

УДК 577.25

## ВЛИЯНИЕ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (GDNF) НА УРОВЕНЬ мРНК ГЕНОВ АПОПТОЗА Bax И Bcl-xl В МОЗГЕ МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ПАТОЛОГИЧЕСКОМУ ПОВЕДЕНИЮ

© 2014 г. А.С. Цыбко, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 14 сентября 2014 г. Принята к публикации 6 ноября 2014 г.

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), как и другие нейротрофические факторы, обладает способностью подавлять процессы апоптоза *in vitro*. В то же время ничего не известно про анти-апоптотическую активность GDNF *in vivo*. В работе исследован эффект центрального введения GDNF на уровень мРНК генов проапоптотического белка Bax и антиапоптотического белка Bcl-xl в мозге мышей линии ASC, характеризующихся генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению, и «недепрессивной» родительской линии СВА. Показано, что инъекция GDNF приводит к увеличению уровня мРНК гена Bcl-xl в гиппокампе мышей обеих линий ( $p < 0,05$ ), а также мРНК гена Bax ( $p < 0,01$ ) в гиппокампе мышей ASC. Таким образом, мы обнаружили как анти-, так и проапоптотические эффекты GDNF *in vivo*, которые, по-видимому, в значительной степени зависят от генотипа животных. Также выявлены существенные межлинейные различия в уровне мРНК генов Bax и Bcl-xl. Было показано, что у мышей линии ASC существенно повышен уровень мРНК гена Bax ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) во всех исследованных структурах, а также уровень мРНК гена Bcl-xl ( $p < 0,01$ ) в среднем мозге. Полученные результаты указывают как на активацию процессов апоптоза у мышей ASC, так и на существенные компенсаторные изменения, вероятно, направленные на повышение у них порога нейронального апоптоза.

**Ключевые слова:** гены апоптоза, депрессивно-подобное поведение, Bax, Bcl-xl, GDNF, мыши ASC.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует значительное число доказательств того, что депрессивные расстройства сопряжены с активацией иммунных, воспалительных, оксидативных и нитрозативных стрессовых путей (Maes, 2008; Maes *et al.*, 2011; Moylan *et al.*, 2013). Внешние стрессовые факторы в совокупности с внутренними стрессорами (например с воспалением) могут индуцировать указанные пути, что подтверждает их вовлечение в этиологию депрессии (Maes, 2008; Anisman, 2009; Miller *et al.*, 2009). Кроме того, известно, что депрессия сопровождается структурными изменениями в

гиппокампе, префронтальной коре, миндалине, опоясывающей извилине и базальных ганглиях (Campbell, MacQueen, 2006). Одним из основных механизмов, подавляющих нейрогенез и провоцирующих депрессивные состояния, являются процессы апоптоза (Kubera *et al.*, 2011). Существуют два основных пути клеточной смерти – внешний, опосредуемый рецепторами фактора некроза опухоли, и внутренний (также называемый митохондриальным), контролируемый белками семейства Bcl-2 (Youle, Strasser, 2008). Белки данного семейства подразделяются на три группы: ингибиторы апоптоза, белки с проапоптотической активностью, а также отдельная группа регуляторных белков (Youle,

Strasser, 2008). Белки ингибиторы апоптоза обладают выраженным функциональным антагонизмом по отношению к Вах (Kim *et al.*, 2005). Особый интерес среди антиапоптотических белков представляет Bcl-x1, который проявляет чувствительность к стрессовым воздействиям, антидепрессантам и стабилизаторам настроения (Kosten *et al.*, 2008; Kubera *et al.*, 2011; Dygalo *et al.*, 2012; Shishkina *et al.*, 2012).

