамату. Більшість

Крім інгібітору РНКаз до розчину для відбору клітин додавали блокатор протеасоми класто-лактоцистин- β -лактон у концентрації 10 мкМ з огляду на відомості про РНКазну активність протеасоми [Досенко та інші, 2005]. Також до суміші було додано додатково 300 мкМ дитіотриетолу, стабілізатору ферментів, що також сприяв успішному проходженню зворотної транскрипції.

Даний метод був також застосований у модифікації кількісної ПЛР. На відміну від звичайної реакції, ПЛР «у реальному часі» проводили в один етап,

проаналізованих клітин ($n=21$) демонстрували експресію мРНК двох або трьох субодиниць одночасно (рис.1). Тим не менш, окремі клітини ($n=4$) містили мРНК лише однієї субодиниці: $Ca_v3.1$ або $Ca_v3.3$. Жодні біофізичні відмінності між струмами у клітинах, що експресували різні субодиниці, не спостерігалися ані у вольтамперній характеристиці, ані в параметрах активації та інактивації. Також ми порівняли Т-струми в глутаматергічних та ГАМК-ергічних нейронах, та знову не знайшли відмінностей у характеристиках струмів (Рис.2). Це може свідчити про нерівномірний розподіл ізоформ низькопорогових кальцієвих каналів на мембрані соми та дендритів нейронів таламусу, а також про диференційну локалізацію молекул мРНК цих ізоформ.

Онтогенетичний аспект експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових

кальцієвих каналів в таламусі.

Роботи Тарасенка продемонстрували, що швидкий та повільний компонент низькопорогового кальцієвого струму змінюються у онтогенезі,

причому повільний компонент з'являється пізніше, досягаючи максимуму через 15-17 діб після народження [Tarasenko et al., 1997,1998]. Тому ми провели серію ПЛР, взявши латеродорзальне ядро таламусу щурів різного постнатального віку: 1, 5, 15 та 90 діб. Окрім 3 генів субодиниць НПКК ми дослідили також експресію гену кальцієвого каналу R-типу $Ca_v2.3$, біофізичні

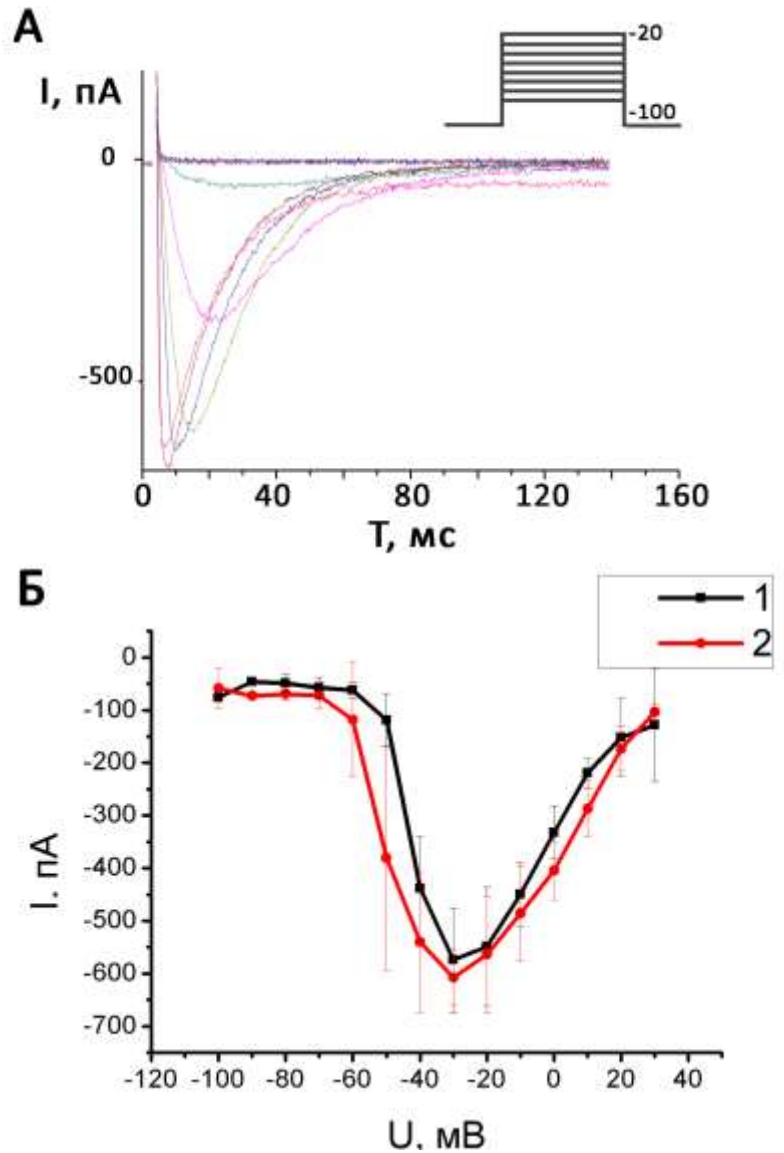


Рис. 2. А – оригінальний запис низькопорогового кальцієвого струму у відповідь на ступінчасті імпульси. Б. – вольтамперна характеристика кальцієвих струмів у нейронах, що експресували гени маркерів глутаматергічних (1) і ГАМК-ергічних нейронів (2) за даними ПЛР для однієї клітини

властивості струму через який нагадують такі струму Т-типу. Результати реакцій показали, що в найбільшому ступені в латеродорзальному ядрі таламусу щурів всіх вікових груп експресується мРНК, що кодує субодиниці $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$, а рівень $Ca_v3.2$ та $Ca_v2.3$ знаходиться на значно нижчому рівні (Рис. 3). Напівкількісний аналіз показав, що рівень експресії генів $Ca_v3.2$ та $Ca_v2.3$ у латеродорзальному ядрі у 16-32 разів нижчий, ніж такий для генів $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.3$. Отримані дані співпадали із результатами гібридизації *in situ* [Talley, 1999], що продемонстрували більшу наявність мРНК $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.3$ у мозку дорослого щура. Дані стандартної ПЛР не дозволяють казати про онтогенетичні особливості експресії мРНК каналів Т-типу. У одноденних щурят кількість мРНК $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$ і $Ca_v2.3$ суттєво не відрізнялась від такої у 5-, 15- та 90-денних щурів.

