

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций  
Кафедра «Медицинская физика»

Диссертация допущена к защите  
зав.кафедрой «МФ»

\_\_\_\_\_ О.Л. Власова

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
**МАГИСТРА**

Тема: *РОЛЬ МУТАЦИИ PSEN1dE9 В РЕГУЛЯЦИИ ДЕПО-  
УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА*

Направление: 16.04.01 Техническая физика

Магистерская программа: Нейробиологическая инженерия

Работа выполнена на базе Лаборатории молекулярной нейродегенерации, СПбПУ  
*название лаборатории и организации*

Выполнил студент гр. 63401/11: \_\_\_\_\_ Кабирова М.О.  
*подпись*

Руководители: \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н., н.с. ЛМН Попугаева Е.А.  
*подпись*

Санкт-Петербург

2017

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ .....	4
ABSTRACT .....	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	9
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Болезнь Альцгеймера.....	11
1.2 Пресенилины и амилоидный белок-предшественник .....	13
1.3 Нейрональный кальциевый сигналинг.....	15
1.4 Кальциевая гипотеза развития БА .....	17
1.5 Модели НБА с мутацией PSEN1dE9.....	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Животные .....	23
2.2 Приготовление и ведение первичной гиппокампальной культуры. ....	23
2.2.1 Выделение культуры.....	23
2.2.2 Поддержание культуры. ....	24
2.2 Ведение культуры клеток линии НЕК283Т.....	24
2.3.1 Размораживание клеток. ....	24
2.3.2 Ведение культуры.....	25
2.4 Кальций-фосфатная трансфекция.....	25
2.5 Кальциевый имиджинг. ....	26
2.5.1 Кальциевый имиджинг клеток линии НЕК293Т.....	28
2.5.2 Кальциевый имиджинг нейронов гиппокампа.....	28
2.5.3 Анализ данных, полученных методом кальциевого имиджинга .....	28
2.6 Анализ морфологии дендритных шипиков в нейронах гиппокампа.....	29
2.7 Статистический анализ.....	29
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	31
3.1 Результаты.....	31
3.1.1 PSEN1dE9 мутация приводит к снижению количества грибовидных	

шипиков в нейронах гиппокампа.....	31
3.1.2 Экспрессия пресенилина-1 с делетированным 9 экзоном вызывает повышение депо-управляемого входа кальция в клетках линии НЕК293Т .....	33
3.1.3 Наличие PSEN1dE9 мутации приводит к увеличению нДУВК в нейронах гиппокампа .....	35
3.2 Обсуждение результатов .....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	39
ВЫВОДЫ .....	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	41

## РЕФЕРАТ

### С.43 Рис. 9 Табл. 1 24 литературных источников

#### БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА, ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ, ГРИБОВИДНЫЕ ШИПИКИ, ПРЕСЕНИЛИНЫ, PSEN1dE9 МУТАЦИЯ

В работе использовались следующие методы: конфокальная микроскопия, приготовление и ведение первичной гиппокампальной культуры, приготовление и ведение культуры линейных клеток линии HEK293T, кальций-фосфатная трансфекция, кальциевый имиджинг, количественный анализ формы и плотности дендритных шипиков в программе Neuron Studio.

В данной работе была исследована PSEN1dE9 мутация, ассоциированная с болезнью Альцгеймера (БА). Было показано, что исследуемая мутация обладает нейротоксическим эффектом, приводя к снижению фракции грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа. Данная мутация также вызывает повышение депо-управляемого входа кальция, что было показано на клетках линии HEK293T и первичной гиппокампальной культуре. Таким образом мы показали, что в отличие от ранее исследованных мутаций, приводящих к понижению нДУВК, использование терапии, направленной на его повышение может стать губительным для пациентов с PSEN1dE9 мутацией, в связи с чем требуется разработка терапии для больных с данной формой БА.

## ABSTRACT

**P. 43 Fig. 9 Tabl. 1 24 references**

ALZHEIMER'S DISEASE, STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY, MUSHROOM SPINES, PRESENILINES, PSEN1dE9 MUTATION

In work were used methods: confocal microscopy, preparation and conducting of the primary hippocampal culture, preparation and conducting of the culture of linear cells of the HEK293T line, calcium-phosphate transfection, calcium imaging, quantitative analysis of dendritic spines density and shape using Neurostudio software.

In this study, the PSEN1dE9 mutation associated with Alzheimer's disease (AD) was investigated. It was shown that this mutation has a neurotoxic effect, leading to a decrease in the fraction of mushroom spines in the hippocampal neurons. This mutation also causes an increase in the store-operated calcium entry, which was shown on the cells of the HEK293T line and the primary hippocampal culture. Thus, we showed that, in contrast to the previously studied mutations leading to the decrease in neuronal store-operated calcium entry, the use of therapy aimed at its increase could be disastrous for patients with a PSEN1dE9 mutation, and this requires the development of therapy for patients with AD.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Болезнь Альцгеймера – нейродегенеративное заболевание, самая распространенная форма деменции в мире;

Нейрональный депо-управляемый вход кальция – один из путей регуляции внутриклеточного уровня кальция, путем высвобождения кальция из внутриклеточных кальциевых депо эндоплазматического ретикулума;

Пресенилины – белки, являющиеся частью активного центра комплекса  $\gamma$ -секретазы, встроенного в мембрану эндоплазматического ретикулума, также выполняющие функцию пассивных каналов утечки кальция из эндоплазматического ретикулума;

Грибовидные шипики – наиболее устойчивая форма дендритных шипиков, отличающиеся большой головкой и тонкой шейкой.

A $\beta$  - бета-амилоид;

ACSF - artificial cerebrospinal fluid;

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid,  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислота;

aph-1 - anterior pharynx defective;

ApoE  $\epsilon$ 4 - apolipoprotein E  $\epsilon$ 4;

APP - amyloid precursor protein, амилоидный белок-предшественник;

BSA – bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин;

Ca<sup>2+</sup> – ион кальция;

CaMK - Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимая протеинкиназа;

CaN - Ca<sup>2+</sup>-зависимый фосфатазный кальцинейрин;

CHAPS - 3-([3-cholamidopropyl] dimethylammonio)-1-propanesulfonate, 3-([3-Холамидопропил]диметиламмоний-)-1-пропансульфонат;

CMF-HBSS - Ca, Mg free Hank's balanced salt solution;

DB - dissection buffer;

DMEM - Dulbecco's modified eagle medium;

DMSO – Dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид;

ECI - enhanced chemiluminescence;

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота;

EGTA - ethylene glycol tetraacetic acid, этиленгликольтетрауксусная кислота;