Представление о том, что эффективность антидепрессантов в значительной степени зависит от усиления процессов нейрогенеза и нейрональной пластичности (Duman, Aghajanian, 2012), способствует интенсивному изучению нейротрофических факторов как мишеней для антидепрессантной терапии. Более того, нейротрофический фактор мозга (BDNF) уже долгое время рассматривается как антидепрессантный агент (Siuciak *et al.*, 1997; Shirayama *et al.*, 2002; Hoshaw *et al.*, 2005; Naumenko *et al.*, 2012). Глиальный нейротрофический фактор (GDNF), известен, в первую очередь, как перспективное средство для лечения болезни Паркинсона (Peterson, Nutt, 2008), однако сведения об участии GDNF в патогенезе депрессии (Liu *et al.*, 2012) позволили рассматривать его как потенциальный антидепрессантный агент. Хотя в наших предыдущих исследованиях GDNF не оказал отчетливого антидепрессантного действия, нами был выявлен ряд интересных эффектов на поведение мышей линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) и экспрессию у них ключевых генов 5-НТ системы (Семенова и др., 2013; Naumenko *et al.*, 2013). Немаловажным свойством нейротрофических факторов является их антиапоптотическая активность, направленная на подавление про- и активацию антиапоптотических белков, в том числе Bcl-x1. На сегодняшний день данные свойства обнаружены практически у всех основных нейротрофинов и ростовых факторов, таких как NGF (Mogi *et al.*, 2000), FGF-2 (Kim *et al.*, 2012), TGF- $\beta$ 1 (Buisson *et al.*, 2003), BDNF (Chao *et al.*, 2011) и GDNF (Cao *et al.*, 2013). Однако практически все антиапоптотические эффекты GDNF продемонстрированы в культурах клеток. Существует единственная публикация, посвященная антиапоптотическому эффекту GDNF *in vivo* (Oo *et al.*, 2003), не объясняющая возможный механизм, которым

этот эффект достигается. Кроме того, известно лишь, что GDNF активирует экспрессию Bcl-2, но нет данных о влиянии на экспрессию Bcl-x1. Другим важным вопросом является оценка эффекта GDNF у мышей ASC. Данная линия была создана А.В. Куликовым в ИЦиГ СО РАН путем селекции на высокую предрасположенность к катаlepsии. Мыши ASC характеризуются выраженными депрессивно-подобными чертами поведения и проявляют чувствительность к антидепрессантам, т. е. соответствуют критериям генетической модели депрессии (Kulikov *et al.*, 2008; Tikhonova *et al.*, 2013).

Таким образом, целью данной работы стало выявление эффекта центрального введения GDNF на уровень мРНК генов белков апоптоза Вах и Bcl-x1 в мозге мышей с генетически детерминированным депрессивно-подобным поведением и мышей родительской «недепрессивной» линии СВА.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Опыты проводили на взрослых самцах мышей линии ASC, отличающихся наследственной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению (Kulikov *et al.*, 2008), и мышках родительской «недепрессивной» линии СВА. Животных содержали в пластиковых клетках размером 40 × 30 × 15 см в стандартных условиях (температура 18–22 °С, относительная влажность 50–60 %, естественное освещение – 12 ч света и 12 ч темноты) со свободным доступом к стандартной пище и воде. За 2 дня до проведения эксперимента мышей рассаживали в индивидуальные клетки для снятия групповых эффектов. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996).

**Препарат.** GDNF человека («Peprotech», США) растворяли в стерильной воде и вводили мышам в левый боковой желудочек мозга (AP: –0,5 мм, L: –1,6 мм, DV: 2 мм) (Slotnick, Leonard, 1975) в дозе 800 нг на животное. Выбор низкой дозы препарата (менее 0,1 мкг) продиктован имеющимися в литературе данными об отсутствии токсических эффектов GDNF при его введении в небольшой концентрации (Taylor

*et al.*, 2013). Перед процедурой центрального введения препарата животных подвергали кратковременному (20–30 с) эфирному наркозу. Животные контрольной группы получали инъекции стерильной воды. Объем жидкости, вводимой центрально, составлял 5 мкл. Через 21 день животные были декапитированы, были взяты средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора. Образцы хранились при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  до процедуры выделения РНК.

**Выделение общей РНК.** Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent («Life technologies», USA) в соответствии с инструкцией производителя. РНК была разведена водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранилась при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее (Науменко, Куликов, 2006; Naumenko *et al.*, 2008).

