

На правах рукописи

**Рязанцева
Мария Андреевна**

**НАРУШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ
ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в лаб. Ионных каналов клеточных мембран Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Казначеева Елена Валентиновна
заведующая лабораторией
Ионных каналов клеточных мембран
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
цитологии Российской Академии Наук,
Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Фирсов Михаил Леонидович
директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова Российской
Академии Наук, Санкт-Петербург

доктор биологических наук
Савватеева-Попова Елена Владимировна
Заведующая лабораторией Нейрогенетики
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «...» ... 201... г. в ... часов
на заседании диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по
адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт Института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты Института: cellbio@incras.ru

Факс Института: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
<http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан «...» ... 201... г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Актуальность проблемы определяется ее социальной и экономической значимостью. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием среди людей старше 60-ти лет. Результаты проведенного популяционного исследования в Научно-методическом центре по изучению болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней расстройств НЦПЗ РАМН показали, что на долю БА с поздним началом приходится почти половина случаев деменции в пожилом возрасте (Калын и соавт, 2001). БА характеризуется потерей синапсов и массовой гибелью нейронов в области коры больших полушарий и гиппокампа. Симптомами БА являются потеря памяти и когнитивных способностей. Этиология БА до конца не изучена, в связи с этим не существует эффективного лечения (Bekris et al., 2010). В последнее десятилетие нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах рассматривается как одно из ключевых событий при развитии патологии БА и других нейродегенеративных заболеваний, поэтому элементы кальциевой сигнализации в нейронах представляют собой привлекательную мишень для разработки новых фармакологических агентов для лечения (Berridge, 2010). В основе процессов памяти лежат такие механизмы синаптической пластичности как долговременная потенция (LTP) и долговременная депрессия (LTD). Данные механизмы напрямую зависят от регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах и запускаются под контролем изменений концентрации кальция в цитоплазме (Harney et al., 2006). Гибель клеток в результате апоптоза, аутофагии или окислительного стресса также регулируется сигнальными каскадами, связанными с изменениями концентрации кальция в цитоплазме (Harr et al., 2010; Henke et al., 2013). Нарушения активности различных типов кальциевых каналов и регуляции внутриклеточной концентрации кальция были показаны непосредственно в клетках пациентов с БА (Ito et al., 1994; Jaworska et al., 2013). Большинство случаев наследственной формы БА (НБА) вызвано мутациями в гене пресенилин-1 (PS1) (Bekris et al., 2010). Недавние исследования показали, что, по всей видимости, к нарушениям кальциевого гомеостаза приводит накопление полноразмерного белка PS1, который в результате мутаций снижает способность к эндопротеолизу (Honarnejad et al., 2013). В последние несколько лет особое внимание уделяется кальциевым каналам, как новым возможным мишеням для разработки лекарственных препаратов в терапии БА, с целью устранения патологических состояний, связанных с нарушениями кальциевого гомеостаза (Oulès et al., 2012; Anekonda et al., 2011; Henke et al., 2013; Shilling et al., 2014). В частности, было обнаружено, что в лимфоцитах пациентов с БА увеличена активность депо-управляемых кальциевых каналов (Jaworska et al.,

2013). Изучение механизмов данных нарушений является приоритетной задачей фундаментальной медицины, решение которой связано с созданием и совершенствованием животных и клеточных моделей БА. Использование подобных моделей дает возможность не только исследовать молекулярную природу заболевания, но и на основе полученных данных проводить направленное тестирование потенциальных лекарственных препаратов.

Стимуляция рецепторов, сопряженных с G-белками и тирозиновыми киназами, в нейронах приводит к активации фосфолипазы C и последующему гидролизу инозитол-4,5-бисфосфата с образованием диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата. При стимуляции рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3R) и/или рианодинового рецептора (RyR) в мембране эндоплазматического ретикулума происходит выход кальция через катионный канал соответствующего рецептора. Снижение концентрации свободного кальция в просвете эндоплазматического ретикулума, так называемое опустошение кальциевого депо, приводит к активации кальциевых каналов в плазматической мембране и входу кальция в клетку из внеклеточной среды. Данный процесс называется депо-управляемым кальциевым входом, а кальциевые каналы, активирующиеся в ответ на опустошение кальциевых депо, называются депо-управляемыми каналами (Parekh et al., 2005; Putney, 2005). Сигнал о снижении концентрации кальция в ЭР передается к каналам в ПМ за счет кальциевых сенсоров – белков STIM1 и STIM2. Эти белки локализованы в мембране ЭР и реагируют на уменьшение концентрации кальция в ЭР, изменяя свою конформацию, что позволяет им связываться с каналами в ПМ и приводить их в активное состояние. Основными субъединицами депо-управляемых каналов являются белки семейств TRPC и Orai (Smyth, 2010). Нарушения работы депо-управляемых кальциевых каналов связывают с рядом нейродегенеративных заболеваний: болезнь Паркинсона (Selvaraj et al., 2009), болезнь Альцгеймера (Yoo et al., 2000) и латеральный амиотрофический склероз (Kawamata et al., 2014). Выяснение механизмов их активации в норме и патологии, а также поиск возможных фармакологических агентов, влияющих на их активность, таким образом, поможет разгадать механизмы патологий сразу нескольких нейродегенеративных заболеваний.

Цель исследования. Данное исследование направлено на разработку клеточных и трансгенных животных моделей болезни Альцгеймера для выявления нарушений в активности кальциевых каналов и регуляторов внутриклеточной концентрации кальция, связанных с патологией, и создания научного задела в области разработки новых фармакологических агентов для терапии данного заболевания.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие конкретные задачи исследования.

- Задача 1. Создание клеточных моделей болезни Альцгеймера с экспрессией мутантных генов, вызывающих наследственную форму этого заболевания (НБА), и выявление нарушений регуляции кальциевого гомеостаза.

- Задача 2. Поиск молекулярных механизмов, лежащих в основе выявленных патологических изменений в регуляции кальциевого гомеостаза, и поиск возможной молекулярной мишени для потенциального лекарственного препарата и фармакологических агентов на роль лекарственного препарата.

- Задача 3. Создание трансгенной модели болезни Альцгеймера на основе *Drosophila melanogaster* со вставками мутантных генов человека и выявление ее патологического фенотипа.

- Задача 4. Тестирование фармакологических агентов, действующих на молекулярные мишени для устранения патологического фенотипа модели болезни Альцгеймера на основе *Drosophila melanogaster*.

Научная новизна. Выявлены изменения в регуляции кальциевого гомеостаза, происходящие под влиянием экспрессии генов, ассоциированных с БА. Впервые описано влияние мутаций в гене пресенилин-1, приводящих к накоплению полноразмерного белка в нейронах, на депо-управляемые кальциевые каналы. Проведен анализ экспрессии основных генов белков, детерминирующих активность депо-управляемых кальциевых каналов (белки семейства TRPC, белок Orai1, белки STIM1 и STIM2, IP3R), который впервые показал, что изменение активности депо-управляемых кальциевых каналов при наследственной БА вызваны функциональными изменениями в их регуляции, а не изменением в уровне экспрессии генов. С использованием специфических shRNA и конфокальной микроскопии на живых клетках впервые выявлена непосредственная роль сенсорных белков эндоплазматического ретикула STIM в патологических изменениях регуляции концентрации кальция в клетках. Впервые обнаружено патологическое изменение в проведении сигнала от ЭР к кальциевым каналам в плазматической мембране кальциевыми сенсорами STIM. На основании полученных данных сделано предположение о том, что сенсоры STIM могут служить молекулярными мишенями, фармакологическое воздействие на которые могло бы устранять нарушения кальциевого гомеостаза в нейронах при наследственной БА. Впервые проведено тестирование фармакологического агента 2-APB в качестве потенциального лекарственного препарата для терапии наследственной БА на трансгенной *Drosophila melanogaster*, которое показало его эффективность в восстановлении нарушений кратковременной памяти.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Усиление активации депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходит при накоплении полноразмерного белка PS1 и не связано с изменениями уровня экспрессии основных каналообразующих и регуляторных белков депо-управляемого входа кальция.

- Патологические изменения активности депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет гиперактивации кальциевых сенсоров STIM1.

- Экспрессия мутантного человеческого белка PS1 DE9 в нейронах холинэргической нервной системы трансгенных *Drosophila melanogaster* приводит к нарушениям кратковременной памяти.

- Ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB, действующий на сенсоры STIM1, восстанавливает функцию памяти в трансгенных *Drosophila melanogaster*, экспрессирующих мутантный человеческий белок PS1 DE9 в нейронах холинэргической нервной системы.

Теоретическая и практическая значимость. Потенциальными потребителями научного результата могут быть профильные компании (как отечественные, так и зарубежные) в области медицинской биотехнологии и доклинической разработки лекарств (эта часть работы может быть осуществлена в России на базе отечественных центров по доклиническим испытаниям лекарственных средств). В качестве продукта исследования можно рассматривать разработанные клеточные и животные модели, которые возможно использовать как для тестирования потенциальных лекарственных препаратов и разработки новых лекарственных препаратов, так и для дальнейших исследований заболевания. Полученные результаты делают возможным предположение о роли производных вещества 2-APB (2-Аминоэтоксидифенилборат) в качестве потенциального лекарственного препарата для устранения нарушений памяти у пациентов с наследственной формой болезни Альцгеймера. Данное предположение может стать отправной точкой для доклинических испытаний на трансгенных мышинных моделях, которые, в свою очередь, могут дать основу для проведения клинических испытаний. Более того, полученный опыт в исследовании болезни Альцгеймера на клеточных и животных моделях, а также полученные данные могут быть использованы в исследованиях других нейродегенеративных заболеваний.