FBS - fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка;

GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок;

HBSS - Hank's balanced salt solution;

HEK293T - human embryonic kidney 293T, клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека;

InsP3R - 1,4,5-inositol trisphosphate receptor, 1,4,5-инозитол-трифосфатный рецептор;

MGluR5 - metabotropic glutamate receptor 5, метаботропный глутаматный рецептор 5 типа;

MEM NEAA - minimum essential medium non-essential amino acids;

NMDA - N-Methyl-D-aspartate, N-метил-D-аспарат;

nNOS - Ca<sup>2+</sup>-зависимая синтетаза оксида азота;

PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis;

PDL - poly-D-lysine, поли-D-лизин;

pen-2 - presenilin enhancer 2;

PenStep - penicilin/streptomycin, пенициллин/стрептомицин;

PFA – paraformaldehyde, параформальдегид;

PMCA - plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump, кальциевый насос плазматической мембраны;

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride, фенилметилсульфонилфторид;

PS1, PS2 – белки пресенилин-1 и пресенилин-2;

PSA - персульфат аммония;

PSEN1, PSEN2 – гены, кодирующие, соответственно, белки пресенилин-1 и пресенилин-2;

PSEN1dE9 – мутация, делеция 9 экзона в гене, кодирующем белок

пресенилин-1

PSD95 - post synaptic density protein 95, белок постсинаптической плотности 95;

RyanR - рианодиновый рецептор;

SDS - sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия;

SERCA - sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase, кальциевая АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума;

STIM - stromal interaction molecule;

TB - trituration buffer;

TEMED - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин;

TRP - transient receptor potential;

VGCC - voltage-gated calcium channel, потенциал-зависимые кальциевые каналы;

WT - wild type, мыши дикого типа;

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;

БА – болезнь Альцгеймера;

ЛМН – лаборатория молекулярной нейродегенерации;

НБА – наследственная болезнь Альцгеймера;

нДУВК – нейрональный депо-управляемый вход кальция;

Об/мин – оборотов в минуту;

ПСП - постсинаптическая плотность;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СБА – спорадическая болезнь Альцгеймера;

ЭР – эндоплазматический ретикулум.



## ВВЕДЕНИЕ

Кальций – один из важнейших вторичных мессенджеров клетки. Он регулирует многие процессы, протекающие в нейронах, например, пролиферацию, экспрессию генов, синтез АТФ, клеточную смерть, формирование памяти, ее потерю и другие [1]. Уровень кальция в цитоплазме крайне мал и составляет от 0,1 до 0,2 мкМ, что в сотни раз меньше, чем внеклеточная концентрация кальция (1,8 мМ) [2], то есть даже малейшие изменения в кальциевом гомеостазе могут привести к необратимым последствиям.

Одним из путей регуляции внутриклеточного уровня кальция является нейрональный депо-управляемый вход кальция (нДУВК). Данный механизм не до конца изучен, однако, имеются данные, что он включает в себя комплекс белков семейства STIM с TRP каналами и/или Orai белки [1]. Имеются исследования, показывающие, что изменения в работе нДУВК сопровождают, а возможно и являются причиной, различных нейродегенеративных заболеваний.

Болезнь Альцгеймера (БА) – одна из самых распространённых деменций в мире. Основным фактором риска возникновения БА является пожилой возраст, а в виду того, что в последние годы из-за улучшения качества жизни и успехов в медицине возросла средняя продолжительность жизни, количество людей находящихся в группе риска также увеличилось. И хотя о БА известно уже более 100 лет, человечество до сих пор не знает точных причин появления этой болезни.

Кальциевая гипотеза, рассматриваемая в Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации, предполагает, что основной причиной появления БА является изменение в регуляции внутриклеточного кальция. Теория была предложена в 1987 году [3], и с каждым годом публикуется все большее количество данных, согласующихся с ней.

Существует два типа данной деменции: спорадическая БА

(ненаследственная, СБА) и наследственная (НБА) Последняя связана с различного вида мутациями в генах, кодирующих белки PS1 и PS2 (пресенилины) и гене, кодирующем белок APP (амилоидный белок-предшественник).

В лаборатории И.Б. Безprozванного было показано, что пресенилины в норме выполняют функцию пассивных каналов утечки  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Мутация PSEN1dE9 (делеция 9 экзона в гене, кодирующем белок пресенилин-1) усиливает данную функцию [4]. И мы предполагаем, что нДУВК должен активироваться при болезнях с данным типом мутации.

Целью работы являлось исследование роли PSEN1dE9 мутации на активность нДУВК.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) изучение влияния мутации PSEN1dE9 на стабильность шипиков в нейронах гиппокампа;
- 2) изучение роли мутации PSEN1dE9 на ДУВК в линейных клетках линии HEK293T;
- 3) изучение роли мутации PSEN1dE9 на нДУВК в нейронах гиппокампа.

# 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

## 1.1 Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – это возрастное нейродегенеративное заболевание, основная причина деменций у пожилых людей в мире, на которое приходится 60-80% всех случаев слабоумия [5]. Женщины заболевают чаще вследствие увеличенной, относительно мужчин, продолжительности жизни. Заболеваемость и распространенность БА резко возрастают с возрастом и растут экспоненциально после 65 лет. В 2015 году число людей с данной деменцией насчитывало 46,8 миллионов, прогноз к 2050 году – 131,5 миллионов человек [6]. Помимо прочего БА является большой экономической проблемой, так как мировые расходы на деменции в 2015 году составили 818 миллионов долларов, порог в 1 триллион долларов будет достигнут уже в 2018 году, а к 2030 году общие расходы пересекут границу в 2 триллиона долларов [7].

На ранних стадиях симптомы могут влиять на наиболее сложные виды деятельности, появляется апатия, наиболее заметна трудность в запоминании и воспроизведении новых фактов. С развитием болезни появляются проблемы с письменным и устным языком, эпизодической памятью, сложности с выполнением моторных действий, таких как писание, рисование и одевание. На поздних стадиях словарный запас снижается до самых простых слов, уменьшается мышечная масса и подвижность, в конце концов, пациенты с БА теряют возможность кормить себя. После появления первых симптомов, пациенты живут в среднем 7-10 лет, смерть наступает от сторонних причин, например, бронхита или пневмонии [8].

Основным фактором риска является пожилой возраст. Следующим фактором после возраста является наличие аллели аполипротеина E ε4 (ApoE ε4). Другими вероятными рисками считаются сердечно-сосудистые заболевания, травмы головы, низкий уровень образования, курение, родственники первой степени с синдромом Дауна, низкий уровень витамина

В12 и др [8].

