



DOI: 10.5862/JPM.253.13

УДК: 612.82

Д.П. Чернюк<sup>1</sup>, О.Л. Власова<sup>1</sup>,  
И.Б. Безпрозванный<sup>1,2</sup>, Е.А. Попугаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Россия

<sup>2</sup>Юго-Западный медицинский центр университета Техаса, США

## СНИЖЕНИЕ ЧИСЛА АМИЛОИДНЫХ БЛЯШЕК В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ПУТЕМ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ БЕЛКА STIM2

Исследована роль сигнального пути STIM2–зависимый нейрональный депо-управляемый вход кальция (STIM2–nSOCE) на модели болезни Альцгеймера – мышцах линии 5×FAD, экспрессирующих одновременно пресенилиновую и амилоидную токсичность. Обнаружено, что экспрессия белка STIM2 снижается в гиппокампе взрослых мышей 5FAD (возраст 4 и 6 месяцев). Показано, что одновременно с белком STIM2 снижается экспрессия синаптического маркера, белка PSD95. Обнаружено, что гиперэкспрессия белка STIM2 в гиппокампе взрослой мыши снижает в три раза количество амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей 5×FAD. Полученные результаты подтверждают научную гипотезу, согласно которой активация STIM2–nSOCE может иметь терапевтический эффект для лечения болезни Альцгеймера.

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА, АМИЛОИДНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, НЕЙРОНАЛЬНЫЙ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ, STIM2.

### Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) – это нейродегенеративное заболевание, характеризующееся когнитивными нарушениями, в частности потерей памяти. Большинство случаев БА являются спорадическими, возникающими в преклонном возрасте (старше 60 лет). Однако в 1 – 2 % случаев заболевание имеет наследственную природу и возникает в результате мутаций в генах, кодирующих белки пресенилины 1 и 2 (PS1 и PS2 соответственно), а также белок-предшественник амилоида (APP). Первые признаки наследственной формы БА могут появляться уже в возрасте 40 – 50 лет [1 – 3].

На данном этапе научных исследований существует несколько гипотез возникновения и развития БА. Доминантной считается амилоидная гипотеза, согласно которой основным токсичным компонентом нейронов выступает бета-амилоид – продукт нарушенного протеолиза белка APP [4]. С целью разработки терапевтических агентов, направленных на снижение количе-

ства бета-амилоида в головном мозге, было предпринято немало исследований, однако ни одно из них не увенчалось успехом [5, 6]. Таким образом, поиск терапевтических мишеней вне амилоидного патогенеза становится актуальной задачей нейробиологии.

В наших предыдущих исследованиях мы показали, что в клеточных и животных моделях БА наблюдается нарушение регуляции депо-управляемого входа кальция в нейроны (nSOCE – neuronal Store-Operated Calcium Entry) [7 – 9]. Это служит причиной нарушения стабильности синаптических контактов – непосредственных участников физиологических процессов формирования и хранения памяти. Мы показали, что активация пути nSOCE может предотвратить развитие БА. Предыдущие исследования были выполнены на клеточных и животных моделях БА, имитирующих в отдельности либо пресенилиновую, либо амилоидную токсичность. Однако каждая из этих моделей не воспроизводила клиническую картину БА, наблюдаемую у людей. Поэтому, если рассматривать путь nSOCE в качестве

мишени для разработки лекарственных препаратов, то необходимо прежде всего доказать, что активация данного пути способна остановить патогенез БА в более агрессивных условиях, таких как присутствие обеих токсичностей одновременно.

### Постановка задачи

Для исследования БА в лабораторных условиях используются различные мышинные модели наследственной формы БА (НБА), которые представляют собой линии трансгенных мышей с той или иной мутацией, вызывающей БА. Ранее в нашей лаборатории были исследованы две модели НБА:

пресенилиновая – PS1-M146V, которая предполагает наличие мутации в гене, кодирующем белок пресенилин [7];

амилоидная – APPK1, предполагающая наличие мутации в гене, кодирующем APP [9].

Недавно в нашей лаборатории была разработана еще одна, но уже клеточная модель, которая была названа моделью низкой амилоидной токсичности [8].

Для каждой из этих моделей было доказано, что болезнь Альцгеймера является по своей сути болезнью синаптической недостаточности, при которой нарушается путь nSOCE, зависимый от STIM2 (стромальная молекула взаимодействия 2).

Для того чтобы доказать, что нарушение указанного пути лежит в основе патогенеза БА, необходимо было исследовать роль данного синаптического пути в моделях БА, совмещающих в себе обе токсичности: амилоидную и пресенилиновую. Присутствие обеих токсичностей дает более сильный (по сравнению с наличием только одной) фенотип, который характеризуется серьезными когнитивными нарушениями в раннем возрасте.

Цель настоящей работы – выяснить, может ли активация пути STIM2 – nSOCE замедлить развитие болезни в условиях агрессивного фенотипа.

Для решения поставленной задачи были выбраны мыши линии 5×FAD. Такая мышинная модель НБА содержит пять мутаций: три в гене APP и две в гене PSEN1. Мыши

линии 5×FAD демонстрируют агрессивный фенотип БА, который проявляется в серьезных когнитивных нарушениях мозговых функций трансгенных мышей уже в возрасте 4 – 5 месяцев и характеризуется массивной гиперпродукцией амилоидных бляшек в кортексе и гиппокампе этих мышей.