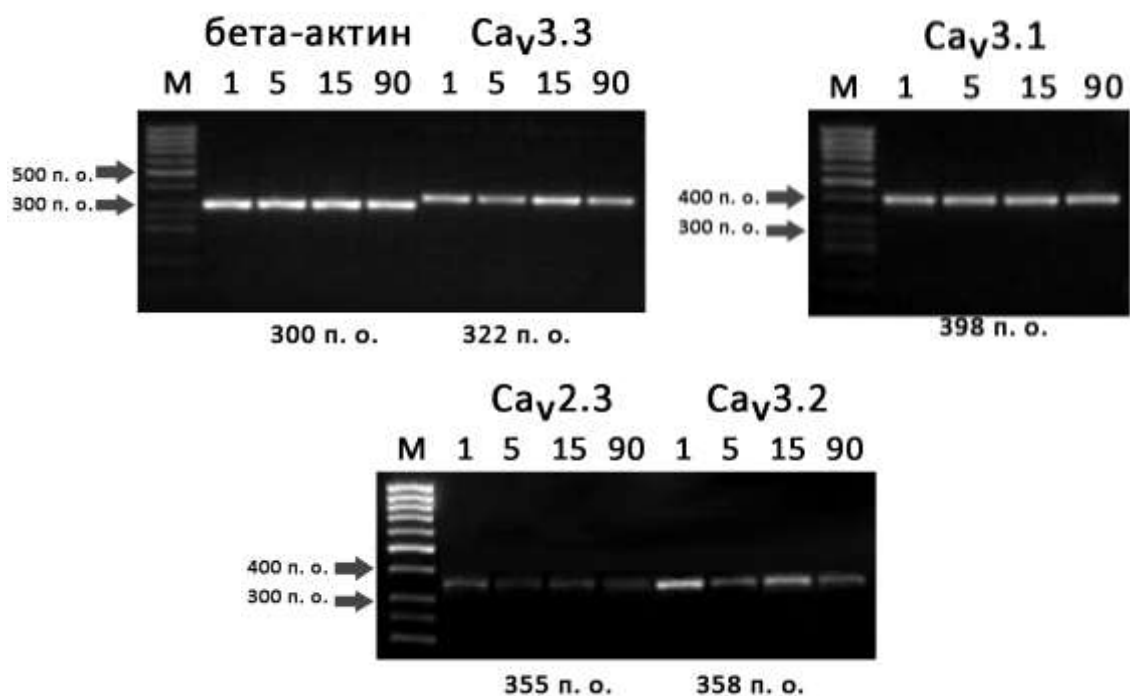


Рис. 3. Експресія мРНК трьох ізоформ НПКК і каналу $Ca_v2.3$ у таламусі щурів. Фрагменти кДНК генів $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.3$ візуалізували після 32 циклів ПЛР, кДНК генів $Ca_v3.2$ і $Ca_v2.3$ – після 36 циклів.

Тим не менш, остаточний висновок щодо рівня транскрипції можна зробити лише після аналізу кількісним методом. Для цього ми застосували ПЛР "у реальному часі" та звузили досліджуваний період онтогенезу тварин. Оскільки дані літератури точно вказують найпізніший час відсутності повільного компонента Т-струму як 10-12 постнатальних діб, а його максимальна амплітуда з'являється після 17 дня [Tarasenko et al., 1998], то ми обрали 10- та 25-денних щурів як надійні точки, у яких струми гарантовано розрізняються. В ході дослідження виявилось, що на 10-й постнатальний день у латеродорзальному ядрі таламусу найбільше експресується мРНК каналу $Ca_v3.3$. Рівень мРНК $Ca_v3.1$ був менше за $Ca_v3.3$ у 1,7 разів, тоді як

кількість $Ca_v3.2$ відрізнялася у 6 разів у бік зменшення. Із досягненням 25-денного віку рівні мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$ знижувалися відповідно у 3,5 та 5 разів, тоді як кількість мРНК $Ca_v3.3$ змінювалася статистично незначимо. Таким чином у віці 25 днів у щурів спостерігається така кількісна послідовність рівнів мРНК каналів Т-типу: $Ca_v3.2 \ll Ca_v3.1 < Ca_v3.3 \approx 1:14:76$. (Рис 4.)

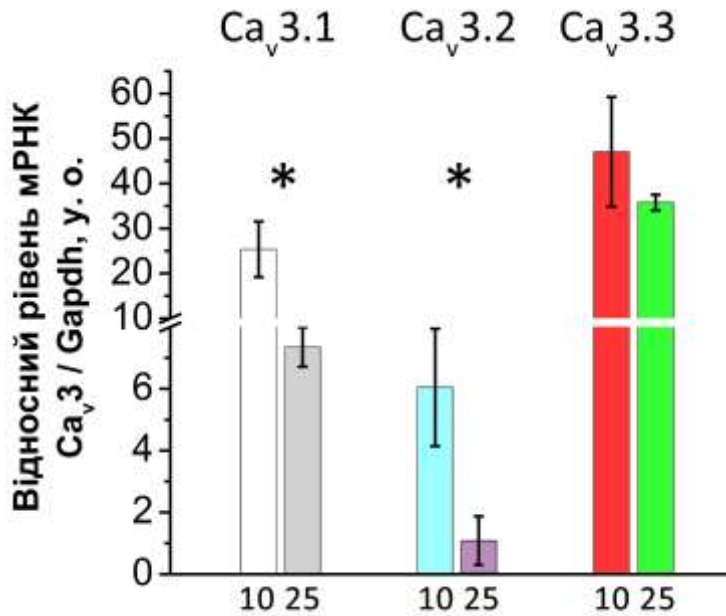


Рис. 4. Зміни відносної кількості мРНК трьох субодиниць Т-каналів у латеродорзальному ядрі таламусу з 10го по 25й день постнатального розвитку. * – $p < 0,05$

кількість мРНК прямо корелювала із кількістю білків каналу на мембрані клітини, то картина мала би бути іншою: у Т-струмі на 10-й день онтогенезу "повільний" і "швидкий" компонент приблизно рівні, а на 25-й "швидкий" сильно зменшується при збереженні "повільного" компоненту. Але струми, що спостерігаються, кардинально інші. Ми вважаємо, що існує певний механізм вибіркової трансляції та/або посттрансляційний процес, що особливим чином впливає на частку мРНК $Ca_v3.3$, яка спочатку не дає функціонального каналу на мембрані, а потім все-таки транлюється. З іншого боку, кореляція між біофізичними властивостями струмів та конкретними субодиницями виходить із інформації, що отримана у гетерологічних системах експресії. Експресовані там Т-канали можуть мати відмінну фармакологію, кінетику струму, поріг активації тощо.

Порівняння Т-кальцієвого струму в таламусі епілептичних та нормальних щурів. Дослідження Т-каналів у релейних таламічних ядрах щурів лінії WAG/Rij обмежені фактично однією роботою [Broicher et al., 2008], де вивчалися експресія мРНК та характеристики Т-струму у бічному колінчастому ядрі. Крім того, порівняння здійснювалося не з материнською

Експресія мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ на 10-й день знаходиться на співставному рівні, тоді як кількість мРНК $Ca_v3.2$ значно нижча. На 25-й день значно зменшується рівень мРНК $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.2$, а $Ca_v3.3$ майже не змінюється.

Згідно з результатами, отриманими в експериментах із штучно експресованими в гетерологічних системах субодиниць Т-каналів, ізоформи $Ca_v3.1$ і $Ca_v3.2$ відповідають за струм із швидкою кінетикою активації та інактивації, а $Ca_v3.3$ – за "повільний" струм [Perez-Reyes, 2003]. Якщо б

лінією Wistar, а із завідомо далекою генетично лінією АСІ. Тому для розширення нашого розуміння змін експресії Т-каналів у моделі абсансної епілепсії та для наближення до визначення генетичних основ етіології патологічного фенотипу цієї моделі ми порівняли експресію каналів Т-типу в латеродорзальному ядрі (ЛДЯ) ліній WAG/Rij та Wistar методом кількісної ПЛР.