Имеются две ненормальные структуры, называемые амилоидными бляшками и нейрофибриллярными клубками, которые предположительно являются причиной повреждения и гибели нервных клеток.

Бляшки - это отложения фрагмента белка, называемого бета-амилоидом, которые растут во внеклеточном пространстве нейронов.

Нейрофибриллярные клубки - это скрученные волокна другого белка, называемого тау, которые, в отличие от бляшек, развиваются внутри нейронов [9].

Хотя исследования показывают, что у большинства людей амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки развиваются по мере старения, у людей с болезнью Альцгеймера данные структуры склонны развиваться гораздо быстрее и более предсказуемо, начиная с областей, важных для памяти, до распространения в другие регионы.

Ученые точно не знают, какую роль играют бляшки и клубки в патогенезе болезни Альцгеймера. Большинство экспертов считают, что они каким-то образом играют роль в блокировании связей между нейронами, что приводит к нарушению у клеток жизненно важных процессов [10].

Наследственная форма БА (НБА) встречается довольно редко, на нее приходится 2-3% от всех случаев данной деменции. Отличается от спорадической своим ранним началом, первые симптомы проявляются уже в возрасте 30-40 лет. Исследователи выяснили, что у людей с НБА есть мутация в одном-трех генах: *PSEN1*, *PSEN2* и *APP*, кодирующих соответственно белки пресенилин-1, пресенилин-2 и амилоидный белок-предшественник [11].

## 1.2 Пресенилины и амилоидный белок-предшественник

Молекула APP представляет собой трансмембранный гликопротеид, который протеолитически обрабатывается двумя путями: неамилоидогенным и амилоидогенным. Известны три основных фермента, расщепляющих APP:  $\alpha$ -,  $\beta$ - (BACE), и  $\gamma$ -секретазы.  $\alpha$ -секретаза расщепляет APP внутри A $\beta$ -домена, предотвращая таким образом образование амилоида, генерируя при этом неамилоидные фрагменты и секретированную форму APP ( $\alpha$ -APPs). В амилоидогенном пути BACE расщепляет APP вблизи N-концевого A $\beta$ -домена, в результате образуются растворимая форма APP,  $\beta$ -APP и C-концевой фрагмент (C99), содержащий весь A $\beta$ -домен. Конечной стадией амилоидогенного пути является внутримембранное расщепление  $\gamma$ -секретазой фрагмента C99 с образованием A $\beta$  (Рис.1).

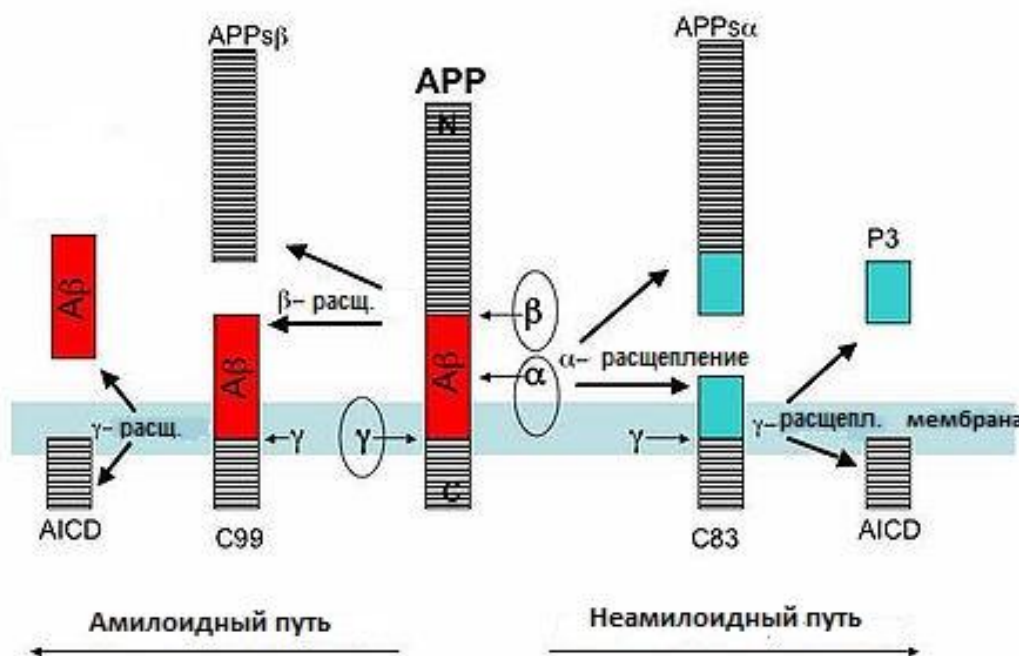


Рис. 1 Два пути расщепления амилоидного белка-предшественника [12]

Биохимическими и генетическими методами были идентифицированы 4

компонента  $\gamma$ -секретазного комплекса – пресенилины, никастрин, *aph-1* (anterior pharynx detective) и *pen-2* (presenelin enhancer 2). Пресенилин-1 и пресенилин-2 образуют каталитическую пору  $\gamma$ -секретазы [13].

Помимо этого в лаборатории И.Б.Безпрозванного было показано, что пресенилины также играют роль пассивных каналов утечки кальция из эндоплазматического ретикулума [4].

Известны 37 мутаций в гене, кодирующем белок APP, способных вызвать БА. Все они приводят к синтезу A $\beta$ 42-бета-амилоида, содержащего 42 аминокислотных остатков, и обладающего большей нейротоксичностью, по сравнению с A $\beta$ 40.

Мутации в *PS*-генах являются основной причиной семейной формы БА. Известно 180 *PSEN1* мутаций и 29 *PSEN2* мутаций. И хотя известные мутации главным образом вызывают аминокислотные замены в различных участках пресенилина, все они приводят к одному главному биохимическому изменению – увеличению соотношения A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Это может быть вызвано либо повышением количества A $\beta$ 42, либо уменьшением A $\beta$ 40, либо комбинацией этих процессов [14].

Для создания моделей НБА с APP мутацией чаще всего используют Swedish (K670M и N671Y мутации), Indiana (V717F мутация), London (V717I мутация), Florida (I716V), Beyreuter/Iberian (I716F мутация) и Arctic (E693G мутация), с PS1 - M146L и L286V, и для PS2 - N141I (Volga German).