Нарушение пути STIM2 – nSOCE мы оценивали через анализ экспрессии белка STIM2 в гиппокампе взрослых мышей 5×FAD (возраст 4 и 6 месяцев), используя метод Вестерн-блот.

Активация пути STIM2 – nSOCE достигалась за счет вирус-опосредованной гиперэкспрессии белка STIM2 в гиппокампе взрослых мышей. Доставку вируса в гиппокамп осуществляли при помощи стереотаксических инъекций в CA1-область гиппокампа.

### Объекты и методы исследования

**Мыши.** 5×FAD (5 Familial Alzheimer's Disease, MMRC, #34840), мышинная модель НБА, представляет собой линию трансгенных мышей с пятью мутациями: три в генах человеческого APP-белка (Swedish (K670N/M671L), Florida (I716V), London (V717I)) и две в генах пресенилина 1 (M146L, L286V). Мышей содержали в виварии Лаборатории молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого с 12-часовым световым циклом.

**Вирусы.** В работе использовали аденоассоциированные вирусы второго типа (AAV2/1).

Первый вирус – AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP – аденоассоциированный вирус второго типа (AAV2 – Adeno-Associated dependoparvoVirus 2), несущий мышинный ген STIM2, конъюгированный с флуоресцентным белком GFP (Green Fluorescent Protein), с титром, содержащим  $10^{13}$  вирусных частиц на миллилитр. Аденоассоциированный вирус не может самостоятельно реплицироваться, но может встраивать свой геном в геном хозяина. AAV2 является строго специфичным к нейронам. Указанный вирус был наработан в комплексе Gene Transfer Vector Core Уни-

верситета штата Айовы (г. Эймс, США), в бакуловирусной экспрессирующей системе. При инъекции он вызывает гиперэкспрессию белка STIM2.

Второй вирус – AAV2/1CMVNLS-GFP – аденоассоциированный вирус второго типа, несущий ген GFP, с титром  $10^{13}$  вирусных частиц на миллилитр. NLS (Nuclear Localization Signal) означает, что белок GFP экспрессируется только в ядре нейрона. Этот вирус был наработан там же, где первый, и использовался в данной работе в качестве контрольного.

**Генотипирование мышей.** Наличие трансгена в мышинных особях линии 5×FAD проверяли при помощи процедуры генотипирования. Необходимый ДНК-материал выделяли из кончика хвоста животного. Кончик хвоста мыши, помещенный в 125 мкл SNET буфера (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS (pH = 8)) с добавлением 10 мкл протеиназы К, растворенной в воде в концентрации 10 мг/мл, инкубировали при температуре 55°C от 2 до 16 ч. Далее в реакционную смесь добавляли 160 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт в пропорции 25 : 24 : 1. Содержимое пробирки тщательно перемешивали и центрифугировали со скоростью 14000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Верхнюю фракцию, содержащую ДНК, переносили в чистую пробирку и хранили при температуре +4°C. Наличие трансгена проверяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, специфичных для вставки, вызывающей экспрессию трансгенных (человеческих) генов PSEN1 и APP в отдельных нейронах мозга. Используются следующие праймеры:

пара праймеров для определения трансгена PSEN1

5' AAT AGA GAA  
CGG CAG GAG CA 3'  
и  
5' GCC ATG AGG  
GCA CTA ATC AT 3'

(фланкирует участок ДНК длиной 600 нуклеотидных пар оснований);

пара праймеров для определения трансгена APP

5' AGG ACT GAC  
CAC TCG ACC AG 3'  
и  
5' CGG GGG TCT  
AGT TCT GCA T 3'

(фланкирует участок ДНК длиной 350 нуклеотидных пар оснований);

пара контрольных праймеров

5' CTA GGC CAC AGA  
ATT GAA AGA TCT 3'  
и  
5' GTA GGT GGA AAT  
TCT AGC ATC ATC C 3'

(фланкирует участок ДНК длиной 324 нуклеотидных пары оснований).

**Приготовление лизатов гиппокампа.** Мышам в возрасте 4 и 6 месяцев проводили транскардиальную перфузию холодным фосфатным буфером со скоростью 3 мл/мин в течение 10 мин. Перед этим мышь анестезировали 200 мкл раствора уретана (Sigma, U2500-250G) в физиологическом растворе (0,9% NaCl), в концентрации 300 мг/мл. Гиппокамп был извлечен, гомогенизирован и лизирован в буфере со следующим химическим составом, mM: NaCl 137, KCl 2,7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4, EDTA 5,0, EGTA 5,0, PMSF 1,0, NaF 50,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1,0 (pH = 7,2); 1 % CHAPS, ингибиторы протеаз (1 табл. на 100 мл лизирующего буфера, SIGMAFAST Protease Inhibitor tablets, Sigma, S8820-20TAB) и фосфатаз (200 мкл на 100 мл лизирующего буфера, Phosphatase Inhibitor Cocktail, Sigma, P0044-5ML).