Проведене нами порівняння кількості мРНК зазначених кальцієвих каналів у ЛДЯ щурів ліній WAG/Rij та Wistar показало, що у тварин 10-тиденного віку рівень експресії $Ca_v3.1$ знижується на $\sim 35\%$, тоді як у $Ca_v3.2$ та $Ca_v3.3$ лишається незмінним за умов абсансного фенотипу. При цьому на 25-й день спостерігається зниження рівня експресії $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ (на $\sim 68\%$

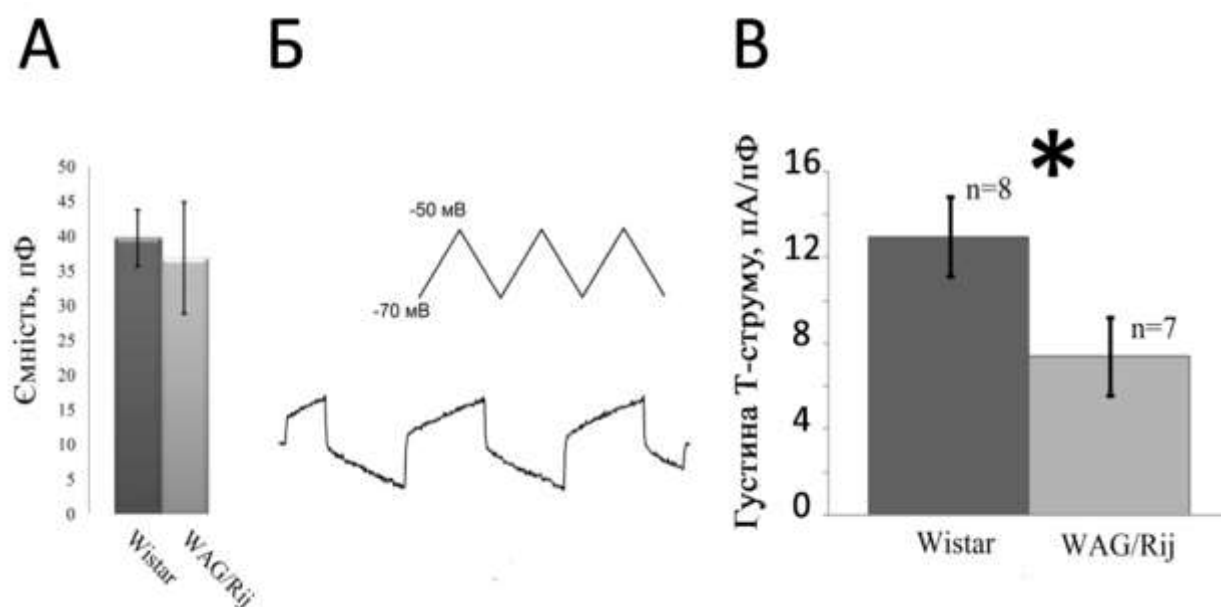


Рис. 5 Електрофізіологічне дослідження методом петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» кальцієвого струму через Т-канали в ізольованих нейронах латеродорзального ядра. А. Середні значення електричної ємності нейронів, виділених з щурів ліній WAG/Rij і Wistar. Б. Протокол подачі фіксованого потенціалу на мембрану клітини для визначення електричної ємності нейронів (зверху) і характерна відповідь на нього. В. Середні значення густин кальцієвого Т-струму в нейронах, виділених з щурів ліній WAG/Rij і Wistar. * – $p < 0,05$.

та $\sim 48\%$, відповідно, порівняно з тваринами лінії Wistar).

Паралельно проведено вимірювання трансмембранних струмів на гостроізольованих нейронах ЛДЯ. Дослідження виявило значне зменшення щільності Т-струмів у клітинах ЛДЯ 10-денних щурів ліній WAG/Rij у порівнянні із лінією Wistar (рис. 5). Загалом, у контрольних щурів зазначена величина при -40 мВ становила $12,95 \pm 1,83$ пА/пФ ($n=8$), в той час як у епілептичних тварин вона дорівнювала $7,42 \pm 1,8$ пА/пФ ($n=7$), $P < 0,05$.

Зниження як експресії мРНК $Ca_v3.1$, так і зменшення загального Т-струму у поодиноких нейронах ЛДЯ в щурів лінії WAG/Rij йде врозріз із

даними [Broicher et al., 2008], де в бічному колінчастому ядрі було зафіксовано збільшення амплітуди струму на 27%, тоді як в нашому експерименті спостерігалось зменшення його амплітуди на 43%. У якості контролю дослідники брали лінію ACI, а не Wistar, тому різниця може бути викликана саме відмінністю контрольної лінії щурів.

Кількісна оцінка експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів у сітчастому ядрі таламусу та соматосенсорній корі. При вивченні етіології випадків абсансної епілепсії ключовим є питання, в якій ділянці мозку відбуваються первинні зміни, які призводять до абсансів – таламусі чи корі [Lujtelaar та Meeren, 2003]. Для того, щоб виявити можливість залучення каналів Т-типу до патологічних

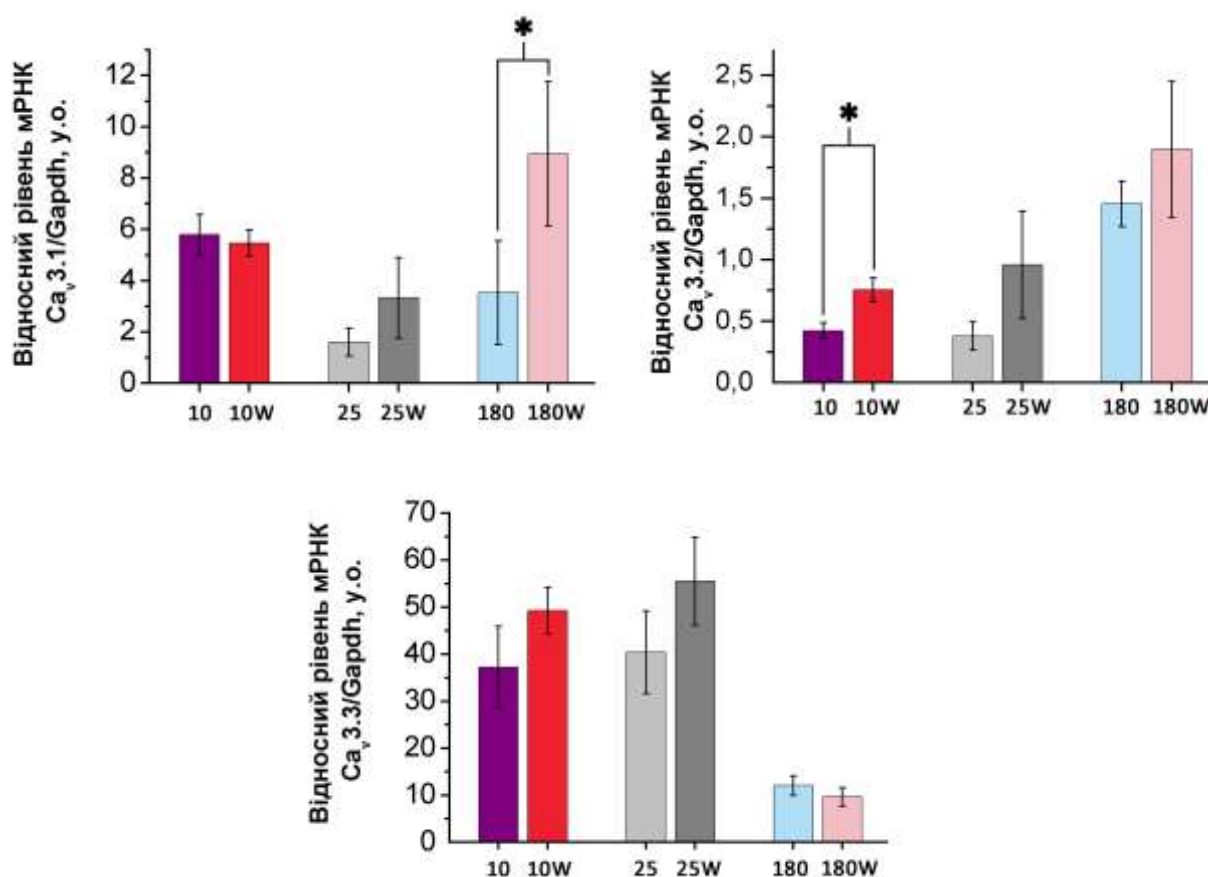


Рис.6 Рівні мРНК НПКК у «кортикальному фокусі» щурів ліній Wistar і WAG/Rij. 10, 25, 180 – щури Wistar, 10W, 25W, 180W – щури WAG/Rij відповідного постнатального віку (числа відповідають дням).*- p < 0,05

процесів у цих двох зонах, ми дослідили експресію їх мРНК у сітчастому ядрі таламусу та соматосенсорній корі верхньої губи та вібрис, так званому "кортикальному фокусі".