**Реакция обратной транскрипции.** Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкМ стерильного KCl в объеме 16 мкл, денатурирована при  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин на амплификаторе NuBaid Omn-E (UK), после чего был проведен отжиг при  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин, затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (200 ед.), Tris-HCl (pH = 8,3, 0,225 мкмоль), смесь dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и  $\text{MnCl}_2$  (0,03 мкмоль). Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при  $41\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR).** Праймеры, исполь-

зуемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл.), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «Биосан» (г. Новосибирск). 1 мкл кДНК смешивали с 2,5 мкл ПЦР буфера (содержит интеркалирующий краситель SYBR green I и референсный краситель ROX), 2,5 мкл 2,5 мМ дНТФ, 2,5 мкл 25 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2,5 мкл смеси праймеров (прямого и обратного), 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и стерильной воды до конечного объема 25 мкл. При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов «Синтол» (г. Москва, Россия). ПЦР была проведена на амплификаторе C1000 Thermo cycler (Bio-Rad, USA) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 цикл; 10 с при  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 с при  $59\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ГФД) или  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Вах, Vcl-xl), 30 с при  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 40 циклов. Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировалась одновременно в отдельных пробирках и использовалась как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – log P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением Bio-Rad. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (ГФД), выполняющей функцию внутреннего стандарта.

**Статистическая обработка результатов.** Результаты были представлены как  $m \pm \text{SEM}$  и сравнивались с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным множественным сравнением

Таблица

Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{\text{отж.}}$ , $^{\circ}\text{C}$	Длина продукта ПЦР, п.н.
<i>Vax</i>	F5'-catctttgtggctggagtcctc-3' R5'-aagtgacctgaggtttattggc-3'	64	216
<i>Vcl-xl</i>	F5'-tggatctctacgggaacaatgc-3' R5'-gtggctgaagagagattgtgg-3'	64	197
<i>ГФД</i>	F5'-gcaaggtcatcccagactg-3' R5'-gtccaccacctgttctgtag-3'	59	326

по Фишеру с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0.

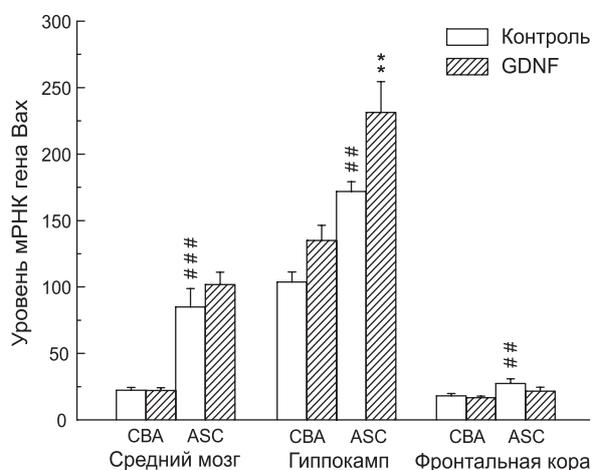
Работа с животными выполнялась в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (гранты Минобрнауки России №RFMEFI61914X0005 и №RFMEFI62114X0010).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект GDNF ( $F_{1,30} = 10,9; p < 0,01$ ) и линии ( $F_{1,30} = 36,02; p < 0,001$ ), но не взаимодействия этих факторов ( $F_{1,30} = 1,07; p > 0,05$ ) на уровень мРНК гена, кодирующего проапоптотический белок Вах в гиппокампе (рис. 1). Апостериорное сравнение показало, что внутрижелудочковое введение GDNF привело к значительному повышению уровня мРНК Вах у мышей ASC ( $p < 0,01$ ), но не у мышей CBA ( $p = 0,09$ ). Вместе с этим у мышей ASC наблюдается более высокий уровень мРНК гена Вах по сравнению с мышами CBA ( $p < 0,01$ ). В среднем мозге и фронтальной коре также

выявлен сильный эффект линии ( $F_{1,30} = 98,3; p < 0,001$  в среднем мозге и  $F_{1,29} = 10,2; p < 0,01$  во фронтальной коре), но не GDNF ( $F_{1,30} = 1,35; p > 0,05$  в среднем мозге и  $F_{1,29} = 2,7; p > 0,05$  во фронтальной коре) и взаимодействия GDNF × линия ( $F_{1,30} = 1,39; p > 0,05$  в среднем мозге и  $F_{1,29} = 0,9; p > 0,05$  во фронтальной коре). Апостериорное сравнение показало, что и в среднем мозге, и во фронтальной коре у мышей ASC повышен уровень мРНК гена Вах по сравнению с мышами линии CBA ( $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно) (рис. 1).