Лизирование гиппокампа проводили в течение 1 ч при температуре +4 °C. Далее лизат центрифугировали 10 мин со скоростью 14000 об/мин. Надосадочную жидкость собирали и хранили при температуре -20 °C.

**Вестерн-блот анализ.** Белки, содержащиеся в лизатах гиппокампов, разделяли электрофоретическим методом в полиакриламидном геле состава: 0,375 M трис-HCl

(рН = 8,8), 0,1 % SDS, 0,1% TEMED, 10 % акриламид, 0,3 % бис-акриламид.

Белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида при подаче напряжения 20 В в течение 16 ч. Далее мембрану блокировали в 5 %-м растворе альбумина бычьего сывороточного (BSA) в TBST (50 мМ трис, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween-20 (рН = 7,6)) в течение 1 ч. Содержание различных белков в пробах было проанализировано при помощи антител (перечислены далее).

Первичные антитела: кроличьи anti-STIM2 pAb (1 : 1000, AnaSpec, 54681), мышьиные anti-PSD95 (1 : 1000, Cell Signaling, 3450s), мышьиные anti-actin clone C4 (1 : 1000, Millipore, MAB1501) и мышьиные anti-Beta Amyloid 1–16 (6E10) (1 : 1000, Covance, SIG-39320-500).

Вторичные антитела: anti-rabbit (анти-кроличьи) HRP-conjugated (1:2000, DAKO, P0448) и anti-mouse (антимышинные) HRP-conjugated (1:2000, DAKO, P0447).

Мембрану обрабатывали первичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре или 16 ч при температуре +4 °С. Обработка мембраны вторичными антителами длилась 1 ч при комнатной температуре. После обработки каждой из соответствующих друг другу первичных и вторичных антител мембрану отмывали 5 раз по 5 мин в TBST. Для проявки мембрану инкубировали в течение 1 мин в реактиве, вызывающем хемилюминесценцию (8,5 мл воды, 1,5 мл трис (рН = 8,8), 50 мкл люминола (44 мг/мл), 22 мкл кумаровой кислоты (15 мг/мл), 7 мкл 30%-й перекиси водорода). Сигналы хемилюминесценции регистрировали на рентгеновскую пленку (Medical X-Ray screen film blue sensitive, CEA), их изображения сканировали и сохраняли в формате tiff. Анализ полученных данных проводили с использованием программы Quantity One (программное обеспечение компании BioRad). Измеренный объем зоны исследуемого белка в каждом образце (произведение интенсивности сигнала хемилюминесценции на его площадь) делили на объем зоны актина того же образца, и полученное частное усредняли по трем значениям в каждой группе.

**Стереотаксические инъекции вирусов в СА1-область гиппокампа мышей.** Для стереотаксических инъекций использовались мыши в возрасте 2 мес. Экспериментальной группе мышей вводили вирус AAV2-STIM2 в объеме 3 мкл. За точку с координатами (0,0,0) принимали положение брегма на черепе. Инъекции проводили билатерально с использованием следующих координат:

угол 10° в плоскости *medial/lateral*;  
расстояния были +2,0 мм в плоскости *anterior/posterior*,

+2,6 мм в плоскости *medial/lateral*,

+1,9 мм в плоскости *dorsal/ventral*.

Инъекции проводили со скоростью 0,5 мкл/мин. Каждая экспериментальная группа включала три мыши. Обезболивание животных проводили двумя последовательными внутрибрюшинными инъекциями анестезирующего раствора на основе уретана и ксилазина (4 мл 0,9%-го NaCl, 1 мл препарата Рометар (действующее вещество – ксилазина гидрохлорид), 200 мг уретана (Sigma, U2500-250G)) с интервалом в 10 мин. После операции мышью выводили из наркоза посредством внутрибрюшинного введения 100 мкл раствора препарата Антиседан (0,5 мл препарата (действующее вещество – атипамезол гидрохлорид) в 7 мл 0,9%-го NaCl). Во время операции и реабилитации оптимальную температуру тела мыши поддерживали при помощи термостатируемого коврика (Temperature Controller, RWD Life Science CO., Ltd).

**Приготовление тонких срезов головного мозга мыши.** Через 6 недель инъектированные мыши были перфузированы холодным 4%-м раствором PFA; затем у них проводили экстракцию головного мозга, который на одну ночь помещали в 4%-й раствор PFA, а на следующий день эту жидкую среду заменяли 30%-м раствором сахарозы. После этого с каждого мозга были сделаны тонкие (50 мкм) срезы при помощи вибротома (VIBROTOME 1000 Microtome, IMEB), инструмента с вибрирующим лезвием. Срезы хранили в 0,1%-м растворе NaN<sub>3</sub> в PBS.