Сітчасте ядро є регулятором активності таламусу та містить ГАМК-ергічні сітчасті нейрони, які гальмують нейропередачу через релейні таламокортикальні нейрони та переключає їх в режим пачкової активності.

Аналіз експресії каналів Т-типу у сітчастому ядрі дорослих щурів лінії WAG/Rij та контрольних щурів Wistar не виявив статистично значимих відмінностей в експресії трьох ізоформ Т-каналів.

У "кортикальному фокусі", де за вимірами ЕЕГ розпочинаються абсанси в щурів WAG/Rij [Meeren et al., 2002], встановлено більший у 2,5 рази рівень експресії мРНК $Ca_v3.1$ у дорослих щурів лінії WAG/Rij.

Для оцінки онтогенетичних змін експресії Т-каналів у "кортикальному фокусі" ми також взяли 10 і 25-денних щурів обох ліній. Цікавою виявилася динаміка експресії $Ca_v3.1$ у контрольних щурів Wistar. Найбільшу кількість мРНК було встановлено у щурів 10-денного віку, у 25-денному віці вона знижувалася майже у 3 рази, а потім у 6-місячному віці складала близько 65% від початкової. При цьому, рівень мРНК $Ca_v3.1$ у щурів лінії WAG/Rij не відрізнявся від контрольних на 10-й день, а на 25-й вже перевищував відповідний у контрольних щурів. Стабільно низька кількість мРНК субодиниці $Ca_v3.2$ у молодих щурів Wistar супроводжувалася майже вдвічі збільшеною експресією у відповідних вікових групах щурів з абсансами. А ось рівень мРНК $Ca_v3.3$ був значно вищий (3,5-4 рази) у молодому віці, ніж у дорослому. При цьому показники експресії мРНК ізоформи $Ca_v3.3$ в лінії WAG/Rij статистично значимо не відрізнялися від контрольної лінії (Рис 6.).

Експресія мРНК Ca_v3 каналів у корі великих півкуль показана ще в дослідженні [Talley et al. 1999]. Ми вперше демонструємо зміни цієї експресії для моделі абсансної епілепсії, хоча непряме посилення на таку зміну є в роботі [Ernst et al, 2009]. При штучній гіперекспресії $Ca_v3.1$ у мозку мишей виникала спонтанна ЕЕГ-активність, подібна до абсансів. Автори роботи сконцентрувалися на змінах провідностей через Т-канали у таламусі, ніяк не коментуючи подібне збільшення експресії мРНК ізоформи $Ca_v3.1$ у соматосенсорній корі. Хоча, на нашу думку, такий очевидний феномен вимагає більш детального, в тому числі й електрофізіологічного, вивчення.

При цьому Т-струми у кортикальних нейронах описані лише в декількох роботах, тоді як в інших постулюється відсутність функціонально активних Т-каналів у цих нейронах. Сама по собі експресія мРНК не є однозначним показником наявності білка, а тим більше робочого мембранного каналу. Існує ціла система молекулярних механізмів, що регулюють появу функціонального білка вже після транскрипції мРНК. Це і допоміжні білки інформосоми, і білкові фактори трансляції, і малі РНК, і посттрансляційні модифікації поліпептиду, і транспортні цитоплазматичні білки, тощо. Кожен із цих факторів може призвести до переривання класичного шляху ДНК – мРНК – функціональний білок. Так, наприклад, у кардіоміоцитах людини високо експресується мРНК каналу $Ca_v3.2$, більш того, вперше цей канал був клонований саме із серця людини і названий Н-субодиницею (від англ. "heart"). Тим не менш, досі не вдалося зареєструвати Т-струми у людських кардіоміоцитах [Щегловітов, особ. пов.]. Тому навіть значні зміни експресії мРНК мають бути перевірені на їхнє віддзеркалення у білку та його функції.

Експресія білка $Ca_v3.1$ у соматосенсорній корі. Наявність транскриптів Ca_v3 у корі щурів показано у багатьох роботах. Дані щодо білка не такі однозначні та переконливі. Є роботи, де показано функції ізоформ $Ca_v3.2$ [Huang et al, 2011] та $Ca_v3.3$ [Liu et al, 2011] в синапсах кортикальних нейронів. Щодо експресії білка $Ca_v3.1$ у корі, то така залишається невідомою. При цьому широке електрофізіологічне дослідження потенціалкерованих кальцієвих каналів у 5-6-му шарі соматосенсорної кори щура продемонструвало наявність всіх типів високопорогових кальцієвих каналів, але не низькопорогових [Almog et al, 2009]. Таким чином, визначення наявності білка $Ca_v3.1$ та його функції у соматосенсорній корі представляє інтерес не лише у світлі його потенційної патофізіологічної ролі у моделі абсансної епілепсії, але й створює нове знання щодо роботи кортикальних нейронів.

Для порівняльного аналізу функції Т-каналів у нейронах "кортикального фокусу" щурів ліній Wistar та WAG/Rij віком 10 днів були виділені окремі нейрони з цієї зони для "петч-клемп" експерименту. Як не дивно, в нейронах жодної лінії не було зареєстровано Т-струму ($n=40$). Паралельно із тканини "кортикального фокусу" дорослих 6-місячних щурів було виділено сумарний білок, розділено в полікриламідному гелі та детектовано експресію білка $Ca_v3.1$ та бета-актину за допомогою методу "вестерн блот". В обох лініях було виявлено білкову смугу із молекулярною масою близько 270-280 кДа, що відповідає розмірам білка $Ca_v3.1$. Проте кількість

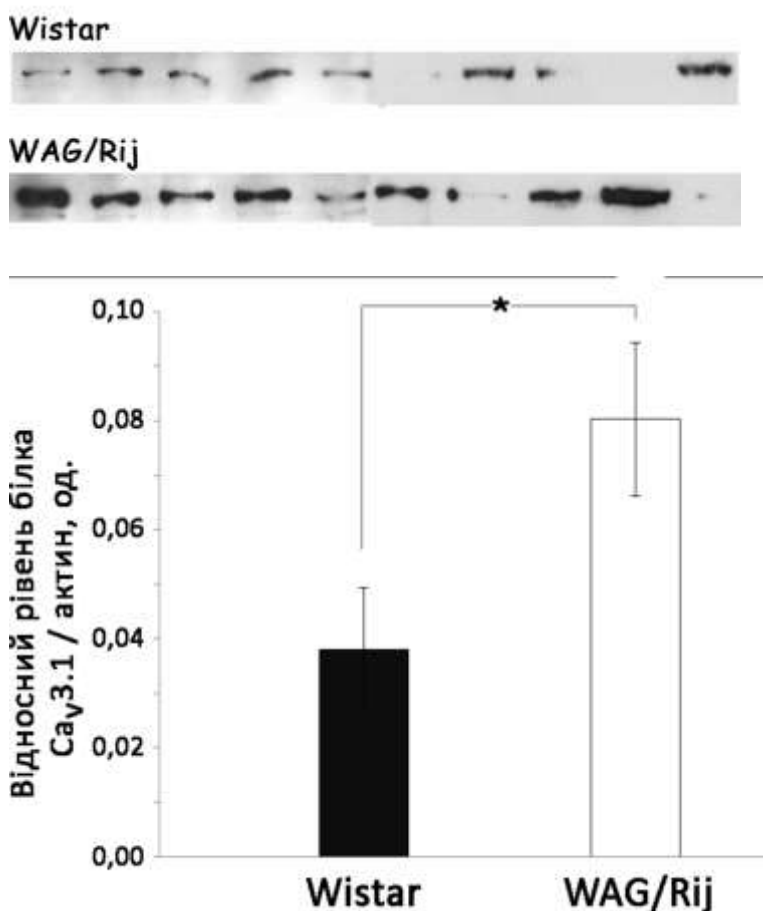


Рис. 7 А. "Вестерн-блот" аналіз сумарного білка з гомогенатів "кортикального фокусу" 6-місячних щурів; з антитілами проти $Ca_v3.1$ (близько 270 кДа); кожна доріжка відповідає білку з окремої тварини.