Личный вклад автора. Результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы. Результаты исследования представлены на Первой международной встрече «Ion Channel Signaling Mechanisms: From Basic Science to Clinical Application» (Марракеш, Марокко, 2011), XIX Международной конференции студентов,

аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, Россия, 2012), Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА (Пушино, Россия, 2012 и 2013 гг.), Русско-Немецком Симпозиуме «Molecular Neurobiology Today and Tomorrow» (Москва, Россия, 2012), III и IV конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2012 и 2014), Международной конференции «Alzheimer's and Parkinson's Disease AD/PD 2013» (Флоренция, Италия, 2013), XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», (Пушино, Россия, 2013), 38-ом и 39-ом конгрессах федерации европейских биохимических обществ (FEBS EMBO) (Санкт-Петербург, Россия, 2013 и Париж, Франция, 2014), Региональной встрече Федерации Европейских Сообществ по Нейронаукам (FENS) (Прага, Чехия, 2013), Русско-Немецком Симпозиуме: «Molecular mechanisms of neurodegeneration» (Берлин, Германия, 2014), 9-ом Форуме Федерации Европейских Сообществ по Нейронаукам (FENS) (Милан, Италия, 2014), Форуме Европейского Кальциевого Сообщества (ECS) (Экс-эн-Прованс, Франция, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, 3 из которых статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, 8 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 210 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы по исследуемой теме, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов экспериментов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 490 источников (из них 489 иностранных). Работа иллюстрирована 45 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы его цель и задачи, приводятся основные положения, выносимые на защиту, научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость, сведения о личном вкладе автора, апробации работы и количестве публикаций по теме диссертации.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе изложены основные представления о механизме развития спорадической и наследственной форм болезни Альцгеймера. Рассмотрены существующие исследования, направленные на разработку новых терапий. Особое внимание уделено роли кальциевой сигнализации, в частности депо-управляемым кальциевым каналам, в развитии нейродегенеративных процессов. Также приведены современные сведения о депо-управляемых кальциевых каналах: регуляции и фармакологии.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки и трансфекция. Клетки нейробластомы человека линии Neuro2a (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН), мышинные фибробласты MEF DKO (клетки MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2, Дюссельдорфский Университет им. Генриха Гейне, Германия), клетки линии HT22 (Дюссельдорфский Университет им. Генриха Гейне, Германия) и клетки линии HEK293T (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM (GIBCO BRL) с добавлением 5% (Neuro2a, MEF, HT22) и 10% (HEK293T) эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, GIBCO BRL) и антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина) при 37 °C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂). За 2 суток до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стёкол (3 мм × 3 мм). Для лучшего прикрепления клеток стекла были обработаны 0,1% поли-L-лизинном. Клетки трансфицировались на второй день после посева. Для трансфекции был использован липидный агент унифектин-56 (ИБХ, Москва). ДНК конструкции, созданные на основе pCDNA3 вектора и содержащие последовательность PS1 дикого типа, PS1 ΔE9 были предоставлены профессором И. Б. Безprozванным (UT Southwestern medical center, США). Для проверки эффективности трансфекции проводилась ко-трансфекция этих ДНК конструкций с вектором pCMS-EGFP, кодирующим последовательность зеленого флуоресцентного белка (GFP), в соотношении примерно 1:3 по массе ДНК векторов. На чашку Петри Ø 2,5 см 70 мкл раствора 10% унифектина-56 в среде DMEM с сывороткой по каплям добавляли в 30 мкл среды, содержащей 1,5 мкг ДНК плазмиды, кодирующей PS1 дикого типа, PS1 ΔE9 и 0,5 мкг ДНК pCMS-EGFP для электрофизиологических исследований. Для исследований на конфокальном микроскопе ДНК плазмиды, кодирующей PS1 дикого типа, PS1 ΔE9 были ко-трансфицированы с вектором pDS, содержащим STIM1-mCherry, в соотношении 2:1. Полученная смесь пипетировали и добавлялась к среде в чашке с клетками. Во всех случаях трансфекция проводилась за 16-18 часов до анализа.

Получение первичной культуры нейронов гиппокампа мышей. В стерильном растворе HBSS при 4 °C производили диссекцию мозга мышей линии C3HA (из вивария Института цитологии РАН) в возрасте постнатальной стадии P 0-1 для извлечения гиппокампа. Полученный ткани центрифугировали и обрабатывали раствором 0,1% трипсина и 0,1% ДНКазы I в течение 6-7 минут при температуре 37 °C. Ферменты инактивировали 10 мл среды для культивирования нейронов (Neurobasal-A, 1% FBS, 3% B27, 0,6 мг/мл L-Gln), а клетки центрифугировали. Полученные культуры рассеивали по чашкам Петри с покровными стеклами, обработанными 0,01% поли-L-лизинном.

Ленти-вирусная трансдукция. Шаттл-векторы, кодирующие PS1 дикого типа или с мутацией, конъюгированные с HA-tag, вектор Δ8.9 и VSVG были предоставлены профессором I. Bezprozvanny (UT Southwestern medical center, США). Шаттл-векторы, кодирующие shRNA к белкам STIM, были приобретены в Sigma-Aldrich (США) и имели ген устойчивости к пурамицину. Вирусы создавались посредством ко-трансфекции шаттл-векторов с упаковочным HIV-1 вектором Δ8.9 и VSVG плазмид покровных гликопротеинов в паковую клеточную линию HEK293T. Для определения титра вируса, использовали метод иммуноокрашивания антителами к HA-tag или определяли по устойчивости к пурамицину.

Для этого клетки нейробластомы рассеивали на покровные стекла. Через день после посева клетки инфицировали вирусом в разведении 1:2, 1:3 или 1:4. Через двое суток клетки фиксировали 3.7% формальдегидом или добавляли в среду пуромицин. Для детектирования HA-tag стекла с фиксированными клетками инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C в PBS с 5% FBS и первыми антителами - антителами к HA-tag (Sigma-Aldrich, США) (1:1000). Клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в PBS со вторыми антителами к иммуноглобулину G кролика, конъюгированными с флуорофором Cy3 (1:500) (Jackson ImmunoResearch, США). С помощью микроскопа Pascal (Zeiss, Германия) определяли процент инфицированных клеток. Для теста по пуромицину проверяли процент выживших клеток. Выбирали соотношение среды с вирусом, дающее эффективность не менее 90%. Выбранное соотношение вируса и среды в дальнейшем использовали для инфицирования клеточных культур. Для эксперимента инфицирование нейронов проводили на 5-7 день после посева.

Получение клеточных лизатов. Клетки и тотальные препараты мозга дрозофил, лизировали в течение 10 мин при 4 °C в растворе, содержащем 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP40, 10% глицерин, 0,2 mM PMSF, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз PIC (Roche, Германия).

Электрофорез белков и иммуноблоттинг. Белки лизатов разделяли электрофоретически в 8-12% полиакриламидном геле в вертикальной камере и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки на иммуноблоте выявляли с использованием коммерческих антител в соответствии с протоколами производителей. Белки на иммуноблотах выявляли с помощью субстрата Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce, США). Эксперименты повторяли как минимум 3 раза, используя разные лизаты клеток. Для контроля равной загрузки дорожек использовали моноклональные антитела против α -тубулина (Sigma, США). Процентное содержание белка сравнивали с помощью денситометрического анализа иммуноблотов программой ImageJ (NIH, США).

Для ко-иммунопреципитации эндогенных белков STIM1 и Orai1, клетки линии Neuro2a были инкубированы в течении 8 минут с раствором HBSS или с бескальциевым раствором (0 Ca) с добавлением 1 мкМ тапсигаргина и затем были лизированы в буфере (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride и ингибиторами протеаз. После очитки и осаждения, лизаты инкубировали с антителами (анти-STIM1, BD Transduction Laboratories, анти-Orai1, Sigma), а затем с промытой G-Сефарозой на вращающейся платформе при T = 4 °C. Затем сефарозные шарики были дважды осаждены центрифугированием и промыты. Элюирование осуществлялось с в раствор 5× буфера Лэммли (Laemmli Buffer). Пробы были разделены на 10% SDS-полиакриламидном геле и проанализированы с помощью иммуноблоттинга. Блоты, полученные в трех независимых экспериментах, затем были проанализированы с помощью программы ImageJ (W.S. Rasband, National Institutes of Health; rsb.info.nih.gov). Все денситометрические показатели были нормализованы на пробы контрольных клеток, экспрессирующих PS1 дикого типа, инкубированные в HBSS.