**Иммуногистохимическое окрашивание тонких срезов антителами, специфичными к бета-амилоиду.** Детектирование амилоидных (Aβ)-бляшек в тонких срезах осуществ-

вляли при помощи метода иммуногистохимического окрашивания. Для этого срезы сначала промывали в PBS с 0,25%-м содержанием детергента Triton X-100, затем блокировали 5%-м BSA, разведенным в PBS, содержащем 0,25% Triton X-100. После этого срезы инкубировали одну ночь в растворе первичных антител 6E10 к A $\beta$  (1:1000, раствор в PBS с 5%-м содержанием BSA и 0,125%-м содержанием Triton X-100). Первичные антитела 6E10 распознают аминокислотные остатки 1 – 16 в A $\beta$ . После первичных антител срезы инкубировали два часа с вторичными антителами Alexa Fluor-594 (anti-mouse AlexaFluor 594, Invitrogen), растворенными в отношении 1:1000 в PBS с 5%-м содержанием BSA и 0,125%-м содержанием Triton X-100. После окрашивания необходимые области срезов фотографировали при помощи конфокального микроскопа (Thorlabs, США) с использованием 20-кратного объектива (UPlanSApo 20x/0.85 Oil, OLYMPUS).

**Анализ количества амилоидных бляшек.** После регистрации Z-серии снимков (21 кадр, сделанный в плоскости XY через 0,1 мкм по Z-оси, площадь каждого – 491 990 (мкм)<sup>2</sup>), полученных с конфокального микроскопа, использовали программу ImageJ, с помощью которой эти снимки суммировались по интенсивности. В результате с каждой Z-серии было получено более четкое и качественное изображение отснятой области. Далее эти изображения анализировали с использованием программы Icy (создана исследовательской группой Quantitative Image Analysis Unit в Институте Пастера (Париж, Франция)), которая определяла площадь, занимаемую бляшками –  $S_{pl}$ , (мкм)<sup>2</sup>. Для данной операции была использована функция Spot Detector.

**Статистический анализ полученных данных.** Указанный анализ проводили при помощи программного обеспечения Microsoft-EXEL. Все результаты представлены как среднее арифметическое плюс-минус стандартная ошибка от среднего. Оценку значимости различий средних величин проводили при помощи двухвыборочного критерия Стьюдента. Уровень статистической значимости указан на графиках.

### Экспериментальные результаты и их обсуждение

**Уровень экспрессии ряда белков в гиппокампе мышей линии 5×FAD.** Нами исследованы уровни экспрессии белков STIM2, PSD95 и актина в гиппокампальных лизатах мышей 5×FAD. Целью этого исследования было подтверждение тезиса, что мыши линии 5×FAD являются моделью БА, в которой присутствует синаптическая потеря и нарушается путь STIM2 – nSOCE. Для сравнения получены данные для четырех- и шестимесячных мышей. Контрольным экспериментом служила экспрессия исследуемых белков в лизатах мышей дикого типа того же возраста. Для подтверждения экспрессии трансгенного белка APP был выполнен Вестерн-блот анализ с использованием амилоид-специфичных антител 6E10 (Covance), результаты которого представлены на рис. 1, а. График на рис. 1, b демонстрирует результаты количественного анализа экспрессии указанных белков. Данные для белков STIM2 и PSD95 нормированы на Актин. Окраску на актин использовали в качестве контроля равномерной нагрузки белка, а окраску на APP – в качестве доказательства экспрессии трансгена в группе мышей.

Результаты Вестерн-блот анализа свидетельствуют о том, что снижение экспрессии исследуемых белков наблюдается у всех трансгенных мышей линии 5×FAD, но у 6-месячных (номера 6 и 8) это снижение выражено сильнее, особенно для белка STIM2. У 4-месячных трансгенных мышей линии 5×FAD экспрессия белка STIM2 (2 и 4) снижена на 20 % по сравнению с контрольной группой. Для этой группы была также обнаружена тенденция к снижению уровня экспрессии белка PSD95, однако она не достигла статистически значимой разницы (см. рис. 1, а). У мышей 5×FAD в возрасте 6 месяцев экспрессия белка STIM2 снижалась более чем на 75 %, а экспрессия PSD95 – на 50 %. Таким образом, можно сделать вывод о том, что путь STIM2 – nSOCE также нарушен в модели НБА, мышцах линии 5×FAD.