### 1.3 Нейрональный кальциевый сигналинг

Кальциевые каналы играют ключевую роль во многих аспектах жизнедеятельности нейрона, так как участвуют и в электрических, и в химических процессах, происходящих в клетке. Передача сигналов кальцием необходима для краткосрочной и долгосрочной синаптической пластичности. В связи с большим количеством процессов, регулируемых данным ионом, клетка имеет несколько способов контроля внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ . Несколько кальциевых каналов вовлечены в  $Ca^{2+}$ -сигнализацию, среди них мембранные потенциал-зависимые VGCC-каналы (voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels), NMDA-рецепторы (N-Methyl-D-aspartate), AMPA-рецепторы ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), TRP каналы (Transient receptor potential) и каналы нейронального депо-управляемого входа кальция (нДУВК). Выход кальция из внутриклеточных депо эндоплазматического ретикулума (ЭР) поддерживается 1,4,5-инозитол-трифосфатными рецепторами (InsP3R) и рианодиновыми рецепторами (RyanR). SERCA (помпа, sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase), PMCA (помпа, plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump) и  $Na^+/Ca^{2+}$  -обменник в плазматической мембране тонко регулируют цитозольный уровень кальция в узком диапазоне.

Нейроны чрезвычайно чувствительны к изменениям внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и используют ряд кальциевых сенсоров, включающих белки, участвующих в слияние синаптических везикул (например, синаптотагмин),  $Ca^{2+}$ -зависимые киназы и фосфатазы (например,  $Ca^{2+}/CaM$ -киназы [CaMK] и  $Ca^{2+}$ -зависимый фосфатазный кальциейрин [CaN]),  $Ca^{2+}$ -зависимые сигнальные ферменты (такие как  $Ca^{2+}$ -зависимые аденилатциклазы и  $Ca^{2+}$ -зависимая синтетаза оксида азота [nNOS]) и др. Разнообразие кальциевых сенсоров обеспечивают возможность  $Ca^{2+}$ -регуляции во временном промежутке от нескольких микросекунд (в случае с белками, участвующими в слияние синаптических везикул), до секунд и минут (в случае  $Ca^{2+}$ -зависимого фосфорилирования и дефосфорилирования) и до дней и лет (в

случае с  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми изменениями в экспрессии генов нейронов). Эти кальций-зависимые процессы приводят к краткосрочным и долгосрочным изменениям в нейрональной возбудимости (путем воздействия на активность ионных каналов и их экспрессию) и синаптической передаче (путем модификации синаптических контактов). Из-за крайней чувствительности нейронов к разнообразию кальциевых сигналов, даже относительно небольшие дефекты и аномалии в сигнальном пути  $\text{Ca}^{2+}$  могут привести к разрушительным последствиям [15].



## 1.4 Кальциевая гипотеза развития БА

Основной гипотезой возникновения БА является «амилоидная», предполагающая, что основным фактором является накопление амилоидных бляшек, основным компонентом которых является А $\beta$ , о котором было сказано выше. Однако клинические испытания терапии, основанной на данной гипотезе, не увенчались успехом.

В Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации рассматривается альтернативная «кальциевая» гипотеза. Данная теория предполагает, что устойчивые изменения во внутриклеточном кальциевом гомеостазе приводят к возрастным изменениям в мозге, а также к ряду нейродегенеративных заболеваний, к БА в том числе.

Амилоидные олигомеры стимулируют InsP3R-опосредованный кальциевый выход из ЭР путем активации синаптических MGluR5-рецепторов и стимулируя опосредованное G-белком продуцирование InsP3.

Как было сказано выше, пресенилины функционируют как каналы утечки Ca<sup>2+</sup> из ЭР, и связанные с НБА мутации *PSEN* нарушают эту функцию, вызывая перегрузку ЭР кальцием. Подобная перегрузка происходит в результате процесса нейронального старения. Первым физиологическим ответом на повышенное содержание кальция в ЭР является компенсирующее увеличение экспрессии и/или активности инозитол-трифосфатных рецепторов (InsP3R) и рианодиновых рецепторов (RyanRs).

Второй ответ на перегрузку ЭР кальцием - это сокращение нДУВК, пути, задействованного в заправке кальциевых депо (опосредованно через Orai и TRP каналы). Компенсирующие и защитные механизмы передачи сигналов посредством кальция становятся патогенными при старении нейронов и в конечном итоге приводят к синаптической дисфункции, синаптической потере и нейродегенерации (рис. 2) [1].