Внутрижелудочковая инъекция GDNF оказала существенный эффект на уровень мРНК гена антиапоптотического белка Bcl-x1 в гиппокампе мышей ASC и CBA (рис. 2). Двухфакторный дисперсионный анализ показал эффект линии ( $F_{1,30} = 5,53; p < 0,05$ ), GDNF ( $F_{1,30} = 11,9; p < 0,01$ ), но не взаимодействия факторов ( $F < 1; p > 0,05$ ). GDNF вызвал повышение уровня мРНК Bcl-x1 как в гиппокампе мышей ASC ( $p < 0,05$ ), так и мышей CBA ( $p < 0,05$ ). Также выявлен эффект GDNF во фронтальной коре

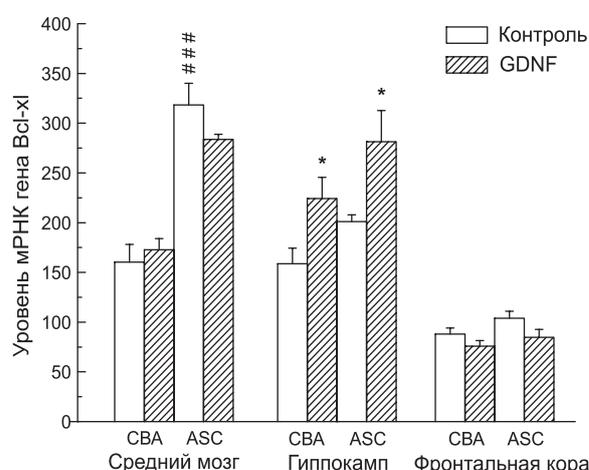


**Рис. 1.** Влияние GDNF на уровень мРНК гена Вах в структурах мозга мышей ASC и CBA.

Число копий кДНК Вах отнесено на 100 копий кДНК ГФД.  $n \geq 8$ . \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с контролем ASC; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  по сравнению с контролем CBA.

**Fig. 1.** Effect of GDNF on the Bax mRNA level in brain divisions of ASC and CBA mice.

The level of Bax gene expression is assessed as the number of cDNA copies per 100 copies of GAPDH cDNA. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM for at least eight animals, and the groups are compared using two-way ANOVA. \*\*  $p < 0,01$  with reference to control ASC animals; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  with reference to control CBA animals.



**Рис. 2.** Влияние GDNF на уровень мРНК гена Bcl-x1 в структурах мозга мышей ASC и CBA.

Число копий кДНК Вах отнесено на 100 копий кДНК ГФД.  $n \geq 8$ . \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем ASC и CBA; ###  $p < 0,001$  по сравнению с контролем CBA.

**Fig. 2.** Effect of GDNF on the Bcl-x1 mRNA level in brain divisions of ASC and CBA mice.

The level of Bcl-x1 gene expression is assessed as the number of cDNA copies per 100 copies of GAPDH cDNA. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM for at least eight animals, and the groups are compared using two-way ANOVA. \*  $p < 0,05$  with reference to control ASC and CBA animals; ###  $p < 0,001$  with reference to control CBA animals.