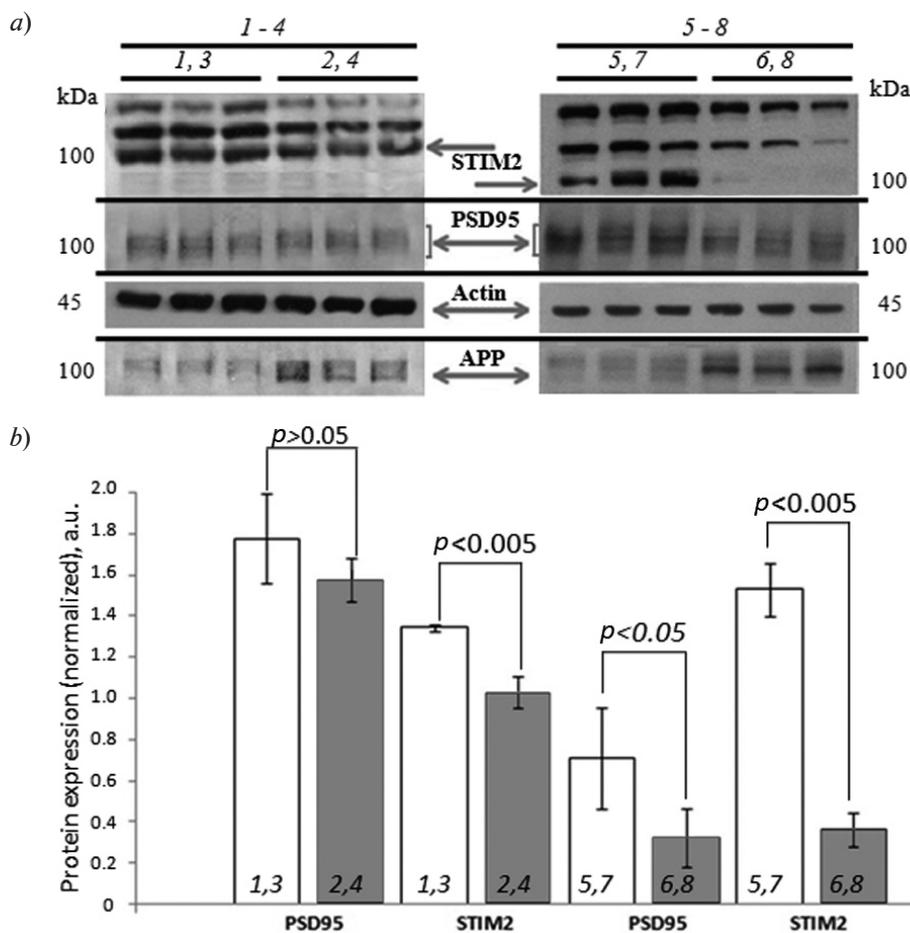


Рис. 1. Экспериментальные данные Вестерн-блот анализа экспрессии четырех белков (STIM2, PSD95, Actin и APP) (a) и результаты их количественного анализа (b). Экспрессия проанализирована в гиппокампальных лизатах 4-(номера 2,4) и 6-(6,8) месячных мышей 5×FAD и особей того же возраста из контрольной группы (1,3 и 5,7 соответственно). Буквой *p* обозначены уровни статистической значимости результатов

**Количество амилоидных бляшек в головном мозге мышей линии 5×FAD.** Мыши этой линии обладают сильным фенотипом, который проявляется в нарушении когнитивных функций в возрасте 4 – 5 месяцев, при этом накопление бляшек в головном мозге наблюдается уже на четвертом месяце. Для анализа количества указанных бляшек использовали метод иммуногистохимического окрашивания бета-амилоида (Aβ) с помощью амилоид-специфичных антител 6E10 (рис. 2, a). Иммуногистохимическое окрашивание производили в тонких срезах головного мозга мышей дикого типа (WT – Wild Type) и трансгенных мышей линии 5×FAD в возрасте 3,5 мес.

Из-за технических особенностей имеющегося в лаборатории конфокального микроскопа отсутствовала возможность визуализировать Aβ-бляшки на всей поверхности коронарного среза. Поэтому было принято решение визуализировать бета-амилоид в пяти различных областях коронарного среза мозга мыши (рис. 2, a). Распределение Aβ-бляшек на поверхности среза оказалось неравномерным. В частности было обнаружено, что амилоидные бляшки в основном присутствуют в коре головного мозга (cortex) и полностью отсутствуют в гиппокампе (hippocampus) исследуемых мышей (см. рис. 2, a).