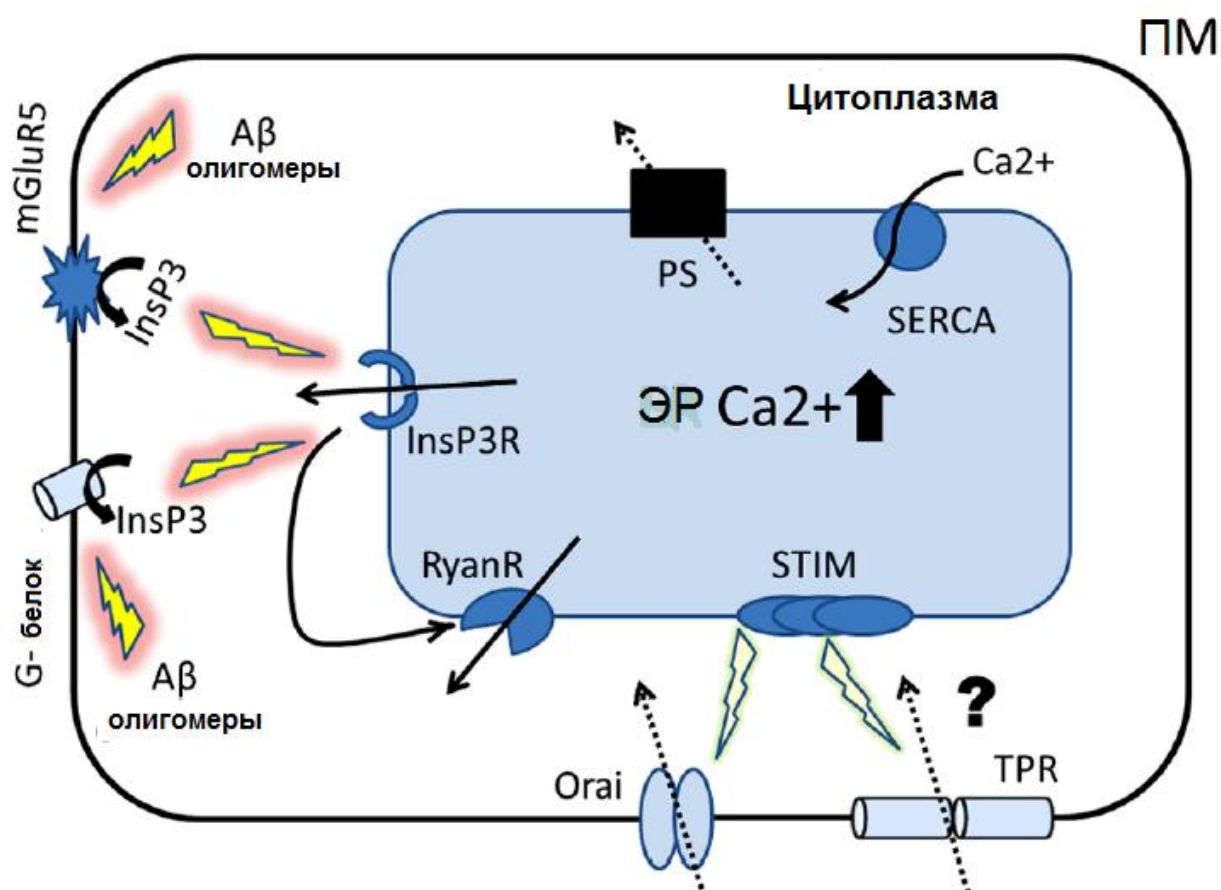


Рис. 2 – Роль кальция в патогенезе БА [1]

Как же работает нДУВК? Основными кальциевыми сенсорами данного пути являются белки семейства STIM – STIM1 и STIM2. Когда происходит опустошение кальциевых депо белки данного семейства активируют вход Ca<sup>2+</sup> через каналы цитоплазматической мембраны (так называемые депо-управляемые каналы), к которым относятся белки семейств Orai и TRP [16]. STIM1 способен быстро активировать ДУВК, а STIM2 опосредует поддержание долговременного входа кальция, необходимого для осуществления основных физиологических процессов в клетке. В гиппокампальных нейронах характерно преобладание количества белка STIM2 над STIM1.

В нашей лаборатории было показано, что активация входа кальция происходит благодаря созданию комплекса STIM2-Orai2-TRPC6, в котором белок STIM2 находится в олигомеризованной форме [17].

## 1.5 Модели НБА с мутацией PSEN1dE9

В нашей работе рассматривается мутация PSEN1dE9, вызывающая экспрессию пресенилина-1 с делетированным 9 экзоном. Данная мутация вызывает усиление функции пресенилинов как пассивных каналов утечки  $Ca^{2+}$  из ЭР. В качестве мышинной модели НБА с данной мутацией используется линия APPSEN1dE9. Данная модель интересна тем, что помимо пресенилиновой, она также имитирует амилоидную токсичность.

Трансгенные мыши линии APPSEN1dE9 экспрессируют химерный мышинный/человеческий амилоидный белок-предшественник (Mo/HuAPP695swe) и мутантный человеческий пресенилин-1 (PS1-dE9). Обе мутации связаны с ранним началом БА. «Очеловеченный» трансген Mo/HuAPP695swe позволяет мышам экспрессировать человеческий амилоид. Включенные Swedish-мутации (K595N/M596L) увеличивают количество Аβ за счет предпочтения обработки APP через β-секретазный путь. Трансгенный белок PS1 человека, экспрессируемый на высоком уровне, вытесняет эндогенный белок мыши [18].

В качестве клеточной модели рассматриваются первичные гиппокампальные культуры, трансфицированные плазмидой, несущей ген, кодирующий мутантный человеческий пресенилин-1.

Существуют данные, что нарушения морфологии определенного типа дендритных шипиков связаны с нарушениями памяти, возникающими при БА. Дендритные шипики – это специализированные выросты на дендритах, способные образовывать синаптические контакты. Морфологически они разделяются на три типа: тонкие, пеньковые и грибовидные (рис.3). Так как грибовидный шипик имеет большую головку, он отличается высокой постсинаптической плотностью (ПСП). ПСП – это особая цитоскелетная структура, представляющая собой комплекс различных белков, которые могут динамически изменять свою структуру в зависимости от активности синапса. Основным белком ПСП является PSD95. Имеются данные, что



Рис. 3 Морфология дендритных шипиков [19]

плотность NMDA и AMPA рецепторов в ПСП постоянно, откуда следует, что число рецепторов пропорционально объему шипика [20]. Возможность дендритного шипика изменять свой объем в зависимости от активности лежит в основе синаптической пластичности. Считается, что данный процесс лежит в основе обучения и памяти, а грибовидные шипики, как самая устойчивая форма, предположительно могут играть роль «шипиков памяти». И изменения соотношения грибовидных шипиков к общему числу шипиков связано с нейродегенеративными процессами [21].

Данные о влиянии кальция на устойчивость грибовидных шипиков были получены в лаборатории проф. И.Б. Безprozванного. В исследовании использовались нокиновые мыши линии PS1-M146V-KI, экспрессирующие мутантный PS1. У данных мышей происходило снижение ПСП в нейронах, а также снижалась плотность дендритных шипиков. На этой же модели было показано снижение нДУВК и STIM2 (белка, участвующего в нДУВК и являющегося кальциевым сенсором). При этом гиперэкспрессия данного белка восстанавливала нДУВК, и, не влияя на морфологию шипиков в контрольной группе, увеличивала количество грибовидных шипиков [22]. Таким образом, можно сделать вывод, что при данной форме БА, вход кальция посредством нДУВК необходим для стабилизации синаптических контактов.

Такую схему (рис. 4) мы можем наблюдать в большинстве случаев БА-ассоциированных мутаций, например M146V.



Рис. 4 Нарушение памяти при БА при многих БА-ассоциированных мутациях вызваны повышением уровня кальция в ЭР

Однако мутация PSEN1dE9, усиливая функцию пресенилинов как каналов утечки кальция из ЭР, опустошают его, следовательно, в качестве компенсаторного эффекта, нДУВК должен увеличиться, из-за чего концентрация внутриклеточного кальция увеличится, и приведет к дестабилизации синаптических каналов, а значит и к потере грибовидных шипиков. В конечном итоге, повышенная концентрация кальция в цитозоле приведет к нарушениям в работе всей клетки и смерти нейронов гиппокампа и кортекса (рис. 5). То есть на нДУВК будет оказываться противоположный эффект, однако общее влияние на нейроны будет схожим. Почему же так важно изучить данную мутацию? Разрабатываемые в настоящее время лекарственные средства против БА, основанные на стабилизации нДУВК, направлены на его увеличение. Однако если наше предположение подтвердится, такая терапия, в случае больных с PSEN1dE9 мутацией, вызовет только ухудшение ситуации и более быстрое развитие БА. В их

случае будет требоваться снижение нДУВК, которого можно добиться, используя ингибиторы нДУВК.