Измерение динамики внутриклеточных кальциевых концентраций. Клетки были загружены 5 мкМ Fura2-AM (Life Technologies, США) в присутствии 0,025% Pluronic F-127 (Life Technologies) в растворе HBSS (10 mM HEPES, pH 7,4; 130 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂) в течение 50 мин при комнатной температуре. Измерения проводили при смене возбуждающего света с длинами волн 340- и 380-нм с частотой 2 Гц. Эмиссионная флуоресценция измерялась на длине волны 510 нм с помощью программы InCyt Basic I/P (Intracellular Imaging Inc., США). Изменения цитоплазматической концентрации Ca²⁺ были измерены как отношение интенсивностей при 340- и 380-нм возбуждающей длины волны (340/380). Выброс кальция из депо вызывали 1 мкМ тапсигаргина в бескальциевом растворе или опустошение депо осуществляли с помощью 1 mM TPEN в бескальциевом растворе (20 mM HEPES/KOH, pH 7,3; 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA). Депо-управляемый вход кальция был измерен в растворе, содержащем 2 mM кальция (20 mM

HEPES/КОН, pH 7,3; 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂). Растворы содержали также 0,01 mM тетродотоксина и нифедипина.

Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp). В работе использовали метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации «целая клетка» whole-cell. Внутривнутренний раствор содержал (в mM) 135 CsCl (для нейронов) / 120 CsCl, 5 BAPTA-Cs, 30 Cs-HEPES (pH = 7,3), 5,5 Mg-ATP, and 1,63 CaCl₂ (pCa 7,0) или 120 CsCl, 10 BAPTA-Cs, 30 Cs-HEPES (pH = 7,3), 5,5 Mg-ATP (pCa < 9). Внеклеточный раствор (раствор экспериментальной камеры) содержал (в mM): 120 NMDG-Asp, 10 BaCl₂ (0 BaCl₂ для экспериментов с TPEN), 10 Cs-HEPES, pH 7,3 с добавлением 0,01 тетродотоксина (tetrodotoxin, Tocris, США), 0,01 нифедипина (nifedipine, Sigma). Сопротивление пипеток после оплавления составляло 4–8 МОм. Во всех опытах whole-cell на мембране поддерживался потенциал, равный -40 мВ. С периодом в 5 с командный (управляющий) потенциал менялся по следующему алгоритму: сначала подавался потенциал -100 мВ в течение 50 мс, затем следовало линейное нарастание потенциала (voltage ramp) от -100 до +100 мВ в течение 500 мс, после чего потенциал возвращался к -40 мВ. Регистрация токов была проведена с помощью усилителя Axopatch-200B и программного обеспечения pClamp9 (Axon Instruments, США), оцифрована на частоте 5 КГц при помощи Digidata 1332A (Axon Instruments). Интегральные токи нормировались на емкость клетки, которая отражает размер клетки. Интегральные токи, записанные до опустошения кальциевых депо, вычитались для получения чистых значений тока. Для опустошения кальциевых депо клетки использовали 1 мкМ тапсигаргина, 1 mM TPEN или 10 mM BAPTA. Вольтамперные характеристики для токов в ответ на действие фармакологических агентов строились для момента времени, когда развитие тока достигало плато вблизи максимальных значений тока. Для анализа записей использовали программное обеспечение Clampfit (pClamp9, Axon Instruments) и Origin 8 (OriginLab, США). Приведенные в тексте данные представлены средними арифметическими значениями величин и их среднеквадратичными отклонениями (SEM).

Конфокальная микроскопия. Изображения были получены при комнатной температуре с использованием конфокальной микроскопии с вращающимся диском на базе микроскопа Zeiss, оснащенном Yokogawa XCC-X1 блоком и камерой MRM. Слайды были сделаны с помощью программного обеспечения AxioVision (Zeiss). Измерения динамики внутриклеточных белков отслеживали на живых клетках в растворе HBSS (GIBCO) рассеянных в чашки Петри со стеклянным дном. Фокус микроскопа фиксировали на Z-координатах середины клетки с помощью программы. Съемку проводили каждые 5 секунд. Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программы ImageJ.

Создание трансгенной *Drosophila melanogaster*, моделирующей НБА. ДНК конструкция, кодирующая мутантные человеческие гены, связанные с БА, создана путем клонирования кодирующей последовательности из плазмиды Lenti-PS1 DE9 (подарок проф. Bezprozvanny I., UT Southwestern medical center, США) в вектор pUAST с содержащий индуцибельный промотор из 5 сайтов связывания дрожжевого белка-активатора GAL4 (UAS), находящегося в непосредственной близости от корового участка промотора Hsp70 (-43 +204 относительно старта транскрипции), и маркерный ген *white*. Вектор фланкирован концами Р-элемента для встраивания в геном. Для создания трансгенной модели БА на основе *Drosophila melanogaster* ДНК конструкция и Р-элемент с дефектными инвертированными повторами, использованный как источник транспозазы, P25.7wc (Karess and Rubin, 1984), инъектировались в линию y^1w^{1118} на стадии пребластодермального эмбриона, как описано в (Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982). (Плазмиды и линии мух – подарок проф., акад. П.Г. Георгиева, ИБГ РАН) Выжившие мухи были скрещены с линией y^1w^{1118} . Трансгенные мухи отобраны на основе фенотипического проявления экспрессии гена *mini-white*. Полученные трансгены выведены в гомозиготное состояние путем последовательных скрещиваний с мухами-балансерами с балансерными хромосомами, несущими запиратели кроссинговера по второй или третьей хромосоме, имеющими фенотипический маркер (укороченная длина щетинок или загнутые крылья). Полученные гомозиготные трансгены скрещены с

трансгенной линией: w[*]; P{w[+mC]=Cha-GAL4.7.4}19B P{w[+mC]=UAS-GFP.S65T}Myo31DF[T2] (FlyBase, Bloomington Drosophila Stock Center, США), имеющей вставку промотора холинэстеразы, специфического для холинэргических нейронов, контролирующего экспрессию транскрипционного фактора GAL и вставку, кодирующую флуоресцентный белок GFP под контролем промотора UAS.

Тестирование кратковременной памяти *Drosophila melanogaster* и фармакологическое тестирование. Анализ поведенческого фенотипа проводился с помощью стандартизированных тестов, направленных на проверку кратковременной памяти, основанных на стереотипном половом поведении (Kamyshev et al, 1999). Определяли индекс ухаживания у самцов после обучения с нерецептивной самкой, использовали самцов в возрасте 5 и 21 день. Проведение эксперимента и статистическая обработка были осуществлены как в Kamyshev et al, 1999. Линию с экспрессией GFP в холинэргической нервной системе и линию со вставкой мутантного гена человека в геном без его экспрессии использовали в качестве контролей. Тестирование 2-APB (2-Аминоэтоксидифенилборат) проводилось в течении 7 дней до достижения самцами возраста в 21 день. 2-APB добавляли в пищу, в качестве контроля использовали ДМСО в пище и обычную пищу. Использовали протокол на основе Wu et al., 2011.

Статистическая обработка данных. Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего. Анализ с использованием one-way ANOVA был использован для электрофизиологических данных и данных для измерений внутриклеточной концентрации кальция. Student's *t* test был использован для иммуноблотов и данных полученных с помощью конфокальной микроскопии. Для анализа использовали программное обеспечение Origin8 (OriginLab, США). Значимыми считались различия при p : $* < 0.05$, $** < 0.01$ и $*** < 0.001$.

3 и 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание клеточных моделей наследственной БА.

Связанная с наследственной БА (НБА) мутация PS1 ΔE9 приводит к исключению 28 аминокислот из цитоплазматической петлевой области белка, которая содержит сайт эндопротеолитического расщепления. Отсутствие сайта расщепления в последовательности белка PS1 ΔE9 приводит к накоплению его полноразмерной нерасщепленной формы (Hiltunen et al., 2000). Продолжительность жизни PS1 ΔE9 превышает таковую для белка дикого типа; действительно, PS1 ΔE9 обладает относительно высокой стабильностью и более длительным периодом полураспада (~ 40 часов) по сравнению с периодом полураспада PS1 дикого типа (~ 1,5 часа) (Ratovitski et al., 1997). Значительно повышенный уровень полноразмерного белка PS1 ΔE9 был продемонстрирован в человеческих стволовых клетках у пациентов с этой формой наследственной БА (Woodruff et al., 2013). Сообщалось, что PS1 ΔE9 увеличивал амплитуду депо-управляемого входа кальция в клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y (Boyle et al., 2012). Для изучения молекулярных механизмов нарушений регуляции активности депо-управляемых каналов при НБА были созданы клеточные модели. Для этого были использованы первичные культуры нейронов гиппокампа, полученные из мозга мышей линии СЗНА (постнатальный период P 0-1), а также клетки нейробластомы мыши линии Neuro2a. Для экспрессии мутантных белков использовали методы трансфекции и лентивиральной трансдукции (см. Материалы и методы). Экспрессию белков в клетках

подтверждали с помощью иммуноблота или иммуноокрашивания с антителами, специфичными к PS1 человека или HA-tag, который был добавлен к последовательности белка PS1 в ленти-вирусных конструкциях (Рисунок 1).