( $F_{1,28} = 5,5; p < 0,05$ ), который, однако, не подтвердился при апостериорном сравнении, показавшем лишь тенденцию к понижению уровня мРНК Bcl-x1 у мышей линии ASC ( $p = 0,06$ ). В среднем мозге выявлен лишь эффект линии ( $F_{1,29} = 63,3; p < 0,001$ ) (рис. 2), выраженный в существенно более высоком уровне мРНК гена Bcl-x1 у мышей ASC по сравнению с мышами CBA ( $p < 0,001$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нами впервые показано, что GDNF способен увеличивать уровень мРНК антиапоптотического белка Bcl-x1 *in vivo*. Активирующий эффект GDNF на экспрессию антиапоптотического белка Bcl-x1 в гиппокампе мышей ASC и CBA сходен с эффектом антидепрессантов ингибиторов MAO A и обратного захвата серотонина. Известно, что обработка флюоксетином и моклобемидом стволовых клеток, полученных из гиппокампа крысы, существенно повышает экспрессию Bcl-x1 и Bcl-2 (Chiou *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007); антидепрессанты ребоксетин и транилципромин повышают экспрессию Bcl-x1 в гиппокампе крыс *in vivo* (Kosten *et al.*, 2008). Также показано увеличение экспрессии гена Bcl-x1 в стволе мозга крыс после хронического введения флюоксетина на фоне стресса (Shishkina *et al.*, 2012). Усиление экспрессии гена Bcl-x1, наблюдавшееся у животных, получивших инъекцию GDNF, вероятно, также направлено на минимизацию эффектов проапоптотических белков. Молекулярные механизмы, путем которых GDNF может регулировать экспрессию Bcl-x1, в точности не известны. Можно предположить, что GDNF оказывает воздействие на MAPK сигнальный путь и транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B, подобно BDNF, для которого уже показан подобный путь регуляции белков группы Bcl-2 (Kosten *et al.*, 2008; Dygalo *et al.*, 2012).

В экспериментах на культурах клеток было показано снижение экспрессии гена Bax после обработки GDNF (Cao *et al.*, 2013), однако *in vivo* GDNF, напротив, увеличил уровень мРНК Bax в гиппокампе мышей ASC. Подобный эффект может быть связан с особенностями самих мышей данной линии. Ранее нами неоднократно была продемонстрирована повышен-

ная чувствительность мышей ASC к действию нейротрофических факторов BDNF и GDNF (Naumenko *et al.*, 2012, 2013). В частности, это выражалось в изменении экспрессии ключевых генов серотониновой системы, не наблюдавшемся у мышей CBA. Не исключено, что у мышей ASC повышенную чувствительность к GDNF проявляют не только 5-HT система, но и ряд других важных систем, в том числе тех, что контролируют процессы апоптоза. Важно и то, что повышение уровня мРНК гена Bax также сопровождалось повышением уровня мРНК гена Bcl-x1, что еще раз подчеркивает важность сохранения баланса про- и антиапоптотических молекул для поддержания достаточной стрессоустойчивости животных.

Интересным результатом данной работы являются выявленные нами межлинейные различия в уровне мРНК генов Bax и Bcl-x1. Во всех исследованных структурах мозга у мышей линии ASC наблюдается существенно более высокий уровень мРНК гена Bax, чем у мышей линии CBA. Ранее у мышей ASC были выявлены нейроанатомические изменения, выраженные в уменьшении размеров промежуточного мозга (включая гипоталамус) и стриатума (Tikhonova *et al.*, 2013). Наличие нейродегенеративных изменений может свидетельствовать об усилении процессов апоптоза, о чем можно судить по увеличению экспрессии гена одного из основных проапоптотических белков – Bax. С другой стороны, в среднем мозге мышей ASC нами выявлен повышенный уровень мРНК гена Bcl-x1. Известно, что в ответ на острый стресс существенно повышается экспрессия Bcl-x1 (Shishkina *et al.*, 2012). Повышение уровня мРНК Bcl-x1 по отношению к уровню мРНК Bax может повышать порог нейронального апоптоза (Dygalo *et al.*, 2012; Shishkina *et al.*, 2012), что, в свою очередь, может усиливать стрессоустойчивость животных. Наличие же высокого уровня мРНК Bcl-x1 в мозге мышей ASC свидетельствует о глубоких компенсаторных изменениях, возможно, направленных на устранение эффектов Bax.

Таким образом, нами впервые показано, что центральная инъекция GDNF приводит к существенному увеличению уровня мРНК белков апоптоза Bax и Bcl-x1. Кроме того, нами выявлены существенные изменения в уровне

мРНК Вах и Bcl-x1 у животных с наследственной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению, что может свидетельствовать о повышении у них порога нейронального апоптоза.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (грант № 14-25-00038).