Б. Відносний рівень білка $Ca_v3.1$ у зоні соматосенсорної кори («кортикальному фокусу») щурів ліній Wistar I WAG/Rij за даними денситометрії

цього білка, встановлена денситометричним методом розрізнялася у 2,1 рази на користь шурів лінії WAG/Rij (рис. 7).

Співпадіння напрямку та величини зміни експресії ізоформи кальцієвого каналу $Ca_v3.1$ вказує на залучення цього каналу до існування абсансного фенотипу шурів лінії WAG/Rij. Проте відсутність Т-струмів у гостро-ізолюваних кортикальних нейронах не дозволяє зробити чіткий висновок щодо його безпосередньої ролі. Тим більше, що існує мало відомостей щодо ролі кальцієвих каналів Т-типу у корі головного мозку. Кортикальним нейронам невластива пачкова активність, тому пейсмейкерна функція для НПКК є сумнівною. Вірогідною є вже описана для каналу $Ca_v3.2$ роль у екзоцитозі синаптичних везикул. Також можлива експресія білка $Ca_v3.1$ на мембрані дистальних відростків, що унеможливорює реєстрацію струму на мембрані соми та проксимальних дендритів, які доступні на гостроізолюваних клітинах.

Роль мікроРНК у регуляції експресії низькопорогових кальцієвих каналів.

Ми просканували 3'UTR мРНК гена *Casna1H* ($Ca_v3.2$) і виявили 35 сайтів для різних мікроРНК. Серед них була мікроРНК gno-miR-1, для якої на даному 3'UTR було виявлено два сайти (рис.8). Ця мікроРНК характерна для міоцитів та кардіоміоцитів, проте наявна й у мозку, де показаний її вплив на нейронний транскрипційний фактор BDNF [Ma et al, 2015]. Відомості про її рівні в таламусі та "кортикальному фокусі" відсутні. Ми поставили задачу

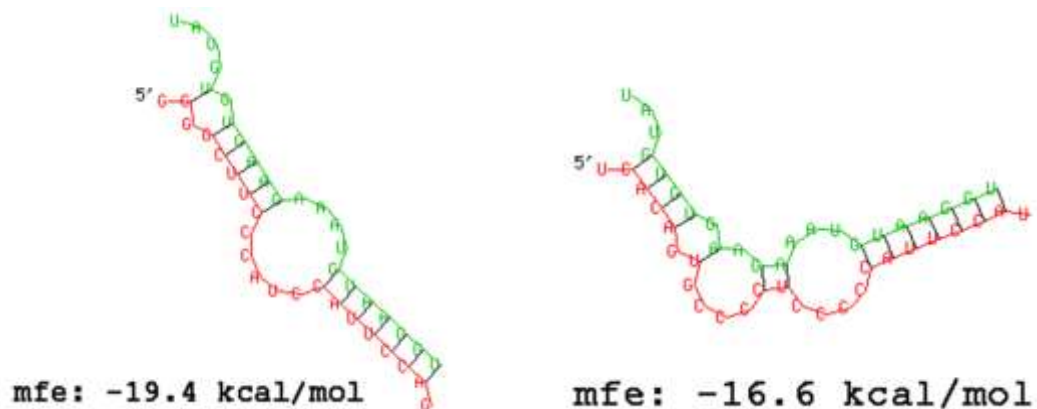


Рис.8. Два сайти зв'язування для gno-miR-1 (зверху) на 3'-UTR $Ca_v3.2$ мРНК.

перевірки експресії gno-miR-1 у мозку шурів та порівняння рівнів мРНК $Ca_v3.2$ та даної мікроРНК у нормі та в моделі абсансної епілепсії.

Наявна в літературі інформація щодо експресії gno-miR-1 у кардіоміоцитах дозволила додатково обґрунтувати аналіз її коекспресії із субодиницею $Ca_v3.2$ НПКК. Кількість gno-miR-1 зростає при дозріванні кардіоміоцитів з ембріонального стану у дорослий [Wei et al., 2014]. В ході розвитку зміни відбуваються й у складі іонних каналів мембрани серцевих клітин, у тому числі й в кальцієвих каналах Т-типу. Неонатальні та

ембріональні кардіоміоцити експресують в основному $Ca_v3.2$, а дорослі знижують його кількість та збільшують експресію $Ca_v3.1$ [Mesirca et al., 2014]. Таким чином, порівняння цих даних дає додаткову можливість припускати взаємодію між $\rho\text{-miR-1}$ та мРНК $Ca_v3.2$.

Для встановлення рівнів експресії $\rho\text{-miR-1}$ застосовувалась кількісна ПЛР. Рівень $\rho\text{-miR-1}$ у "кортикальному фокусі" визначався у 10-денних і 6-місячних контрольних щурів лінії Wistar та 6-місячних щурів лінії WAG/Rij.