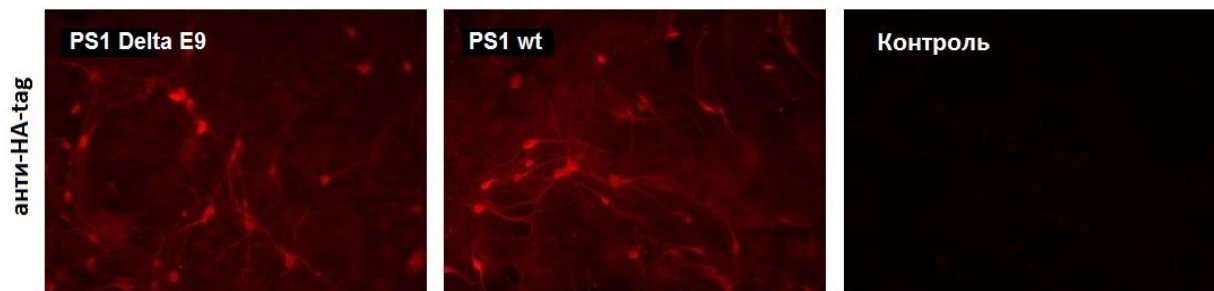


Рисунок 1. Подтверждение экспрессии мутантного белка PS1 (PS1 Delta E9) и PS1 дикого типа в первичной культуре нейронов гиппокампа. Иммуноокрашивание фиксированных нейронов гиппокампа мышей с антителами к HA-tag, а затем антителами, конъюгированными с Cy3.

Экспрессия PS1 Δ E9 увеличивает амплитуду тока депо-управляемого входа кальция (I_{SOC}) в нейронах гиппокампа мыши.

Ранее было показано, что экспрессия PS1 Δ E9 увеличивает амплитуду депо-управляемого входа кальция в клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y (Boyle et al., 2012). В то же время данный эффект никогда не изучался в нейронах гиппокампа, и свойства каналов, которые участвуют в патологическом входе кальция были не известны. Для подтверждения влияния PS1 Δ E9 на кальциевый вход, он был экспрессирован в первичной культуре мышей нейронов гиппокампа. В качестве контроля использовали нейроны с экспрессией PS1 дикого типа, и интактные нейроны. В электрофизиологических экспериментах с нейронами гиппокампа пассивное опустошение кальциевых депо с 1 мкМ Tg активировало токи с линейными вольтамперными характеристиками и потенциалом (E_{rev}) около 30 мВ во всех группах нейронов (Рисунок 2, Б). Было обнаружено, что амплитуда токов I_{SOC} значительно выше в нейронах, экспрессирующих PS1 Δ E9 по сравнению с контрольными нейронами и нейронами, экспрессирующими PS1 дикого типа (Рисунок 2), достигая максимума - $3,76 \pm 1,057$ пА/пФ по сравнению с $-1,41 \pm 0,286$ пА/пФ и $-1,05 \pm 0,242$ пА/пФ, соответственно, при -70 мВ.

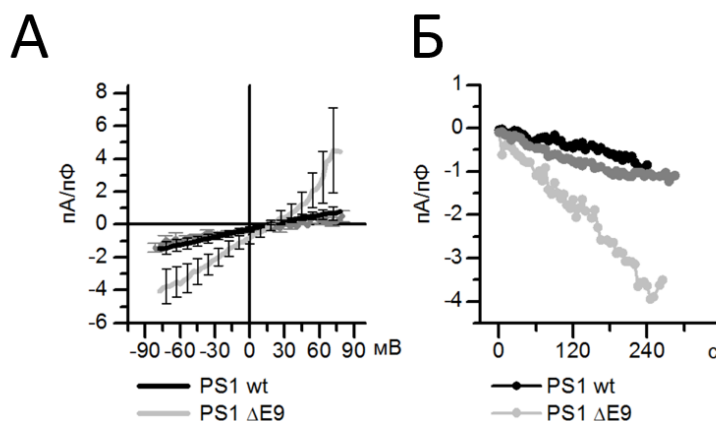


Рисунок 2. Экспрессия PS1 $\Delta E9$ увеличивает амплитуду депо-управляемого входа кальция и I_{SOC} в нейронах гиппокампа мыши. (PS1 wt – PS1 дикого типа, контроль – нейроны без трансдукции) А. Вольтамперные характеристики I_{SOC} . ($n = 7-10$). Данные показаны как среднее $\pm$ SEM Б. Примеры развития тока I_{SOC} во времени при потенциале -80 мВ.

Эксперименты со снижением экспрессии генов канальных субъединиц показали, что высокая амплитуда входа кальция обеспечивалась активностью TRPC1 и Orai1, так как снижение уровней экспрессии этих белков (Рисунок 3, А) значительно уменьшало амплитуды входа (Рисунок 3, Б), что также согласуется с электрофизиологическими данными. В связи с тем, что E_{rev} токов каналов, образованных белками TRPC, составляет не более 20 мВ (Strübing et al., 2003; Storch et al., 2012), а для Orai - превышает 50 мВ, то суперпозиция TRPC и Orai может привести к токам с умеренным E_{rev} .

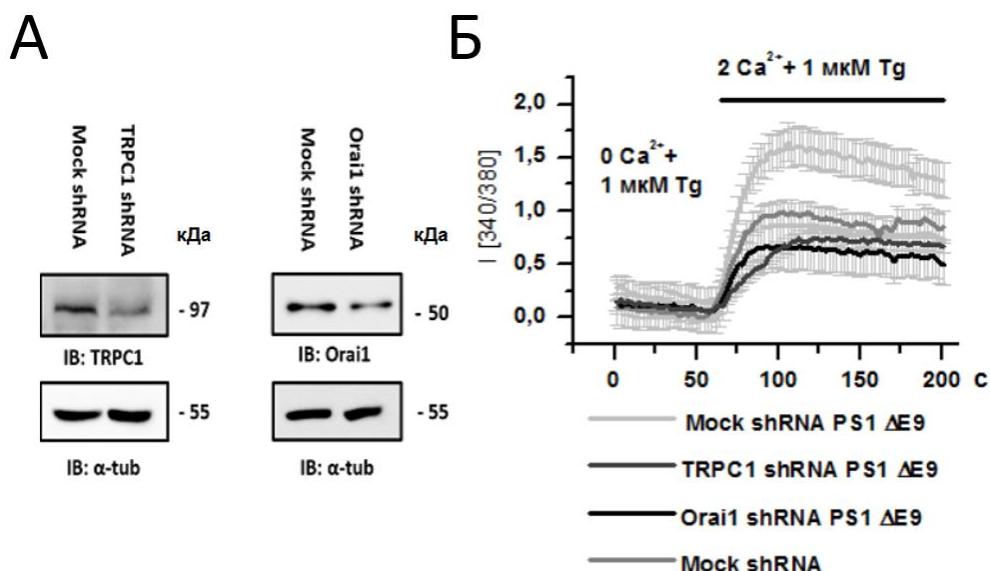


Рисунок 3. Депо-управляемый вход кальция в нейроны с экспрессией PS1 $\Delta E9$ опосредован активацией Orai1 и TRPC1. А. Подавление экспрессии белков осуществляли с помощью shRNA против Orai1 (Orai1 shRNA) против TRPC1 (TRPC1 shRNA), Mock shRNA - контрольная shRNA. А Иммуноблоттинг лизатов культуры нейронов гиппокампа с моноклональными (Orai1) и поликлональными антителами (TRPC1). Загрузка белка

контролировалась иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α -тубулину. Б. Измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция в нейронах гиппокампа. (0 Ca^{2+} - бескальциевый раствор, 2 Ca^{2+} - раствор с 2 мМ кальция). Данные показаны как среднее $\pm$ SEM ($p < 0,05$, $n = 29-37$).

Увеличение уровня полноразмерного белка PS1 при экспрессии неактивного PS1 D257A в клетках мышинных фибробластов MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2 усиливает депо-управляемый вход кальция.

Для того, чтобы подтвердить влияние ослабленного эндопротеолиза на депо-управляемый вход кальция, мутантный ген белка PS1, в котором замена ключевого аспартата D257A приводит к полной потере эндопротеолитической активности, был экспрессирован в клетках MEF DKO с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2. Белок с заменой PS1 D257A, который не подвергается эндопротеолизу (Brunkan et al., 2005), был обнаружен в клеточных лизатах в виде белка около 50 кДа, тогда как PS1 дикого типа подвергался нормальному эндопротеолизу и образовывал две полосы около 50 и 17 кДа (полноразмерный белок и С-терминальный фрагмент) на иммуноблоте (Рисунок 4, А). Эксперименты с измерением динамики внутриклеточной концентрации кальция показали значительное усиление депо-управляемого входа кальция в клетках DKO, экспрессирующих мутантный ген белка PS1, по сравнению с контрольными клетками DKO и DKO, экспрессирующими ген белка PS1 дикого типа (Рисунок 4, Б). Принимая во внимание, что клетки DKO не обладают активной γ -секретазой из-за отсутствия обоих белков PS, образующих каталитический центр фермента γ -секретазы, и то, что PS1 D257A не способен к ферментативной активности, можно заключить, что увеличение уровня полноразмерного PS1 влияет на депо-управляемый вход кальция независимо от производства $\text{A}\beta$ и, кроме того, независимо от PS2.