## ЛИТЕРАТУРА

- Науменко В.С., Куликов А.В. Количественное определение экспрессии гена 5-HT1A серотонинового рецептора в головном мозге // Молекуляр. биология. 2006. Т. 40. С. 37–44.
- Naumenko V.S., Kulikov A.V. Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain // Mol. Biol. (Mosc). 2006. V. 40. No. 1. P. 37–44. (In Russian).
- Семенова А.А., Базовкина Д.В., Цыбко А.С., Науменко В.С., Попова Н.К. Влияние GDNF на поведение мышей линии ASC с высокой наследственной предрасположенностью к катаlepsии // Журн. высш. нерв. деятельности. 2013. Т. 63. С. 495–501.
- Semenova A.A., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Naumenko V.S., Popova N.K. Effect of GDNF on the behavior of ASC mice with high hereditary predisposition to catalepsy // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 2013. V. 63. No. 4. P. 495–501. (In Russian).
- Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder // J. Psychiatry Neurosci. 2009. V. 34. P. 4–20.
- Buisson A., Lesne S., Docagne F., Ali C., Nicole O., MacKenzie E.T., Vivien D. Transforming growth factor-beta and ischemic brain injury // Cell Mol. Neurobiol. 2003. V. 23. No. 4/5. P. 539–550.
- Campbell S., MacQueen G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders // Curr. Opin. Psychiatry. 2006. V. 19. No. 1. P. 25–33.
- Cao J.P., Niu H.Y., Wang H.J., Huang X.G., Gao D.S. NF- $\kappa$ B p65/p52 plays a role in GDNF up-regulating Bcl-2 and Bcl-w expression in 6-OHDA-induced apoptosis of MN9D cell // Int. J. Neurosci. 2013. V. 123. No. 10. P. 705–710.
- Chao C.C., Ma Y.L., Lee E.H. Brain-derived neurotrophic factor enhances Bcl-xL expression through protein kinase casein kinase 2-activated and nuclear factor kappa B-mediated pathway in rat hippocampus // Brain Pathol. 2011. V. 21. No. 2. P. 150–162.
- Chen S.J., Kao C.L., Chang Y.L., Yen C.J., Shui J.W., Chien C.S., Chen I.L., Tsai T.H., Ku H.H., Chiou S.H. Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotonergic differentiation through bcl-2 // Curr. Neurovasc. Res. 2007. V. 4. No. 1. P. 19–29.
- Chiou S.H., Ku H.H., Tsai T.H., Lin H.L., Chen L.H., Chien C.S., Ho L.L., Lee C.H., Chang Y.L. Moclobemide upregulated Bcl-2 expression and induced neural stem cell differentiation into serotonergic neuron via extracellular-regulated kinase pathway // Br. J. Pharmacol. 2006. V. 148. No. 5. P. 587–598.
- Duman R.S., Aghajanian G.K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets // Science. 2012. V. 338. No. 6103. P. 68–72.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Shishkina G.T. Increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain is associated with resilience to stress-induced depression-like behavior // Cell. Mol. Neurobiol. 2012. V. 32. No. 5. P. 767–76.
- Hoshaw B.A., Malberg J.E., Lucki I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects // Brain Res. 2005. V. 1037. P. 204–208.
- Kim H.R., Heo Y.M., Jeong K.I., Kim Y.M., Jang H.L., Lee K.Y., Yeo C.Y., Kim S.H., Lee H.K., Kim S.R., Kim E.G., Choi J.K. FGF-2 inhibits TNF-2 mediated apoptosis through upregulation of Bcl2-A1 and Bcl-xL in ATDC5 cells // BMB Rep. 2012. V. 45. No. 5. P. 287–292.
- Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 333. No. 2. P. 336–343.
- Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S., Russell D.S., D'Sa C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures // Neuropsychopharmacology. 2008. V. 33. P. 1545–1558.
- Kubera M., Obuchowicz E., Goehler L., Brzeszcz J., Maes M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression // Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2011. V. 35. No. 3. P. 744–759.
- Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice // Genes Brain Behav. 2008. V. 7. P. 506–512.
- Liu Q., Zhu H.Y., Li B., Wang Y.Q., Yu J., Wu G.C. Chronic clomipramine treatment restores hippocampal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression // J. Affect. Disord. 2012. V. 141. No. 2/3. P. 367–372.
- Maes M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative and nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression // Neuro. Endocrinol. Lett. 2008. V. 29. No. 3. P. 287–291.
- Maes M., Galecki P., Chang Y.S., Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness // Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2011. V. 35. No. 3. P. 676–692.
- Miller A.H., Maletic V., Raison C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression // Biol. Psychiatry. 2009. V. 65. P. 732–741.
- Mogi M., Kondo A., Kinpara K., Togari A. Anti-apoptotic action of nerve growth factor in mouse osteoblastic cell line // Life Sci. 2000. V. 67. No. 10. P. 1197–1206.
- Moylan S., Maes M., Wray N.R., Berk M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to dis-