Рис. 5 Предполагаемая схема влияния PSEN1dE9 на нарушение памяти при БА

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Животные**

В работе для приготовления первичной гиппокампальной культуры использовались мыши линий C57BL/6J (The Jackson Laboratory, США) и линейные мыши (Рапполово, Россия). Животные содержались с 12-ти часовым световым циклом в виварии Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации Санкт-Петербургского Политехнического Университета Петра Великого.

### **2.2 Приготовление и ведение первичной гиппокампальной культуры.**

Культуру рассаживали на 12 мм стекла, предварительно промытые последовательно ацетоном, 100% этанолом и 70% этанолом, каждый этап отмывки выполнялся в течение 30 мин. Сухие стекла раскладывались по 24-луночным планшетам, покрывались 1% раствором поли-D-лизина (poly-D-lysine - PDL, Sigma, #SLBK4086V) и инкубировались 30 мин при 37°C. Непосредственно перед использованием стекла внутри планшета промывались автоклавированной бидистиллированной водой и сушились под ультрафиолетом в боксе.

Для получения нейронов гиппокампа использовались папсы 1-2 дней от роду. В зависимости от возраста использовалось от 5 до 7 папсов на 24 лунки. Все инструменты перед использованием промывались и стерилизовались 70% этанолом.

#### **2.2.1 Выделение культуры.**

Новорожденного мышонка обездвигивали на льду, стерилизовали 70% этанолом, гиппокамп вырезали в буфере для вскрытия (Dissection Buffer – DB [на 1 литр: 800 мл бидистиллированной воды, 10 мл 10x CMF-HBSS (Ca, Mg free Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, #1255093), 3,9 г HEPES (Sigma, #SLBB1143V), 0,84 г NaHCO<sub>3</sub>, 10 мл 100x пенициллин/стрептомицин

(penicilin/streptomycin – PenStep, Gibco, #1780183)). Вырезанные гиппокампы держались на льду в DB. Далее измельчались на небольшие кусочки, переносились в 15 мл пробирку (TPP, США) и центрифугировались 3 мин при 800 об/мин, осадок заливался 5 мл папаина (фермент, используемый для гидролиза белков, Papain, Worthington, #55N16165) и ставился в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 30 мин. После инкубации папаин дважды блокировался 5% Trituration Buffer (TB [5% DNase I (Thermo Scientific, #00266209) в DB]) в растворе Completed Medium (среда для клеток, на 50 мл: 48,5 мл Neurobasal [Gibco, #1782575], 500 мкл FBS [Fetal Bovine Serum, Gibco, #08G1360K], 125 мкл 200мМ L-глутамин [Gibco, #1508669], 1 мл 50x B27 [Gibco, #1768533]), ресуспензировался и откручивался 3 минуты 2000 об/мин. Промывался Completed Medium, ресуспензировался и откручивался 3 минуты при 2000 об/мин. Надосадочная жидкость удалялась, объем в пробирке доводился до требуемого из расчета 80 мкл на лунку, ресуспензировался и наносился по 80 мкл на стекло по спирали. Закрывался крышкой, инкубировался на 7 минут. Далее в каждую лунку добавлялось по 1 мл Completed Medium и убирался в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

### **2.2.2 Поддержание культуры.**

На 7 дней культивирования проводилась трансфекция, на 14 день в каждую лунку добавлялось по 0,5 мл свежей среды. Культура фиксировалась на 15 день 5% раствором параформальдегида (paraformaldehyde – PFA, Sigma-Aldrich, #SLBC3029V).

## **2.2 Ведение культуры клеток линии НЕК283Т**

### **2.3.1 Размораживание клеток.**

Аликвоты по 1 мл хранятся на -80°C. Аликвоты доставались из морозильной камеры и помещались в теплую воду (37°C). После оттаивания клетки переносились в пробирку с 5 мл среды (DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, #1791391], 10% FBS, 1x PenStep, 1x Sodium Pyruvate [Gibco, #1272138], 1x MEM NEAA [Minimum Essential Medium Non-Essential



Amino Acids, Gibco, #13111311]), ресуспензировались и центрифугировались 3 мин при 800 об/мин. Супернатант сливался, осадок ресуспензировался в 5 мл среды, клетки рассаживались на флакон площадью 25 см<sup>2</sup> и ставились в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Пересаживались клетки каждые 5 дней.

### **2.3.2 Ведение культуры.**

Из CO<sub>2</sub>-инкубатора вынимался флакон с клеткам, старая среда сливалась, культура отмывалась чистым раствором DMEM, клетки снимались с поверхности флакона 0,05% раствором трипсина (Gibco, #1801701) в DMEM, ставились на 5 мин в инкубатор. Далее культура отмывалась от трипсина средой, собиралась в пробирку и откручивалась 3 мин при 800 об/мин. Надосадочная жидкость сливалась, осадок ресуспензировался в 3 мл среды и переносился из пробирки 250 мкл в новый флакон с 5 мл среды. Культура хранилась в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>.

### **2.4 Кальций-фосфатная трансфекция**

Трансфекция проводилась на 7-дневной культуре.

Предварительно готовились среды: «Serum Free» (14,58 мл Neurobasal, 37,5 мл 400x L-глутамин), «Свежая» (14,58 мл Neurobasal, 150 мкл FBS, 37,5 мл 400x L-глутамин, 300 мкл 50x B27), «For CO<sub>2</sub>» (14,58 мл Neurobasal, 37,5 мл 400x L-глутамин) и нагревались до температуры 37°C.

Старая среда из планшета собиралась в отдельную пробирку. Добавляли в каждую лунку по 0,5 мл «Serum Free» и убирали планшет в инкубатор.

Далее готовили растворы А и Б для трансфекции (табл. 1).

**Состав раствора А**

Раствор А	на лунку
ДНК	1 мкл
2М CaCl <sub>2</sub>	3 мкл
H <sub>2</sub> O	21 мкл
Σ	25 мкл

Раствор Б: 25 мкл 2xHBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, #1255093) на лунку

Добавляли по капле раствор А в раствор Б по ¼ от объема за раз, после каждого добавления мешали на вортексе на низкой скорости. Инкубировали при комнатной температуре 5 мин.

После окончания инкубации смесь растворов А и Б добавлялась в культуру по 25 мкл на лунку. Культура инкубировалась 1 час при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

По истечении времени под микроскопом в нейронах должны наблюдаться небольшие точки, это означает, что ДНК попала в клетку.

Среда «Fog CO<sub>2</sub>» закислялась до желтого цвета и фильтровалась через фильтр с диаметром 0,22 мкм.