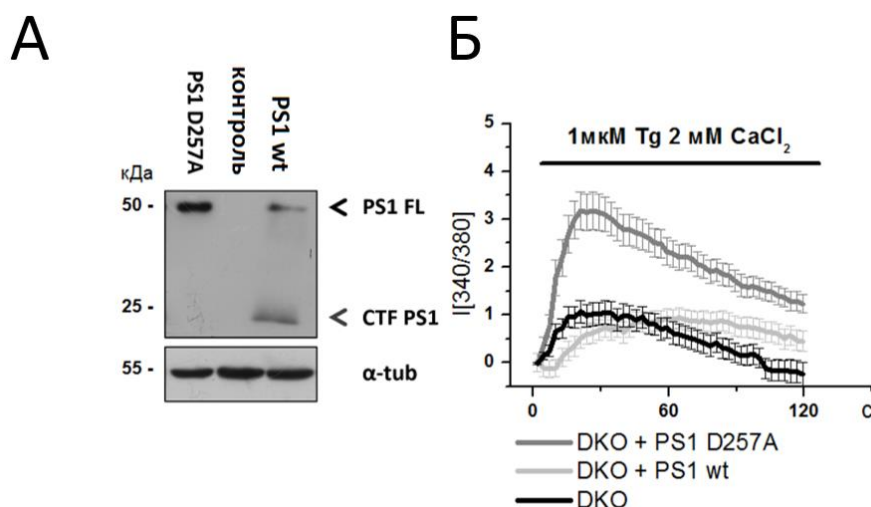


Рисунок 4. Увеличение уровня полноразмерного белка PS1 при экспрессии неактивного PS1 D257A в клетках мышинных фибробластов MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2 (DKO) усиливает депо-управляемый вход кальция. А.

Иммуноблоттинг лизатов MEF DKO, экспрессирующих PS1 дикого типа (PS1 wt), PS1 D257A, или контрольных клеток с моноклональными антителами к PS1 CTF. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α -тубулину. Б.

Эксперименты по измерению динамики внутриклеточной концентрации кальция с клетками MEF DKO, экспрессирующих PS1 дикого типа (PS1 wt), PS1 D257A, или контрольных клеток (Tg – тапсигаргин). Данные показаны как среднее $\pm$ SEM ($p < 0.05$, $n = 63-75$).

Экспрессия PS1 $\Delta E9$ увеличивает амплитуду I_{SOC} и усиливает перемещение сенсоров STIM1 к плазматической мембране в клетках Neuro2a.

Для исследования клеточный механизм гиперактивации депо-управляемых кальциевых каналов в клеточной модели НБА, PS1 $\Delta E9$ был экспрессирован в клетках Neuro2a. Экспрессия PS1 $\Delta E9$ приводила к увеличению уровня полноразмерного белка (Рисунок 5, А). С помощью электрофизиологических экспериментов было обнаружено, что амплитуда I_{SOC} значительно увеличена в клетках, экспрессирующих PS1 $\Delta E9$ по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими только PS1 дикого типа или GFP, достигая максимума - $4,24 \pm 0,179$ пА/пФ, - $0,73 \pm 0,163$ пА/пФ и - $1,09 \pm 0,29$ пА/пФ соответственно при -70 мВ (Рисунок 5, Б, В).

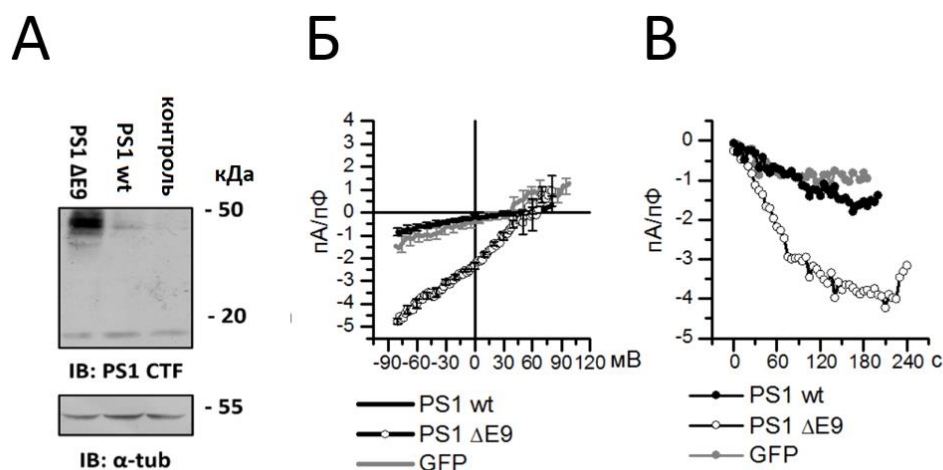
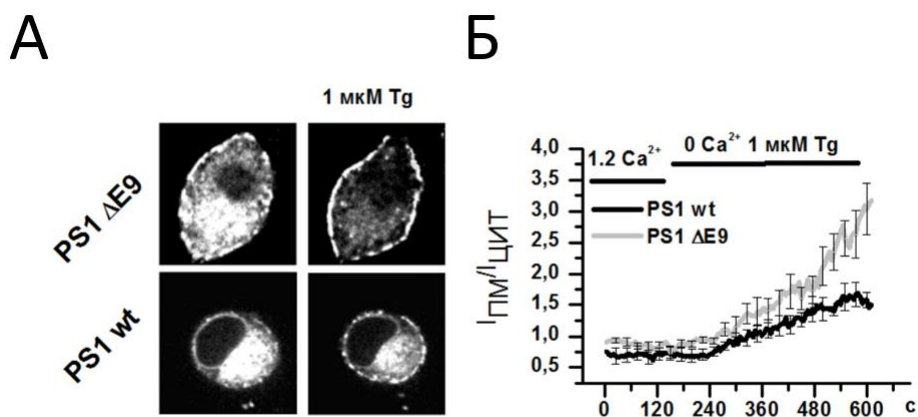


Рисунок 5. Увеличение амплитуды I_{SOC} в клетках Neuro2, экспрессирующих PS1 $\Delta E9$. А. Иммуноблоттинг лизатов Neuro2a с моноклональными антителами к PS1 CTF (С-терминальный фрагмент). Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α -тубулину. Б. Вольтамперные характеристики I_{SOC} . ($n = 5-8$). Данные показаны как среднее $\pm$ SEM В. Примеры развития тока I_{SOC} во времени при потенциале -80 мВ.

Депо-управляемые каналы регулируются сенсорами STIM, которые передают сигнал от ЭР к каналам в ПМ. Предполагалось, что в основном активность депо-управляемых каналов в нейронах регулирует STIM1, в отличие от STIM2, который, как считалось, регулирует спонтанную активность депо-управляемых каналов для поддержания входа кальция в клетку, необходимого для заполнения внутриклеточных кальциевых депо (Gruszczynska-Biegala et al., 2011).



Рисунок

6.

Перемещение STIM1 к примембранной области ПМ усилено в клетках Neuro2a, экспрессирующих PS1 ΔE9. А. Изображения клеток Neuro2a, экспрессирующих STIM1-Cherry и PS1 ΔE9 или PS1 дикого типа (PS1 wt), полученные на конфокальном микроскопе до и после опустошения кальциевых депо с 1 мкМ Tg (8 минут). Б. Динамика внутриклеточного перемещения STIM1-Cherry, выраженная как соотношение флуоресценций в области ПМ $I_{\text{ПМ}}$ и цитоплазмы $I_{\text{ЦИТ}}$ в клетках Neuro2a, экспрессирующих STIM1-Cherry и PS1 ΔE9 или PS1 дикого типа (PS1 wt). Данные нормированы на значения в клетках, экспрессирующих PS1 дикого типа, и показаны как среднее $\pm$ SEM ($p < 0,05$, $n = 10-12$).

Клетки Neuro2a были использованы для анализа внутриклеточной активности сенсоров STIM1 с помощью конфокальной микроскопии на живых клетках, в которых был экспрессирован флуоресцентный белок STIM1-Cherry. После опустошения кальциевых депо с 1 мкМ Tg белок STIM1-Cherry перемещался из центра клетки (области ЭР) в примембранную область ПМ (Рисунок 6, А). Динамика перемещения STIM1-Cherry была проанализирована как отношение флуоресценции в примембранной области ($I_{\text{ПМ}}$) к флуоресценции цитоплазматической области ($I_{\text{ЦИТ}}$). В клетках с экспрессией PS1 ΔE9 было обнаружено усиленное перемещение STIM1 по сравнению с клетками с экспрессией PS1 дикого типа (Рисунок 6, А, Б). Таким образом, можно сделать предположение, что патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет гиперактивности кальциевых сенсоров STIM1.

Экспрессия PS1 ΔE9 не влияет на уровни экспрессии основных белков, регулирующих депо-управляемый вход, в клетках Neuro2a.