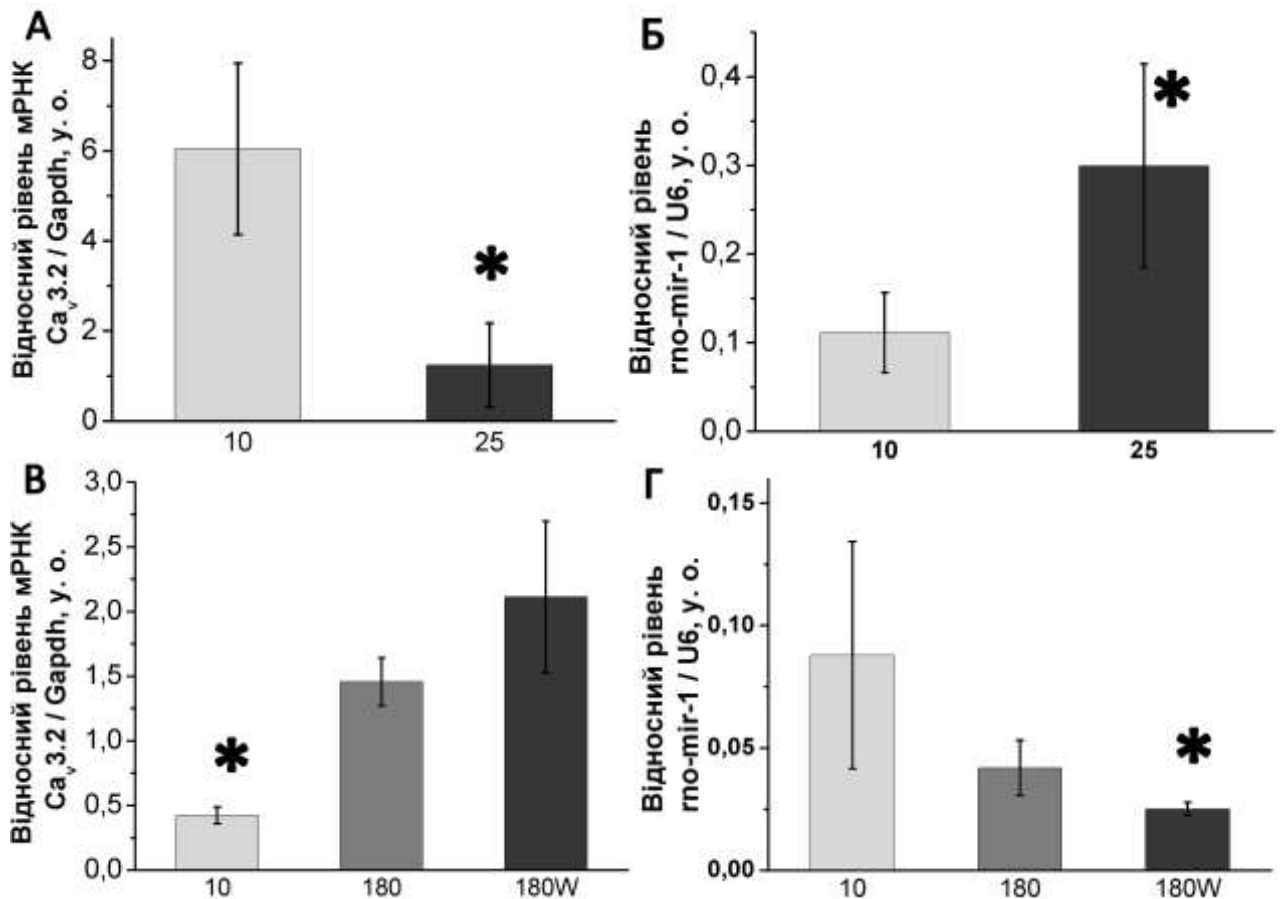


Рис. 9. Співставлення експресії мРНК $Ca_v3.2$ (А, В) та $\rho\text{-miR-1}$ (Б, Г) у латеродорзальному ядрі таламуса (А, Б) та "кортикальному" фокусі (В, Г) в нормі та моделі абсансної епілепсії. 10, 25, 180 – вік тварин у днях, W – лінія WAG/Rij * – група статистично значимо відрізнялася від інших груп, $p < 0,05$

При визначенні експресії $\rho\text{-miR-1}$ бралися ті ж зразки РНК, в яких було встановлено експресію мРНК субодиниці $Ca_v3.2$. В результаті аналізу ми виявили оберненопропорційне відношення рівнів $\rho\text{-miR-1}$ та мРНК $Ca_v3.2$, при чому рівень $\rho\text{-miR-1}$ у "кортикальному фокусі" сомато-сенсорної кори був знижений у 3 рази.

3-разове зниження експресії досліджуваної $\rho\text{-miR-1}$ у "кортикальному фокусі" може бути причиною виходу мРНК $Ca_v3.2$ з-під дестабілізуючого впливу даної мікроРНК, що призводить до підвищення експресії $Ca_v3.2$ при епілепсії. Зареєстроване ж нами оберненопропорційне співвідношення між експресією $\rho\text{-miR-1}$ та $Ca_v3.2$ вказує на можливість регуляції функції даної мРНК за допомогою $\rho\text{-miR-1}$.

Щоб перевірити, чи не є знайдена закономірність характерною лише для щурів WAG/Rij, ми порівняли кількість мікроРНК у тих же зразках, у яких попередньо визначали зміни експресії гену $Ca_v3.2$. Так, у латеродорзальному ядрі таламусу кількість мРНК $Ca_v3.2$ була досить низькою, але вона знижувалась у майже 5 разів з 10-го по 25-й день постнатального розвитку. Вимірявши кількість $gno-miR-1$, в результаті ми знову отримали обернене співвідношення між рівнями $gno-miR-1$ та мРНК $Ca_v3.2$. Ці дані підтверджують можливість регуляції $Ca_v3.2$ за допомогою $gno-miR-1$, а також наштовхують на думку про універсальність регуляції експресії даного каналу за допомогою $gno-miR-1$ як в корі, так і в таламусі.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено результати власного дослідження змін експресії генів кальцієвих каналів Т-типу в таламусі та соматосенсорній корі щура в онтогенезі та за умов експериментальної моделі абсансної епілепсії у щурів лінії WAG/Rij та розглянуто роль РНК-інтерференції у регуляції цих змін.

1. Розроблено модифікацію методу оцінки експресії генів у окремих нейронах ЦНС за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та зворотної транскрипції. Як гальмівні ГАМК-ергічні так і збуджувальні глутаматергічні нейрони таламусу експресують мРНК $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$, причому більшість нейронів експресує мРНК 2-х чи 3-х субодиниць одночасно. Т-струми у гальмівних та збуджувальних нейронах відрізняються за електрофізіологічними властивостями несуттєво.
2. Рівень експресії мРНК низькопорогових кальцієвих каналів знижується з 10 до 25 дня постнатального розвитку у латеродорзальному ядрі мозку щура: експресія мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ до десятого дня знаходиться на співставному рівні, тоді як кількість мРНК $Ca_v3.2$ значно нижча. На 25-й день значно зменшується рівень мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$, а $Ca_v3.3$ майже не змінюється.
3. У тканині соматосенсорної кори, що відповідає за верхню губу та вібриси щурів лінії WAG/Rij у віці 6 місяців спостерігається збільшена експресія мРНК ізоформи Т-каналів $Ca_v3.1$ у 2,5 рази та збільшена кількість білка у 2,1 рази, порівняно зі щурами контрольної лінії Wistar. Для 10- і 25-денних щурів WAG/Rij показано зменшення експресії мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$ субодиниць Т-каналів та зниження Т-струмів у нейронах латеродорзального ядра таламусу на 43% порівняно з контрольними щурами.
4. Збільшення експресії мікроРНК $gno-miR-1$ супроводжується зменшенням експресії мРНК каналу $Ca_v3.2$ у нормальних щурів та щурів зі спадковими абсансами.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Sharopov B. Compensatory reduction of Cav3.1 expression in thalamocortical neurons of juvenile WAG/Rij rats / Sharopov B., Boldyriev O., Shtefan N., Batiuk M., Shuba Y // Epilepsy Research. – 2016. – V. 119. – P. 10–12. (Особистий внесок: виділення нейронів таламусу, РНК, постановка реакції зворотної транскрипції та ПЛР, електрофізіологічний експеримент, аналіз результатів, участь у написанні статті)
2. Болдирев О. І. Експресія генів кальцієвих каналів Т-типу і калієвого каналу Kir4.1 у сітчастому ядрі таламусу та сомато-сенсорній корі щурів лінії WAG/Rij / Болдирев О. І., Гулак К. Л., Батюк М. Ю., Досенко В. Є., Скачков С. М., Ітон М., Шуба Я. М. // Біологічні Студії/Studia Biologica. – 2015. – Том 9, № 3–4. – С. 41–48. (Особистий внесок: виділення РНК та білків з мозку, постановка реакції зворотної транскрипції та ПЛР, участь в дослідженні білків методом Western blot, аналіз результатів, написання і подача статті до друку.)
3. Tsyba L. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons / Tsyba L., Gryaznova T., Dergai O., Dergai M., Skrypkina I., Kropyvko S., Boldyryev O., Nikolaienko O, Novokhatska O, Rynditch A. // Biochemical Biophysical Research Communications. – 2008. – Vol. 372, №4. – P. 929-934. (Особистий внесок: виділення нейронів таламусу, аналіз мРНК методом ПЛР для поодинокі клітини, аналіз результатів, участь у написанні статті)
4. Дребот, Ю. І. Експресія генів, що кодують ванілоїдні рецептори 1-го та 2-го типу, в культурі нейронів гіпокампа / Ю. І. Дребот, О.І.Болдирев, В.Є.Досенко, П.Г.Костюк // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, №1. – С. 3-9. (Особистий внесок: участь у розробці методики ПЛР для поодинокі клітини, самостійна постановка реакцій, статистична обробка результатів.)
5. Досенко, В. Е. Экспрессия РНК субъединиц низкопороговых кальциевых каналов в латеродорсальном ядре таламуса крыс: онтогенетический аспект / В. Е. Досенко, О. П. Любанова, А. К. Щегловитов, А. И. Болдырев, Я. М. Шуба // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2005. – Т. 37, №3. – С. 201-206. (Особистий внесок: виділення РНК, постановка реакції зворотної транскрипції та ПЛР, постановка електрофорезу, статистичний аналіз результатів, участь у написанні статті.)