Для количественного анализа числа

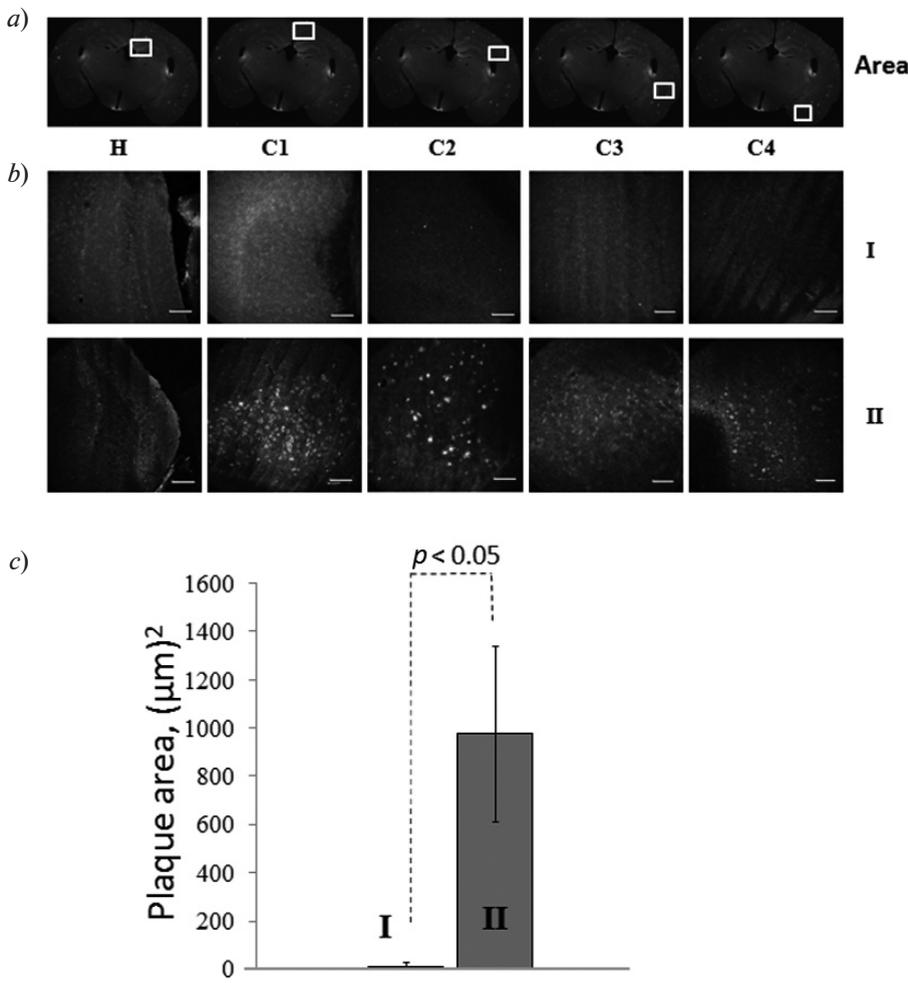


Рис. 2. Области визуализации (a) и анализ числа Аβ-бляшек (b,c) в корональных срезах головного мозга мышей WT (I) и 5×FAD (II) в возрасте 3,5 месяца.  
 (a): Н – гиппокамп, C1 – C4 (кора № 1 – № 4); (b): соответствующие тонкие срезы для мышей WT (I) и 5×FAD (II) с иммуногистохимическим окрашиванием амилоидных бляшек (масштабные отрезки соответствуют 100 мкм); (c): сравнение площадей, занимаемых бляшками на изучаемой области (C1), для мышей I и II

Аβ-бляшек была выбрана кора головного мозга; при этом были взяты его участки C1 (кора № 1), причем с наибольшей плотностью бляшек у мыши линии 5×FAD (рис. 2, b). Анализировали по три среза для трех мышей WT и трех мышей 5×FAD. На рис. 2, c представлены средние значения плюс-минус стандартные ошибки от среднего ( $p < 0,05$ ).

Результаты окрашивания показали, что в мышцах дикого типа полностью отсутствуют амилоидные бляшки (диаграмма I на рис. 2, c), а у мышей 5×FAD средняя площадь, занимаемая амилоидными бляшка-

ми, составила около 1000 (мкм)² (диаграмма II на рис. 2, c).

**Эффект гиперэкспрессии белка STIM2.** Ранее в исследованиях на моделях PS1-M146V, APPK1 наследственной формы болезни Альцгеймера и модели низкой амилоидной токсичности было показано, что гиперэкспрессия белка STIM2 восстанавливает путь STIM2 – nSOCE [7 – 9], и тем самым предотвращает синаптическую потерю и замедляет развитие болезни.

Для того чтобы изучить возможность замедлить развитие патогенеза БА путем гиперэкспрессии белка STIM2 в мышечной

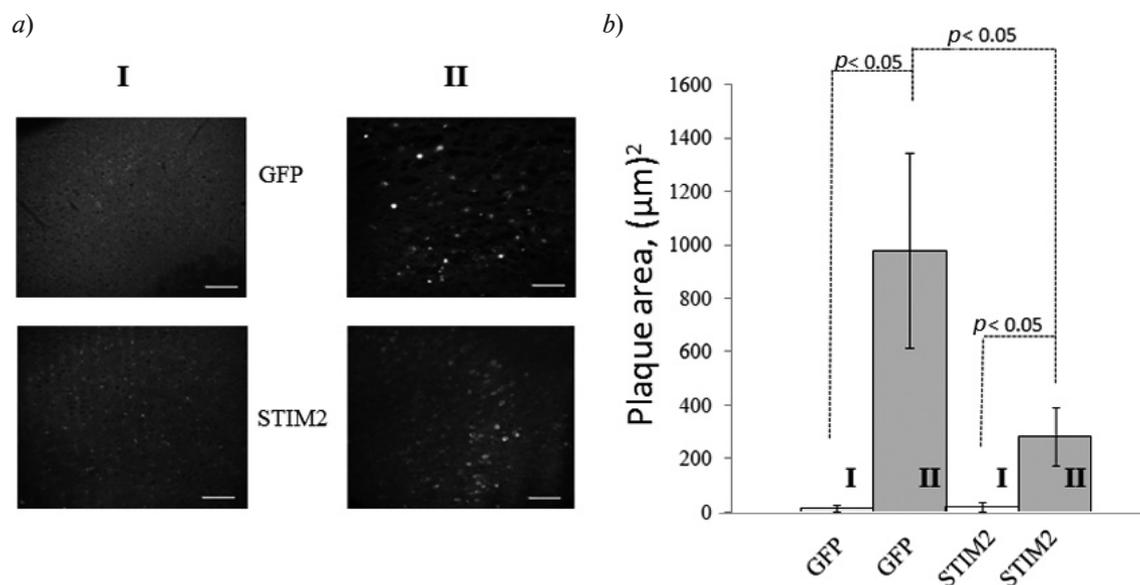


Рис. 3. Влияние гиперэкспрессии белка STIM2 на образование амилоидных бляшек в мозге 3,5-мес. мышей (анализ количества бляшек аналогичен представленному на рис. 2).