Лизаты клеток Neuro2a, экспрессирующих PS1 ΔE9 или PS1 дикого типа, были проанализированы путем иммуноблоттинга с антителами к белкам Orai1, Orai2, являющимся субъединицами депо-управляемых каналов (Рисунок 7). Никаких различий в уровнях этих белков не было выявлено между клетками, экспрессирующими PS1 дикого типа или мутантный ген, а также между этими и контрольными клетками. Уровни экспрессии

канальной субъединицы TRPC1, также оказались одинаковыми в клетках Neuro2, экспрессирующих мутантный ген или PS1 дикого типа, а также в нетрансфицированных клетках (Рисунок 7). Кроме того, мы провели иммуноблоттинг для белков STIM, которые являются переносчиками сигнала от ЭР к каналам в ПМ. Никаких изменений в уровнях этих белков по сравнению с контролем не было выявлено (Рисунок 7). Таким образом, экспрессия PS1 ΔE9 не влияет на уровень экспрессии основных субъединиц депо-управляемых каналов и их регуляторных белков в клетках Neuro2a. Следовательно, можно заключить, что гиперактивация депо-управляемых каналов была вызвана усилением перемещения STIM1 к области ПМ, но не вызвана изменениями уровня белков STIM1 или STIM2.

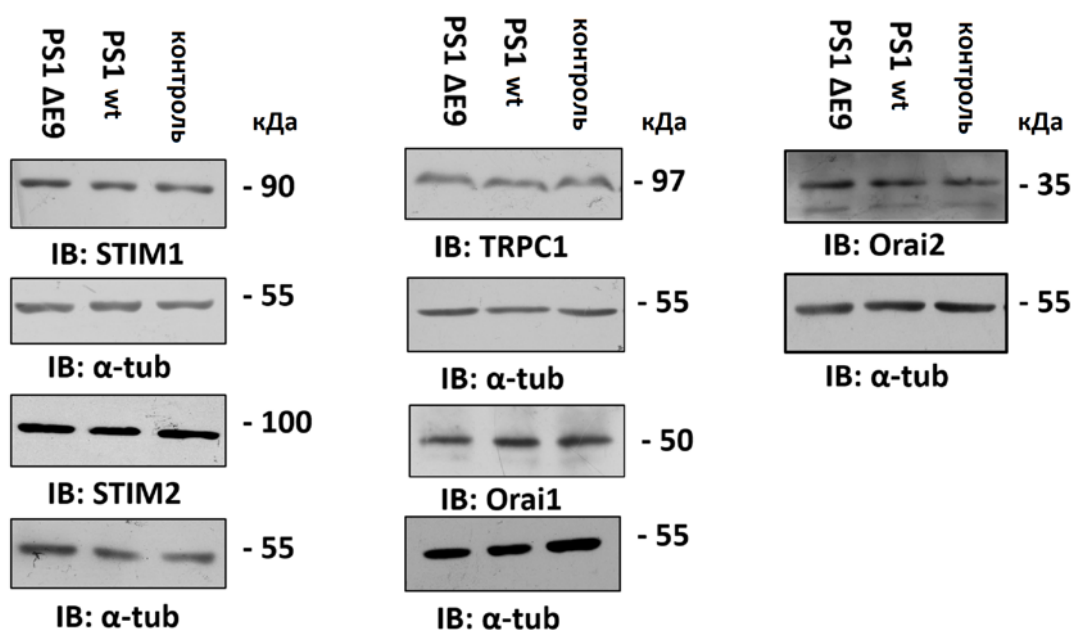
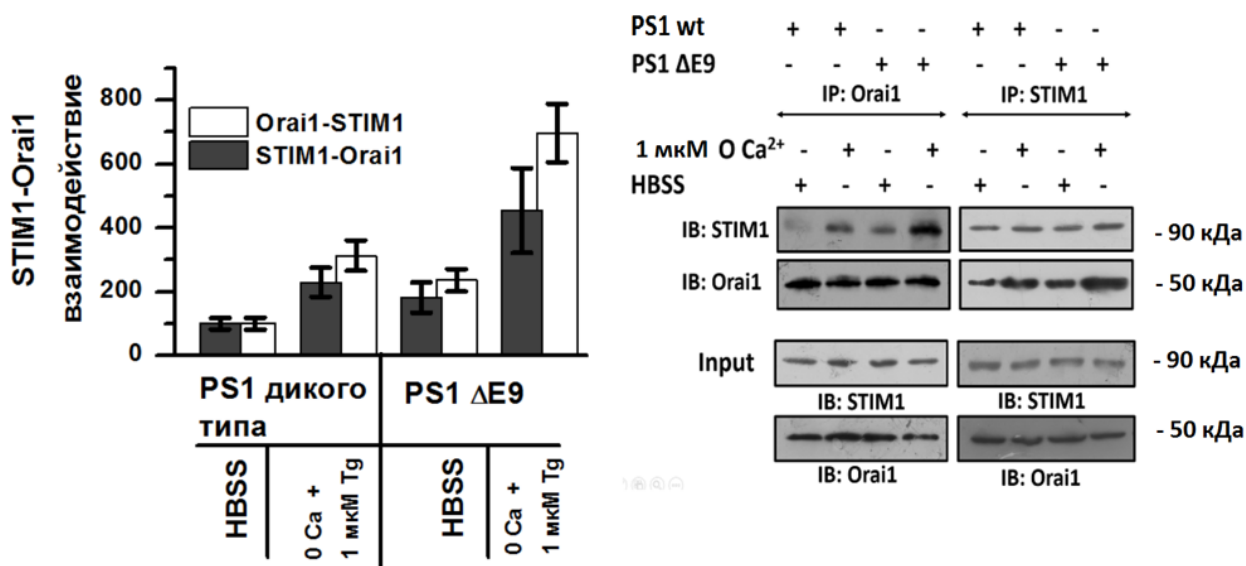


Рисунок 7. Экспрессия PS1 ΔE9 не влияет на уровни экспрессии основных белков, регулирующих депо-управляемый вход. Клетки Neuro2a, экспрессирующие PS1 (PS1 wt) дикого типа человека или мутантный PS1 ΔE9, и нетрансфицированные (контрольные) клетки, анализировали путем иммуноблоттинга с поликлональными антителами к Orai1, Orai2, TRPC1, STIM2 и моноклональными антителами к STIM1. Уровень белка контролировалась иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину.

Экспрессия PS1 ΔE9 увеличивает количество взаимодействующих STIM1 и Orai1 в клетках Neuro2a.

Для подтверждения усиленной активации STIM1 и его взаимодействия с каналами в ПМ после опустошения кальциевых депо, была проведена ко-иммунопреципитация STIM1 и Orai1 в клетках Neuro2a. После того как клетки обрабатывали HBSS или 0 Ca раствором с 1 мкг Tg в течение 8 мин при комнатной температуре, наблюдалось большее количество взаимодействующих STIM1 и Orai1 в клетках, экспрессирующих PS1 ΔE9 по сравнению с клетками, экспрессирующими PS1 дикого типа (Рисунок 8). Таким образом, данные

свидетельствуют в пользу того, что изменения в амплитуде интегральных токов депо-управляемых каналов происходит в результате усиленной активации и перемещения сенсоров STIM1 к примембранной области, где они взаимодействуют с каналами Orai1. Отсюда можно сделать вывод, что патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет активности кальциевых сенсоров



STIM1, передающих патологический сигнал к каналам в плазматической мембране.

Рисунок 8. Ко-иммунопреципитация эндогенных STIM1 и Orai1 из лизатов Neuro2a. Клетки обрабатывали раствором HBSS или 0 Ca с 1 мкМ тапсигаргина (Tg) в течение 8 мин. Клеточные лизаты иммунопреципитировали (IP) с моноклональными антителами к STIM1 или моноклональными антителами против Orai1. Представлены результаты иммуноблоттинга и его денситометрических измерений, отражающих уровень иммунопреципитации относительно контроля (PS1 дикого типа - PS1 wt) до опустошения депо с 1 мкМ тапсигаргина (Tg), принятого за 100%. Результаты были выражены как среднее $\pm$ SEM. ($p < 0,05$, $n = 3$).

Понижение экспрессии STIM1 восстанавливает амплитуду I_{soc} до контрольных значений в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих PS1 ΔE9.

Для исследования роли STIM1 в гиперактивации депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа в мыши, экспрессирующих PS1 ΔE9, был осуществлен knock-down STIM1 с помощью специфической shRNA. Снижение экспрессии STIM1 уменьшило амплитуду I_{soc} до уровня контрольных значений (Рисунок 9, А, Б). Амплитуда токов I_{soc} при потенциале -70 мВ достигала максимума - $3,18 \pm 0,729$ пА/пФ в клетках с экспрессией мутантного гена и неактивной shRNA и $-1,69 \pm 0,404$ пА/пФ в клетках с экспрессией мутантного гена и shRNA STIM1 (Рисунок 9, А, Б).

При этом снижение уровня экспрессии STIM1 в контрольных клетках и клетках, экспрессирующих PS1 дикого типа, не влияло ни на амплитуду тока, ни на другие его

характеристики. Иммуноблоттинг показал отсутствие компенсационной избыточной экспрессии STIM2 в нейронах гиппокампа с нокаутом STIM1 (данные не показаны). Эти данные говорят о том, что STIM1 гиперактивирует депо-управляемые каналы в нейронах гиппокампа с экспрессией PS1 Δ E9 (клеточной модели НБА), но в контрольных («здоровых») нейронах STIM1, по всей вероятности, либо вообще не играет центральной роли в активации депо-управляемых каналов, либо его knock-down может быть полностью скомпенсирован активностью STIM2. Преобладающую роль STIM2 в нейронах гиппокампа можно объяснить более чем двукратной разницей в уровне экспрессии по сравнению со STIM1 (Skibinska-Kijek et al., 2009). В то же время снижение экспрессии STIM2 с помощью shRNA не уменьшало амплитуду I_{SOC} в клетках с экспрессией PS1 Δ E9, которая достигла максимума - $3,84 \pm 0,405$ пА/пФ (Рисунок 9, А). Иммуноблоттинг показал отсутствие компенсационной избыточной экспрессии STIM1 в нейронах гиппокампа с knock-down STIM2. Понижение экспрессии STIM2 в контрольных клетках и клетках с экспрессией PS1 дикого типа не влияла на амплитуду тока (данные не показаны).