После трансфекции среда отбиралась и добавлялась закисленная среда по 0,5 мл, для разрушения кальциевых комплексов. Инкубировалась 5 мин при 37°C. По истечении времени инкубации закисленная среда собиралась, и добавлялось по 0,5 мл свежей и 0,5 мл старой среды.

**2.5 Кальциевый имиджинг.**

Данный метод позволяет фиксировать изменения уровня внутриклеточного кальция. Существуют химические и генетические индикаторы кальция, в нашей работе мы использовали генетический кодируемый индикатор кальция – Gcamp5.3. GCaMP состоит из зеленого

флуоресцирующего белка GFP, который с одной стороны фланкирован кальций-связывающим белком кальмодулином, а с другой кальмодулин-связывающим пептидом M13. В присутствии кальция кальмодулин-M13 взаимодействие вызывает конформационные изменения флуорофора, которые приводят к увеличению квантового выхода (рис. 6).

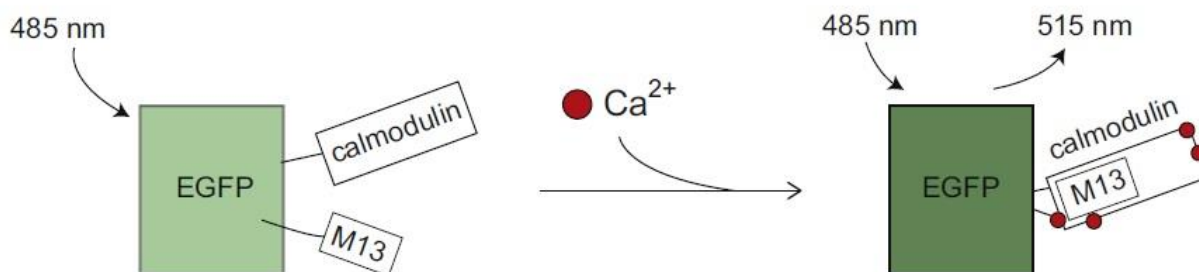


Рис.6 Генетически модифицированный кальциевый индикатор с флуорофором. После связывания с кальцием происходят конформационные изменения GCaMP и приводят к увеличению квантового выхода флуоресценции с длиной волны 515 нм [23]

Для экспрессии данного кальциевого индикатора методом трансфекции в клетки вводилась плазида, несущая ген, кодирующий GCaMP5.3. Фиксирование сигнала от флуорофора проводилось при помощи конфокального микроскопа.

Для проведения кальциевого имиджинга готовились следующие растворы:

1x ACSF (Artificial cerebrospinal fluid): 140 mM NaCl, 5mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES;

Раствор «0Ca»: 1x ACSF , 100 мкМ EGTA;

Раствор «2Ca»: 1x ACSF, 2mM CaCl<sub>2</sub>;

Раствор «10Ca»: 2M CaCl<sub>2</sub>.

### **2.5.1 Кальциевый имиджинг клеток линии НЕК293Т**

Клетки предварительно инкубировались в течение 15 мин в растворе «0Са» в присутствии тапсигаргина-специфичного блокатора кальциевых АТФ-аз мембраны эндоплазматического ретикулула.

Стекло помещалось под объектив в раствор «0Са» с постоянной перфузией для соблюдения физиологических условий. В течение 2 мин промывалось раствором «0Са», в конце 2-ой минуты начиналась запись сигнала, далее перфузировалось раствором «2Са». После окончания фиксирования ответа от клеток все приборы промывались от раствора «2Са» раствором «0Са».

### **2.5.2 Кальциевый имиджинг нейронов гиппокампа**

Клетки предварительно инкубировались в течение 30 мин в растворе «0Са» в присутствии тапсигаргина-специфичного блокатора кальциевых АТФ-аз мембраны эндоплазматического ретикулула.

Стекло помещалось под объектив в раствор «0Са» с постоянной перфузией для соблюдения физиологических условий. В течение 2 мин промывалось раствором «0Са», в конце 2-ой минуты начиналась запись сигнала, далее перфузировалось раствором «2Са» (с добавлением блокаторов каналов, не участвующих в нДУВК: D-Ар5 [1 мкМ, блокатор NMDAR, Tocris, Cat.No. 0106], Nifedipine [50 мкМ, блокатор L-VGCC каналов, Tocris Cat.No. 1075], CNQX [10 мкМ, блокатор AMPAR, Tocris, Cat.No. 0190], Tetrodotoxin [1 мкМ, ТТХ, ингибитор спонтанного возбуждения, Tocris, Cat.No. 1078], Thapsigargin [1мкМ, тапсигаргин, Tocris, Cat.No. 1138], и через 2 минуты вносилось 5 мкл раствора «10Са» под объектив. После окончания фиксирования ответа от клеток все приборы промывались от раствора «2Са» раствором «0Са».

### **2.5.3 Анализ данных, полученных методом кальциевого имиджинга**

Для анализа изменения флуоресценции использовалась система

фиксирования микроскопических изображений, которая включает в себя конфокальный микроскоп ThorLabs (USA), цифровую камеру и программное обеспечение ThorImageLS1.4. Съемка производилась с использованием 60-кратного объектива (LUMPlanFLN, 60x/1,00W, OLYMPUS, Япония) с разрешением 0,234 мкм/pixel и временным интервалом 2 с.

Полученные данные в формате TIFF на первом этапе обрабатывались при помощи программного обеспечения ImageJ, которая фиксирует изменение интенсивности флуоресценции на заданной площади и переводит их в числовой вид. Полученные данные обрабатывались при помощи программы Excel из пакета MS Office.

## **2.6 Анализ морфологии дендритных шипиков в нейронах гиппокампа.**

После фиксирования производилась съемка препаратов на конфокальном микроскопе (Thorlabs, США) при 100-кратном увеличении (UPlanSApo 100x/1,40 Oil, OLYMPUS, Япония) с разрешением 0,117 мкм/pixel с использованием цифровой камеры и программного обеспечения ThorImageLS1.4. Анализ проводился на вторичных апикальных дендритах. Далее полученная серия снимков (21 снимок с шагом по Z-оси в 0,2 мкм, размер изображения 1024x1024 пикселя) переводилась в единый файл TIFF-формата программой ImageJ. Последующий анализ проводился в программе NeuronStudio (NIH, США), которая способна разделять зафиксированные дендритные шипики на тонкие, пеньковые и грибовидные. Для данных 3 групп завались следующие параметры: соотношение сторон для тонкого шипика = 2,5, отношение размеров головки шипика к шейке = 1,3, диаметр головки грибовидного шипика = 0,25 мкм. Для каждого нейрона измерялось процентное содержание шипиков разного типа (количество шипиков данного типа, деленное на общее количество шипов).