(a): примеры иммуногистохимического окрашивания срезов у мышей I и II, инжестированных в 2-мес. возрасте вирусами AAV2/1CMVNLS-GFP (сокращенно GFP) и AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP (сокращенно STIM2); (b): сравнение площадей, занимаемых бляшками на изучаемых областях, для мышей I и II

линии 5×FAD, в настоящей работе были проведены эксперименты, в которых указанная гиперэкспрессия в гиппокампах мышей линии 5×FAD достигалась при помощи стереотаксической инъекции вируса AAV2/1CMVSTIM2WThrGFP в область CA1 гиппокампа двухмесячных мышей. В качестве контроля использовали вирус AAV2/1CMVNLS-GFP. Он так же, как и первый вирус, инжестировался трем трансгенным и трем WT-мышам линии 5×FAD. Через шесть недель (мыши достигли возраста 3,5 месяцев) анализировали количество амилоидных бляшек при помощи иммуногистохимического окрашивания тонких срезов мозга (рис. 3).

Результаты, экспериментов, представленные на рис. 3, убедительно доказывают, что гиперэкспрессия белка STIM2 в три раза снижает количество Aβ-бляшек в коре головного мозга трансгенных мышей линии 5×FAD.

### Заключение

В данной работе изучены особенности патогенеза болезни Альцгеймера на мыши-

ной модели НБА, мышях линии 5×FAD. В своем генотипе эти мыши имеют пять мутаций, при этом две из них вызывают нарушения в функционировании белка PSEN1, а три кодируют мутантный человеческий белок APP. Таким образом, мыши линии 5×FAD реализуют две токсичности: амилоидную и пресенилиновую. Мыши этой линии проявляют когнитивные нарушения и нарушения памяти уже в 4-месячном возрасте, а появление амилоидных бляшек зафиксировано еще раньше – в возрасте двух месяцев [10, 11]. Данные бляшки представляют собой скопление нерастворимых олигомерных форм бета-амилоида Aβ42 и обладают большой токсичностью для окружающих их нейронов.

В соответствии с предыдущими результатами исследований, проведенных в нашей лаборатории, обнаружено, что регуляция сигнального пути STIM2 – nSOCE нарушена у мышей линии 5FAD. Установлено, что снижение экспрессии белка STIM2 наблюдается уже в возрасте 4 месяцев. В данном возрасте снижение экспрессии белка STIM2 предшествует снижению экспрессии

синаптического маркера – белка PSD95 (см. рис. 1). В возрасте 6 месяцев происходит значительное снижение экспрессии как белка STIM2, так и белка PSD95 (см. рис. 1). Полученные результаты позволили предположить, что наиболее эффективным (с терапевтической точки зрения) временем для активации пути STIM2 – nSOCE должна быть ранняя стадия болезни, когда уже присутствуют нарушения кальциевой (см. рис. 1) и амилоидной (см. рис. 2) сигнализации, но они еще не приводят к значительным когнитивным расстройствам. Таким образом, возраст 4 месяца был выбран в качестве ранней стадии развития БА у мышей 5×FAD. Оценка количества амилоидных бляшек в головном мозге подопытных мышей была выбрана в качестве маркера развития патологии БА (см. рис. 2 и 3).

В итоге проведенного исследования обнаружено, что активация пути STIM2 – nSOCE посредством гиперэкспрессии STIM2 в гиппокампе мышей ли-

нии 5×FAD способна замедлить развитие патологии БА, что выражается в снижении количества амилоидных бляшек в коре головного мозга (см. рис. 3, *b*).

Таким образом, полученные в рамках данной работы результаты подтверждают ранее выдвинутую гипотезу о том, что путь STIM2 – nSOCE нарушен при БА [7 – 9]. Соответственно активаторы/модуляторы сигнального пути STIM2 – nSOCE могут быть использованы в качестве потенциальных мишеней для разработки лекарственной терапии БА. В настоящей работе, кроме того, показано, что активация пути STIM2 – nSOCE на ранней стадии может замедлить развитие патогенеза БА, что также соответствует предположению о том, что применение лекарственных препаратов на ранних стадиях болезни более эффективно.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-25-0024 (раздел работы, соответствующий рис. 1 и 2) и грантом частного фонда Династия № ДП-Б-49/15 (раздел работы, соответствующий рис. 3).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] **Hardy J., Selkoe D.J.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // *Science*. 2002. Vol. 297. No. 5580. Pp. 353–356.
- [2] **Hardy J.** The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal // *J. Neurochem*. 2009. Vol. 110. No. 4. Pp. 1129–1134.
- [3] **Bergmans B.A., De Strooper B.** Gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies // *Lancet Neurol*. 2010. Vol. 9. No. 2. Pp. 215–226.
- [4] **Hardy J.A., Higgins G.A.** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // *Science*. 1992. Vol. 256. No. 5054. Pp. 184–185.
- [5] **Cepeda C., Cummings D.M., Andre V.M., Holley S.M.** Genetic mouse models of Huntington's disease: focus on electrophysiological mechanisms // *ASN Neuro*. 2010. Vol. 2. No. 2. P. e00033.
- [6] **Karran E., Mercken M., De Strooper B.** The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011. Vol. 10. No. 9. Pp. 698–712.
- [7] **Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E.** Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice // *Neuron*. 2014. Vol. 82. No. 1. Pp. 79–93.
- [8] **Popugaeva E., Pchitskaya E., Speshilova A., Alexandrov S.** STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity // *Mol. Neurodegener*. 2015. Vol. 10. No. 1. Pp. 37.
- [9] **Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I.** Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease // *J. Neurosci*. 2015. Vol. 35. No. 39. Pp. 13275–13286.
- [10] **Kimura R., Ohno M.** Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5FAD Alzheimer mouse model // *Neurobiol. Dis*. 2009. Vol. 33. No. 2. Pp. 229–235.
- [11] **Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E.** Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation // *J. Neurosci*. 2006. Vol. 26. No. 40. Pp. 10129–10140.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**ЧЕРНЮК Дарья Павловна** – лаборант кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
dashachernuk@gmail.com