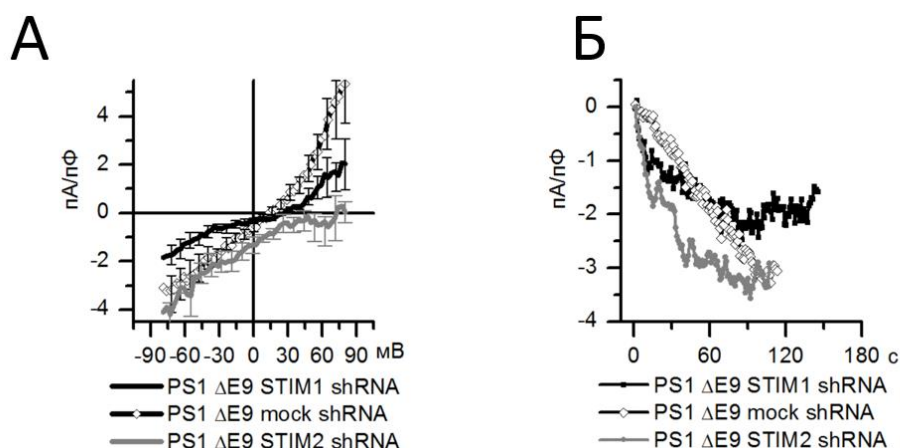


Рисунок 9. Снижение экспрессии STIM1, но не STIM2, восстанавливает нормальную амплитуду I_{SOC} в нейронах гиппокампа мыши с экспрессией PS1 Δ E9. Экспрессию белков подавляли с помощью shRNA против STIM1 (STIM1 shRNA), против STIM2 (STIM2 shRNA), mock shRNA - контрольная shRNA. А. Вольтамперные характеристики I_{SOC} в гиппокампальных нейронах с экспрессией PS1 Δ E9. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM ($p < 0,05$, $n = 6-9$). Б. Примеры развития тока I_{SOC} во времени при потенциале -80 мВ.

Трансгенные *Drosophila melanogaster*, экспрессирующие мутантный ген PS1 Δ E9 в холинергических нейронах, демонстрируют зависимую от возраста потерю кратковременной памяти.

Трансгенные *Drosophila melanogaster* широко используются для моделирования БА. Поскольку у мух не образуются А β -пептиды, как у человека, из-за существенной разницы в аминокислотной последовательности белка APP и пониженной активности β -секретазы,

функция PS1 может быть изучена вне его роли в производстве A β (Moloney et al., 2010). Чтобы исследовать влияние экспрессии мутантного гена PS1 на потерю памяти в клетках, которые вовлечены в патологию БА, были выбраны холинергические нейроны ЦНС, поскольку их потеря является ярким признаком БА (Geula et al., 1989). В ЦНС дрозофил основная передача возбуждения обеспечивается холинергической системой. Используемая линия Cha-GAL4, содержит промотор холинэстеразы для экспрессии GAL4, который затем может запустить экспрессию генов под контролем промотора UAS специфически в холинергических нейронах (Salvaterra et al., 2001). Для создания модели НБА была создана трансгенная линия со вставкой в геном человеческого мутантного гена PS1 Δ E9 под контролем промотора UAS (UAS-PS1 Δ E9). Для этого осуществляли вставку в геном линии y^1w^{1118} . Скрещивание линии Cha-GAL4 с UAS-PS1 Δ E9 затем дало линию с экспрессией человеческого PS1 Δ E9 в холинергических нейронах (Cha-GAL4 UAS-PS1 Δ E9), что подтверждено иммуноблоттингом лизата головного мозга дрозофил с антителами, специфичным к человеческому PS1. Линия с экспрессией только GFP в холинергических нейронах (Cha-GAL4 UAS-GFP) использовалась в качестве контроля.

Половое поведение и ухаживание часто используются в качестве критерия в исследовании обучения и памяти у дрозофил (Siegel et al., 1979; Hall, 1994; Kamyshev et al., 1999; McBride et al., 2005; Bolduc et al., 2008; Choi et al., 2010; Chakraborty et al., 2011; Vartiainen et al., 2014). Самцы дрозофил выполняют характерную последовательность действий в поведении с самкой: ориентация, вибрация, лапанье, лизание, попытка копуляции (Hall, 1994). Процент времени, в течение которого самец проводит какое-либо из этих действий по отношению к цели называется Индекс Ухаживания (ИУ) (см. Материалы и методы) (Siegel et al., 1979). С помощью поведения ухаживания возможно осуществлять обучение самцов мух, которые учатся не воспринимать нерецептивную самку, которая была уже оплодотворена (Siegel et al., 1979; Hall, 1994). Неоплодотворенные самки обычно реагируют на ухаживания путем спаривания. Однако недавно спарившиеся самки невосприимчивы и имеют перекрывающийся, но измененный феромонный профиль, который самцы находят менее привлекательным, чем у девственных самок (Ejima et al., 2005; Ejima et al., 2007). Необученный самец в паре с оплодотворенной самкой изначально будет осуществлять ухаживание, но со временем снизит его интенсивность. После тренировки с оплодотворенной самкой память измеряется как уменьшение ИУ в отношении другой нерецептивной самки по сравнению с необученным контролем.

Продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* составляет около 60 дней (во взрослой форме после вылупления); поэтому взрослая летящая 5-ти дневная муха является «молодой», а муха в возрасте 21 дня является «умеренно состарившейся». Поскольку мутация

PS1 $\Delta E9$ приводит к проявлению симптомов от 40 до 45 лет (Hiltunen et al., 2000), для анализа памяти и обучения были использованы умеренно состарившиеся самцы в сравнении с молодыми самцами. Сначала были проанализированы самцы 5-ти дневного возраста, для которых определяли ИУ для проверки краткосрочной памяти после обучения. Через 1 час тренировки самцы сразу же перемещались в чистую камеру с другой нерецептивной самкой. Для эксперимента использовали линию с экспрессией мутантного гена человека в холинэргических нейронах (Cha-GAL4 UAS-PS1 $\Delta E9$), а в качестве контроля линию с экспрессией GFP в холинэргических нейронах (Cha-GAL4 UAS-GFP) и линию со вставкой человеческого гена, но без его экспрессии (UAS-PS1 $\Delta E9$).

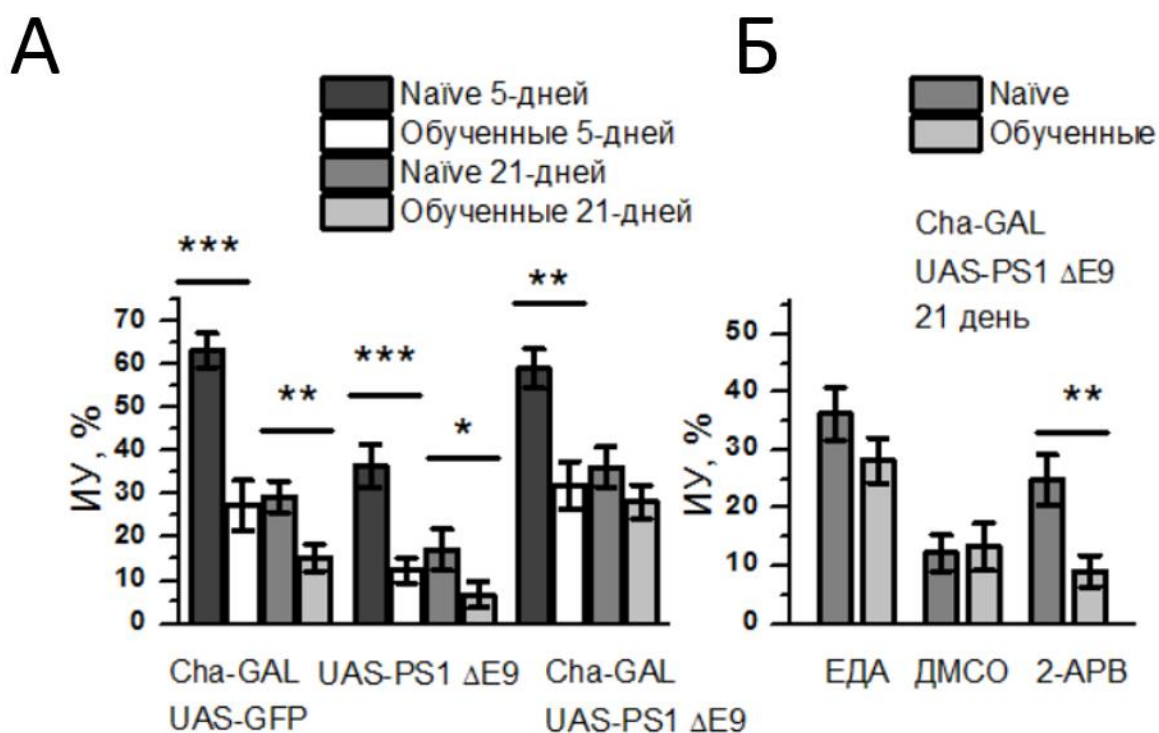


Рисунок 10. Трансгенные дрозофилы с экспрессией PS1 $\Delta E9$ в холинэргической нервной системе демонстрируют нарушения кратковременной памяти с возрастом, которую можно предотвратить с помощью 2-APB. А. Иммуноблоттинг лизатов мозга дрозофил линий y^1w^{1118} , UAS-PS1 $\Delta E9$ и Cha-GAL4 UAS-PS1 $\Delta E9$ с моноклональными антителами к PS1 CTF. Б. Анализ ИУ у дрозофил с экспрессией PS1 $\Delta E9$ в холинэргической нервной системе (Cha-GAL4 UAS-PS1 $\Delta E9$) и контрольных линий (Cha-GAL4-GFP и UAS-PS1 $\Delta E9$) в возрасте 5 и 21 дня. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, $n=20$).