ТЕЗИ ВИСТУПІВ НА НАУКОВИХ КОНФЕРЕНЦІЯХ

6. Болдирев О. І. Онтогенетична динаміка і нейрон-специфічна експресія кальцієвих каналів Т-типу в таламусі щура / Болдирев О. І., Шаропов Б. Р.,

- Штефан Н. Л., Шуба Я. М. // Молодь і поступ біології: тези 11-ї міжнародної конференції молодих вчених. – Львів, 2015. – С. 21.
7. Н. Л. Штефан. Дослідження РНК-інтерференції на прикладі Т-каналів / Н. Л. Штефан, О. І. Болдирєв, М. Ю. Батюк, Я. М. Шуба // Молодь і поступ біології: тези 10-ї міжнародної конференції молодих вчених. – Львів, 2014. – С. 56.
 8. Соткіс, Г. В. Неканонічна функція Т-каналів при абсанс-епілепсії / Г. В. Соткіс, О. І. Болдирєв, М. Ю. Батюк, Я. М. Шуба // Матеріали VI конгресу патофізіологів України (3-5 жовтня 2012 р., Місхор, Крим) ; Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3, Ч. 2 (59). – С. 377-378.
 9. Болдирєв, О. І. Зміни експресії Т-каналів у моделі абсанс-епілепсії можуть бути викликані взаємодією з мікроРНК / О.І. Болдирєв, М. Ю. Батюк, В. Є. Досенко, В. Г. Найдьонов, Я. М. Шуба // Матеріали VI конгресу патофізіологів України (3-5 жовтня 2012 р., Місхор, Крим) ; Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3, Ч. 2 (59). – С. 308.
 10. Boldyriev, O. T-type calcium channels in brain cortex – novel function? / O. Boldyriev, M. Batiuk, Y. Shuba // Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених "Фізіологія: від молекул до організму" (20-21 жовтня 2011 р., Київ). Фізіологічний журнал. – 2011. – Т. 57, №5. – С. 105.
 11. А.И. Болдырев. Модель детской эпилепсии - крысы линии WAG/Rij и кальциевые каналы Т-типа: повышение экспрессии не влияет на функцию / А. И. Болдырев, М. Ю. Батюк, К. Л. Гулак, Я. М. Шуба // Научные труды III Съезда физиологов СНГ 1-3 октября 2011, Ялта. – Москва: Медицина–Здоровье, 2011. – С. 41.
 12. Шаропов, Б. Р. Зміни рівня експресії кальцієвих каналів Т-типу у латерально-дорсальному ядрі таламуса у нормі та за умов абсанс-епілепсії / Б. Р. Шаропов, О. І. Болдирєв, М. Ю. Батюк, Н. Л. Штефан, Я. М. Шуба // Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених "Фізіологія: від молекул до організму" (20-21 жовтня 2011 р., Київ). Фізіологічний журнал. – 2011. – Т. 57, №5. – С. 111-112.
 13. Boldyryev O. Differential expression of 3 T-type alpha1-subunits in thalamus and somatosensory cortex of WAG/Rij rat absence epilepsy model / Boldyryev O., Batiuk M., Gulak K. & Shuba Y. // V Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, June, 2011: Book of Abstracts. – Kyiv, 2011 – P. 64.
 14. Болдирєв, О. І. Участь мікроРНК miR-1 у регуляції експресії Cav3.2 каналу Т-типу / О. І. Болдирєв, М. Ю. Батюк, Я. М. Шуба // V З'їзд Українського біофізичного товариства: тези доповідей. – Луцьк, 2011. – С. 26-27
 15. Дринь, Д. О. Клонування мікроРНК gno-miR-1 для визначення її взаємодії з мРНК низькопорогових кальцієвих каналів / Д. О. Дринь ,

- О. І. Болдирев, М. Ю. Батюк, Я. М. Шуба // V З'їзд Українського біофізичного товариства: тези доповідей. – Луцьк, 2011. – С. 54
16. Batiuk M. Y. Expression of T-type calcium channels in the rat model of absence epilepsy / Batiuk M. Y., Boldyryev O. I., Shuba Y. M. // 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine" Turin, Italy, 2011 FEBS Journal. – 2011. – Vol. 278. – P.258.
17. Boldyryev O. T-type calcium channels and Kir 4.1 mRNA level in WAG/Rij rat absence epilepsy model / Boldyryev O., Gulak K., Skatchkov S., Shuba Y. // FENS 2010 (7th FENS forum of European neuroscience), Amsterdam, Netherlands, July 3-7, 2010. FENS Abstracts. – 2010. – Vol. 5. – P. 106.2.
18. Шуба Я. М. Кальцієві канали Т-типу: селективність і нейрон-специфічна експресія / Я. М. Шуба, О. К. Щегловітов, О. І. Болдирев // II З'їзд Українського товариства клітинної біології: тези доповідей. – Київ, 2007. – С. 25.
19. Boldyryev O. Ca_v 3.1 mRNA upregulation in Wag/Rij rat thalamus / Boldyryev O., Dosenko V., Shuba Ya. // *Book of Abstracts of the Physiological society International Workshop on Molecular Physiology of Membrane Transport and Cellular Signalling*. Yaremche, Ukraine, 2007. – 2007. – P. 32.

АНОТАЦІЯ

Болдирев О.І. Експресія та функція низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі та соматосенсорній корі головного мозку щурів в онтогенезі та в експериментальній моделі абсансної епілепсії. – Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Київ – 2016

Дисертацію присвячено порівняльному аналізу експресії трьох ізоформ основної пороформуєної $\alpha 1$ -субодиниці низькопорогових кальцієвих каналів (НПКК) Т-типу – Ca_v3.1, Ca_v3.2 та Ca_v3.3 у таламусі й корі головного мозку щурів контрольної лінії Wistar на різних етапах онтогенезу та в щурів з абсансним фенотипом лінії WAG/Rij, пошуку можливих молекулярних регуляторів експресії генів цих каналів, а також співставленню низькопорогових кальцієвих струмів, з профілем експресії мРНК трьох ізоформ в різних типах таламічних нейронів. Розроблено власну модифікацію методу полімеразної ланцюгової реакції для окремих нейронів таламуса, розрізняваних за типом основного нейромедіатора, який вони синтезують. За її допомогою встановлено, що гальмівні ГАМК-ергічні та збуджувальні глутамат-ергічні нейрони таламусу експресують мРНК Ca_v3.1, Ca_v3.2, Ca_v3.3, причому більшість нейронів експресує мРНК 2 чи 3 ізоформ одночасно. Т-струми у гальмівних та збуджуючих нейронах відрізняються за електрофізіологічними властивостями несуттєво. Показано, що в