**ВЛАСОВА Ольга Леонардовна** – доктор физико-математических наук, профессор кафедры медицинской физики, директор НОЦ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
olvlasova@yandex.ru

**БЕЗПРОЗВАННЫЙ Илья Борисович** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной нейродегенерации НОЦ ФОМБТ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, заведующий кафедрой медицинской физики; профессор физиологии на отделении физиологии Юго-Западного медицинского центра университета Техаса, Даллас, США.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
5323 Harry Hines Blvd., Даллас, Техас, 75390 США  
mnlabspb@gmail.com

**ПОПУГАЕВА Елена Александровна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
lena.popugaeva@gmail.com

---

### *Chernyuk D.P., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B., Popugaeva E.A.* HYPEREXPRESSION OF STIM2 PROTEIN LOWERS THE AMOUNT OF ABETA PLAQUES IN THE BRAIN OF ALZHEIMER'S DISEASE MOUSE MODEL.

The role of STIM2 → nSOCE signaling pathway was investigated in model of Alzheimer's disease (AD), 5FAD mice, that express amyloid and presenilin toxicity simultaneously. It was observed that expression of STIM2 protein was downregulated in the hippocampus of adult 5FAD mice at the ages of 4 and 6 months. It was shown that expression of PSD95 protein was downregulated together with STIM2 protein. It was established that hyperexpression of STIM2 protein in the hippocampus of adult mouse was able to lower the amount of amyloid plaques in the cortex of 5FAD mice by three times. The observed data confirms scientific hypothesis that activation of STIM2-dependent store-operated calcium entry can have therapeutic effect for treatment in AD.

ALZHEIMER DISEASE, AMYLOID TOXICITY, NEURONAL STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY, STIM2, A $\beta$ -PLAQUES.

### REFERENCES

- [1] **J. Hardy, D.J. Selkoe**, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*. 297 (5580) (2002) 353–356.
- [2] **J. Hardy**, The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal, *J. Neurochem*. 110 (4) (2009) 1129–1134.
- [3] **B.A. Bergmans, B. de Strooper**, Gamma-secretases: from cell biology to therapeutic strategies, *Lancet Neurol*. 9 (2) (2010) 215–226.
- [4] **J.A. Hardy, G.A. Higgins**, Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*. 256 (5054) (1992) 184–185.
- [5] **C. Cepeda, D.M. Cummings, V.M. Andre, S.M. Holley**, Genetic mouse models of Huntington's disease: focus on electrophysiological mechanisms, *ASN Neuro*. 2 (2) (2010) e00033.
- [6] **E. Karran, M. Mercken, B. de Strooper**, The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011. 10 (9) (2011) 698–712.
- [7] **S. Sun, H. Zhang, J. Liu, E. Popugaeva**, Reduced synaptic STIM2 expression and impaired

store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice, *Neuron*. 82(1) (2014) 79–93.

[8] **E. Popugaeva, E. Pchitskaya, A. Speshilova, S. Alexandrov**, STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity, *Mol. Neurodegener.* 10(1) (2015) 37.

[9] **H. Zhang, L. Wu, E. Pchitskaya, et al.**, Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease, *J.*

*Neurosci.* 35(39) (2015) 13275–13286.

[10] **R. Kimura, M. Ohno**, Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5FAD Alzheimer mouse model, *Neurobiol. Dis.* 33(2) (2009) 229–235.

[11] **H. Oakley, S.L. Cole, S. Logan, E. Maus**, Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation, *J. Neurosci.* 26(40) (2006) 10129–10140.

#### THE AUTHORS

##### **CHERNYUK Daria P.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation  
dashachernuk@gmail.com

##### **VLASOVA Olga L.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
olvlasova@yandex.ru

##### **BEZPROZVANNY Ilya B.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation  
mnlabspb@gmail.com

##### **POPUGAEVA Elena A.**

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*  
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
lena.popugaeva@gmail.com