После обучения все линии продемонстрировали снижение ИУ по сравнению с необученными (Naïve) самцами, что доказывает нормальное состояние кратковременной памяти у молодых животных (Рисунок 10, А). Затем мы проанализировали кратковременную память у 21 дневных самцов. У всех линий было отмечено понижение ИУ по сравнению с молодыми самцами, что, по-видимому, связано с возрастными изменениями половой

активности. Контрольные линии продемонстрировали снижение ИУ после тренировки по сравнению с необученными самцами. В тоже время, линия с экспрессией мутантного гена человека PS1 ΔE9 не показывала изменений уровня ИУ после тренировки (Рисунок 10, А). Таким образом, можно заключить, что экспрессия PS1 ΔE9 в холинергических нейронах самцов дрозофил приводила к потере кратковременной памяти, зависящей от возраста. 2-Аминоэтоксидифенилборат (2-APB) является мощным и хорошо известным ингибитором депо-управляемых каналов (Bootman et al., 2002). Ингибирующая активность 2-APB на депо-управляемые каналы была доказана для нейронов (Koss et al., 2013). Аппликация 50 мкМ 2-APB для нейронов гиппокампа, экспрессирующих PS1 ΔE9 человека, понижала амплитуду I_{SOC} до уровня контрольных значений (Ryazantseva et al., 2017). Гиперактивация депо-управляемых каналов в нейронах может быть причиной дефицита памяти у мух с экспрессией человеческого мутанта PS1 ΔE9. Чтобы исследовать роль депо-управляемых каналов в патологических изменениях в модели НБА, мухам ежедневно добавляли в пищу 400 мкМ 2-APB, растворенного в ДМСО. Препарат добавляли в пищу самцов, которых кормили новой смесью с пищей каждый день в течение 7 дней до начала теста. В качестве контроля использовали кормление с нормальной пищей и кормление с добавлением ДМСО в пищу. Мы наблюдали значительное снижение половой активности после кормления ДМСО, что можно объяснить отрицательным эффектом ДМСО на здоровье дрозофил (Mollet et al., 1974; Nazir et al., 2003). Однако принципиально, что для обеих контролей – обычной пищи и ДМСО – в возрасте 21-го дня не было обнаружено существенной разницы в ИУ между обученными и необученными самцами, экспрессирующими PS1 ΔE9 в холинергических нейронах, что указывает на дефицит памяти. В тоже время, у группы, в пищу которой добавляли 2-APB, было обнаружено сохранение работы кратковременной памяти в том же возрасте (Рисунок 10, Б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты работы показывают, что нарушения регуляции кальциевого гомеостаза действительно играют важное значение в процессах нейродегенерации при НБА. Важным аспектом этих процессов являются нарушения активности депо-управляемых кальциевых каналов, фармакологическое действие на которые, возможно использовать в качестве механизма действия новых препаратов. В качестве молекулярной мишени для разработок может быть использован кальциевый сенсор STIM1, регулирующий активность депо-управляемых кальциевых каналов, и вызывающий их гиперактивацию в случае с патологией НБА, вызванной накоплением полноразмерного PS1. Более того, впервые было

продемонстрировано, что кальциевые каналы, участвующие в патологическом входе кальция при НБА, образованы белками Orai1 и TRPC1. Поскольку 2-APB способен предотвращать потерю кратковременной памяти, блокируя активность депо-управляемых кальциевых каналов, то возможно, что производные 2-APB могли бы послужить перспективным предметом дальнейшего исследования, а также разработки лекарств.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена человека с мутацией PS1 DE9, связанной с НБА, в нейронах гиппокампа мышей и нейробластеме мыши линии Neuro2a приводит к увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция.
2. Патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет гиперактивности кальциевых сенсоров STIM1.
3. Изменения в активности депо-управляемых каналов и амплитуде входа кальция в клеточных моделях НБА не связано с изменениями уровня экспрессии основных каналообразующих и регуляторных белков депо-управляемого входа кальция.
4. Патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет активности кальциевых сенсоров STIM1, передающих патологический сигнал к каналам в плазматической мембране.
5. Белки TRPC1 и Orai1 участвуют в образовании депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа мыши и вовлечены в патологически увеличенный вход кальция в клеточных моделях НБА.
6. Экспрессия мутантного гена человека PS1 DE9 в нейронах холинергической нервной системы трансгенных *Drosophila melanogaster* приводит к возрастным нарушениям кратковременной памяти, что подтверждает фенотипическое проявление НБА в этой модели.
7. Ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB, действующий на сенсор STIM1, восстанавливает функцию памяти в трансгенных *Drosophila melanogaster*, экспрессирующих мутантный ген человека PS1 DE9 в нейронах холинергической нервной системы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Henke, N. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress / P. Albrecht, I. Bouchachia, **M. Ryazantseva**, K. Knoll, J. Lewerenz, E. Kaznacheyeva, P. Maher, A. Methner // *Cell Death Dis* – 2013. – V. 4. – e470.
2. **Ryazantseva, M.** Attenuated presenilin-1 endoproteolysis enhances store-operated calcium currents in neuronal cells / K. Skobeleva, L. Glushankova, E. Kaznacheyeva // *J Neurochem.* – 2016. – V. 136. – N. 5. – P. 1085-1095.
3. **Ryazantseva, M.** Presenilin-1 Delta E9 Mutant Induces STIM1-Driven Store-Operated Calcium Channel Hyperactivation in Hippocampal Neurons / A. Goncharova, K. Skobeleva, M. Erokhin, A. Methner, P. Georgiev, E. Kaznacheyeva // *Mol Neurobiol.* – 2017. – doi: 10.1007/s12035-017-0674-4.

Тезисы докладов:

1. **Ryazantseva, M.** Disregulation of Calcium Homeostasis Connected with Familial Alzheimer's Disease / K. Skobeleva, E. Kaznacheyeva // *Biophysical Journal* – 2014. – V. 106. – N. 2. – P. 548a-549a.
2. **Ryazantseva M.** STIM sensors as molecular targets for memory loss treatment connected with calcium homeostasis impairments in Familial Alzheimer's Disease / K. Skobeleva, A. Panova, L. Glushankova, N. Kamyshev, E. Kaznacheyeva // *FEBS Journal* – 2014. – V. 281. – N. 1. – P. 381-382.
3. Skobeleva, K. The M146V mutation in presenilin-1 gene causes disruption of calcium homeostasis / **M. Ryazantseva**, E. Kaznacheyeva // *FEBS Journal* – 2014. – V. 281. – N. 1. – P. 385.
4. **Ryazantseva, M.** Mutations in presenilin-1 gene linked with Alzheimer's disease cease impairments in calcium channels functions in neurons / S. Lvovskaya, I. Pozdnyakov, L. Glushankova, I. Bezprozvanny, E. Kaznacheyeva // *FEBS Journal* – 2012. – V. 279 – Suppl. 1. – P. 367.
5. **Ryazantseva, M.** Familial Alzheimer's disease mutations in presenilin-1 and store-operated calcium entry / L. Glushankova, I. Pozdnyakov, I. Bezprozvanny, E. Kaznacheyeva // *Biophysical Journal* – 2011. – V. 100. – N. 3. – P. 554a.
6. **Ryazantseva, M.** Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations affect calcium channels activity: gain and loss / K. Skobeleva, O. Magnes, E. Kaznacheyeva // *FENS Featured Regional Meeting 11–14 September 2013 Prague Abstract book* – 2013. – P. 195.
7. **Ryazantseva, M.** Familial Alzheimer's disease PS1 gene mutants affect activity of calcium channels differently / K. Skobeleva, O. Magnes, L. Glushankova, E. Kaznacheyeva // *FEBS Journal* – 2013. – V. 280. – Suppl. 1 – P. 419-420.
8. **Ryazantseva, M.** Presenilin-1 Mutants Connected with Familial Alzheimer's Disease affect Activity of Voltage-Gated Calcium Channels / K. Skobeleva, V. Vigont, L. Glushankova, E. Kaznacheyeva // *Biophysical journal* – 2013. – V. 104. – N. 2. – P. 460A