латеродорзальному ядрі таламуса на ранніх етапах онтогенезу експресуються всі 3 підтипи НПКК. Кількість мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.3$ на 10-й постнатальний день знаходиться на співставному рівні тоді як рівень мРНК $Ca_v3.2$ є значно нижчим. На 25-й день значно зменшується рівень мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$, а $Ca_v3.3$ майже не змінюється. Встановлено, що в щурів лінії WAG/Rij збільшена кількість мРНК $\alpha 1$ -субодиниць Т-каналів у тканині зони первинного джерела генерації абсансів – соматосенсорній корі, що відповідає за верхню губу та вібриси порівняно зі щурами лінії Wistar. Підвищення рівня мРНК $Ca_v3.1$ у корі щурів віком 6 місяців складає 150%, а збільшення експресії білка цього каналу – 110%. У гостро ізольованих нейронах цієї зони кори Т-струм не виявлений через можливу локалізацію каналів на дистальних дендритах. Для 25-денних щурів WAG/Rij показано зменшення експресії мРНК $Ca_v3.1$ та $Ca_v3.2$ субодиниць Т-каналів та зниження Т-струмів у нейронах латеродорзального ядра таламусу на 43% порівняно з контрольними щурами. Визначено мікро-РНК *mo-mir-1* як потенційний регулятор трансляції мРНК низькопорогового кальцієвого каналу $Ca_v3.2$ у таламусі та корі головного мозку.

Ключові слова: низькопорогові кальцієві канали, петч-клемп, експресія генів, таламус, сомато-сенсорна кора, абсансна епілепсія, лінія Wistar, лінія WAG/Rij, мікроРНК, полімеразна ланцюгова реакція

АННОТАЦІЯ

Болдырев А.И. Экспрессия и функция низкопороговых кальциевых каналов в таламусе и соматосенсорной коре головного мозга крыс в онтогенезе и в экспериментальной модели абсансной эпилепсии. – Рукопись.

Дисертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины. Киев – 2016

Дисертацию посвящено сравнительному анализу экспрессии трёх изоформ основной порообразующей $\alpha 1$ -субъединицы низкопороговых кальциевых каналов (НПКК) Т-типа – $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ и $Ca_v3.3$ в таламусе и коре головного мозга крыс контрольной линии Wistar, на разных этапах онтогенеза и у крыс с абсансным фенотипом линии WAG/Rij, поиску возможных молекулярных регуляторов экспрессии генов этих каналов, а также сопоставлению низкопороговых кальциевых токов с профилем экспрессии мРНК трёх изоформ в разных типах нейронов.

Разработана собственная модификация метода полимеразной цепной реакции для отдельных таламических нейронов, различаемых за типом основного медиатора, который они синтезируют. С ее помощью установлено, что тормозные ГАМК-эргические и возбуждающие глутаматэргические нейроны таламуса экспрессируют мРНК $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ и $Ca_v3.3$, причем

большинство нейронов экспрессирует мРНК 2 или 3 изоформ одновременно. Т-токи в тормозных и возбуждающих нейронах отличаются по электрофизиологическим свойствам несущественно.

Показано, что в латеродорзальном ядре таламуса на ранних этапах онтогенеза экспрессируются все 3 подтипа НПКК. Количество мРНК $Ca_v3.1$ и $Ca_v3.3$ на 10-й постнатальный день находится на сопоставимом уровне, тогда как уровень мРНК $Ca_v3.2$ находится значительно ниже. На 25-й день значительно уменьшается уровень мРНК $Ca_v3.1$ и $Ca_v3.2$, а $Ca_v3.3$ почти не меняется. Установлено, что у крыс линии WAG/Rij увеличено количество мРНК $\alpha 1$ -субъединиц Т-каналов в ткани зоны первичного источника генерации абсансов – соматосенсорной коры, которая отвечает за верхнюю губу и вибриссы, по сравнению с крысами линии Wistar. Повышение уровня мРНК $Ca_v3.1$ в коре крыс в возрасте 6 месяцев составляет 150% , а увеличение экспрессии белка этого канала – 110%. В остроизолированных нейронах этой зоны коры Т-ток не выявлен, в связи с возможной локализацией каналов на дистальных дендритов. Для 25-дневных крыс WAG/Rij показано уменьшение экспрессии мРНК $Ca_v3.1$ и $Ca_v3.2$ субъединиц Т-каналов и снижение Т-токов в нейронах латеродорзального ядра таламуса на 43% по сравнению с контрольными крысами. Выявлено микро-РНК *miR-1* как потенциальный регулятор трансляции мРНК низкопорогового кальциевого канала $Ca_v3.2$ в таламусе и коре головного мозга.

Ключевые слова: низкопороговые кальциевые каналы, петч-клемп, экспрессия генов, таламус, соматосенсорная кора, абсансная эпилепсия, линия Wistar, линия WAG/Rij, микроРНК, полимеразная цепная реакция

SUMMARY

Boldyriev O. I. Changes in the expression of genes encoding low-voltage calcium channels in the brain of rats during ontogenesis and under the conditions of experimental absence epilepsy. – Manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of biological sciences, specialization 03.00.02 – biophysics. Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine. Kyiv – 2016.

Thesis is dedicated to comparative analysis of T-type or low-voltage activated calcium channels (LVACC) pore-forming $\alpha 1$ -subunits ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$) expression in thalamic nuclei and somatosensory cortex on different ontogenesis stages and in absence epilepsy WAG/Rij rat model, search of possible gene expression regulators of these channels, and to matching between T-type currents and isoform mRNA expression in different thalamic neuron types. We designed a modification of single-cell RT-PCR technique for thalamic neurons which were distinguished by secreted neurotransmitter. By this technique we found in both inhibitory GABA-ergic and excitatory glutamate-ergic thalamic neurons express mRNA of $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$ channels and moreover neurons

majority expressed 2 or 3 isoform mRNAs simultaneously. T-currents differed insignificantly by their biophysical properties. We showed all 3 LVACC isoform expression in laterodorsal thalamic nucleus. $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.3$ mRNA are expressed on comparable levels on 10th postnatal development day while $Ca_v3.2$ was much lower. On 25th day $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ mRNA quantity drop down dramatically but $Ca_v3.3$ stays on the same level. We demonstrated T-type channels $\alpha 1$ -subunits mRNA level elevation in WAG/Rij rats primary epileptogenic region – somatosensory cortex of upper lip and vibrissae. There is 2,5-fold increasing of $Ca_v3.1$ mRNA quantity and 2,1-fold upregulation of channel protein in 6 months old rats compared to control Wistar strain. We were not able to register T-type calcium current in isolated cortical neurons of this region, possibly due to dendritic T-channel localization. There is $Ca_v3.1$ and $Ca_v3.2$ mRNA downregulation in laterodorsal thalamic nuclei of WAG/Rij rats found and 43% lower T-type current amplitude measured in neurons of this nucleus compared to ones of control Wistar rats. We determined microRNA rno-mir-1 as a potential $Ca_v3.2$ mRNA negative regulator in rat thalamus and brain cortex.

Keywords: T-type calcium channels, patch-clamp, gene expression, thalamus, somatosensory cortex, absence epilepsy, Wistar strain, WAG/Rij strain, microRNA, single cell RT-PCR

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГАМК – гамма-аміномасляна кислота

ЕЕГ – електроенцефалографія

кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота

ЛДЯ – латеродорзальне ядро таламуса

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

НПКК – низькопорогові кальцієві канали

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ЦНС – центральна нервова система

WAG/Rij – Wistar Albino Glaxo rats from Rijswijk (щери Wistar Albino Glaxo з міста Райсвік)