- ease evolution and resistance, and therapeutic implications // *Mol. Psychiatry*. 2013. V. 18. No. 5. P. 595–606.
- Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Semenova A.A., Tsybko A.S., Il'chibaeva T.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders // *J. Neurosci. Res.* 2013. V. 91. No. 12. P. 1628–1638.
- Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains // *Neuroscience*. 2012. V. 214. P. 59–67.
- Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain // *J. Neurosci. Methods*. 2008. V. 170. P. 197–203.
- Oo T.F., Kholodilov N., Burke R.E. Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal glial cell line-derived neurotrophic factor *in vivo* // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. No. 12. P. 5141–5148.
- Peterson A.L., Nutt J.G. Treatment of Parkinson's disease with trophic factors // *Neurotherapeutics*. 2008. V. 5. No. 2. P. 270–280.
- Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 3251–3261.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior // *Neuropharmacology*. 2012. V. 62. No. 1. P. 177–183.
- Siuciak J.A., Lewis D.R., Wiegand S.J., Lindsay R.M. Anti-depressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997. V. 56. P. 131–137.
- Slotnick B.M., Leonard C.M. A Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain. Rockville. Maryland: U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1975.
- Taylor H., Barua N., Bienemann A., Wyatt M., Castrique E., Foster R., Luz M., Fibiger C., Mohr E., Gill S. Clearance and toxicity of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHu GDNF) following acute convection-enhanced delivery into the striatum // *PLoS One*. 2013. V. 8. No. 3. e56186.
- Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Tsybko A.S., Bazhenova E.Y., Naumenko V.S., Akulov A.E., Moshkin M.P., Popova N.K. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response // *Behav. Brain Res.* 2013. V. 243. P. 53–60.
- Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. No. 1. P. 47–59.

## THE EFFECT OF GLIAL CELL-LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF) ON mRNA LEVEL OF APOPTOTIC GENES BAX AND BCL-XL IN BRAIN OF MICE GENETICALLY PREDISPOSED TO PATHOLOGICAL BEHAVIOR

A.S. Tsybko, T.V. Il'chibaeva, V.S. Naumenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: antoncybko@mail.ru

### Summary

Like other neurotrophic factors, GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) can inhibit apoptosis *in vitro*. However, we know nothing about the antiapoptotic activity of GDNF *in vivo*. An important question is the assessment of GDNF effect in cataleptic ASC mice, genetically predisposed to depressive-like behavior. This prompted us to investigate the effects of central GDNF administration on the levels of mRNAs for the pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-xl in brains of the «depressive» ASC mouse strain or the parental «nondepressive» CBA strain. We found that GDNF injection led to an increase in Bcl-xl mRNA level in the hippocampi of both strains ( $p < 0,05$ ), as well as the Bax mRNA level ( $p < 0,01$ ) in the hippocampi of ASC mice. Surprisingly, the obtained data showed not only anti- but also pro-apoptotic effects of GDNF *in vivo*, which could be genotype-dependent. Moreover, we found significant interstrain differences in Bax and Bcl-xl mRNA levels. The Bax mRNA level was elevated ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) in all investigated brain divisions of ASC mice, and Bcl-xl mRNA level was elevated in the midbrain ( $p < 0,01$ ). To sum up, our data demonstrate both an activation of apoptosis processes in brains of ASC mice and significant compensatory changes probably directed to the rise of the threshold for neuronal apoptosis.

**Key words:** apoptotic genes, depressive-like behavior, Bax, Bcl-xl, GDNF, ASC mice.