## **2.7 Статистический анализ**

Данные анализировались в программном обеспечении Excel из пакета

Microsoft Office. Все результаты представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение от среднего. Оценка значимости различий средних величин проводилась при помощи двухвыборочного критерия Стьюдента. Уровень статистической значимости (p) указан в пояснениях к графикам.

## **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

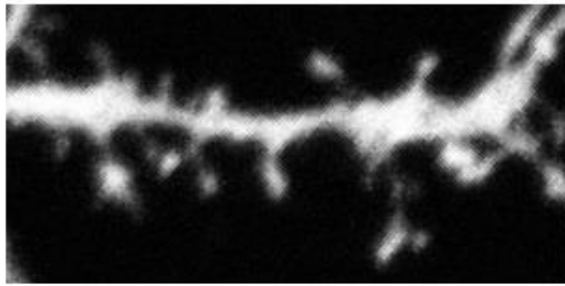
### **3.1 Результаты**

#### **3.1.1 PSEN1dE9 мутация приводит к снижению количества грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа**

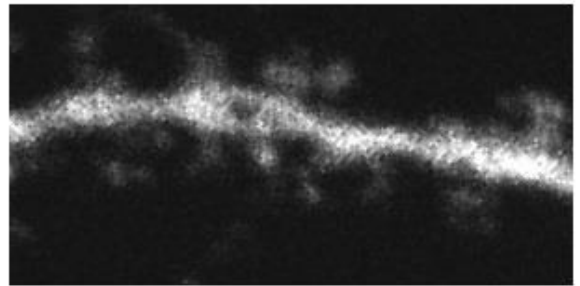
Для того чтобы удостовериться в том, что PSEN1dE9 обладает нейротоксическим действием, мы исследовали ее влияние на морфологию дендритных шипиков. Самой стабильной формой шипиков являются грибовидные, которые так же называют «шипиками памяти» [24]. Их потеря по отношению к общему числу дендритных шипиков свидетельствует о нейродегенеративных процессах.

В качестве клеточной модели БА мы использовали первичную гиппокампальную культуру, полученную из новорожденных мышат (P0-P1) дикого типа, в которой путем кальций-фосфатной трансфекции с плазмидой, кодирующей мутантный пресенилин-1 (PSEN1dE9) была достигнута его гиперэкспрессия. В качестве контроля использовалась культура, трансфецированная плазмидой, кодирующей красный флуоресцентный белок tdTomato. Трансфекция проводилась на 7 день после посадки культуры, на 14 день обновляли среду, и на 15 день культура фиксировалась раствором параформальдегида. Фиксированные препараты визуализировались при помощи конфокального микроскопа. На основе соотношения длины шейки к объему головки дендритные шипики разделялись на три морфологические группы: тонкие – с длинной шейкой и маленькой головкой, пеньковые – со слабо различимой шейкой, переходящей в большую головку и грибовидные – с длинной шейкой и большой головкой. Было обнаружено, что в нейронах, экспрессирующих мутантный PS1, значительно падает фракция грибовидных шипиков (рис. 7). Таким образом, было показано, что данная мутация обладает нейротоксическим действием.

А



контроль



PSEN1dE9

Б

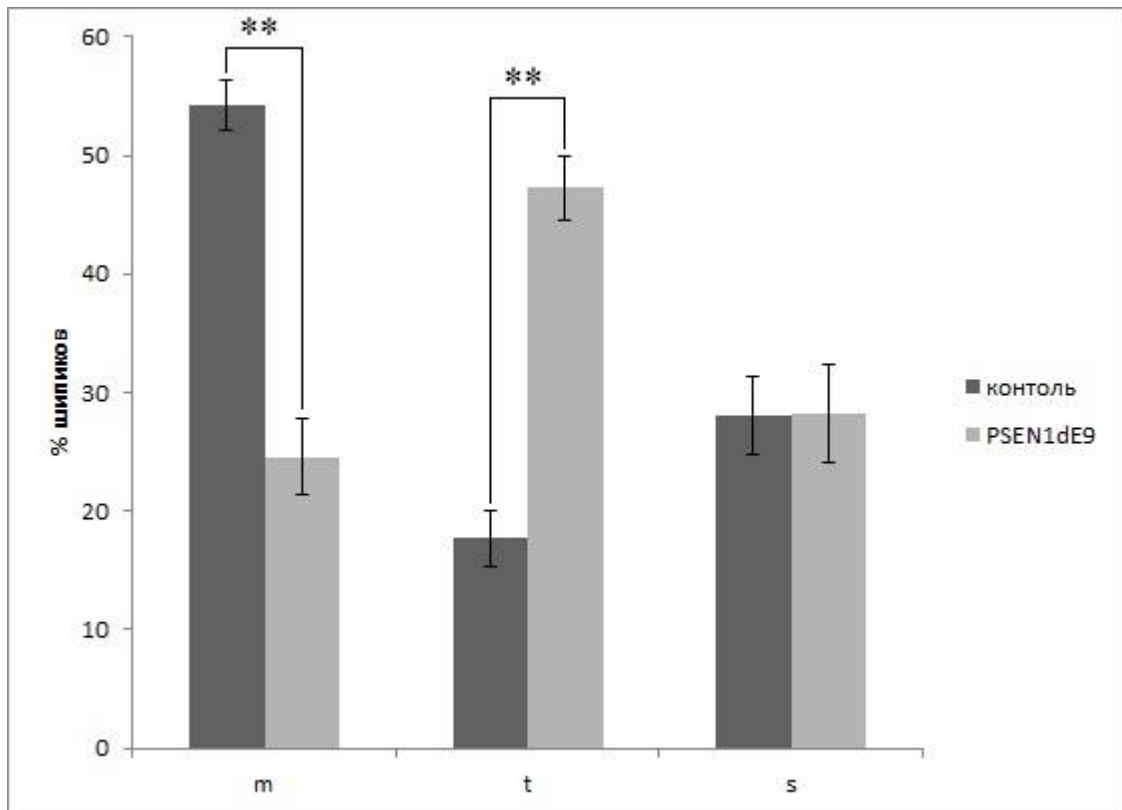


Рис.7 Мутация PSEN1dE9 вызывает потерю грибовидных и увеличение количества тонких шипиков в первичной гиппокампальной культуре. А – визуализация дендритных шипиков при помощи конфокальной микроскопии, Б – процентное соотношение разных типов шипиков в нейронах гиппокампа.

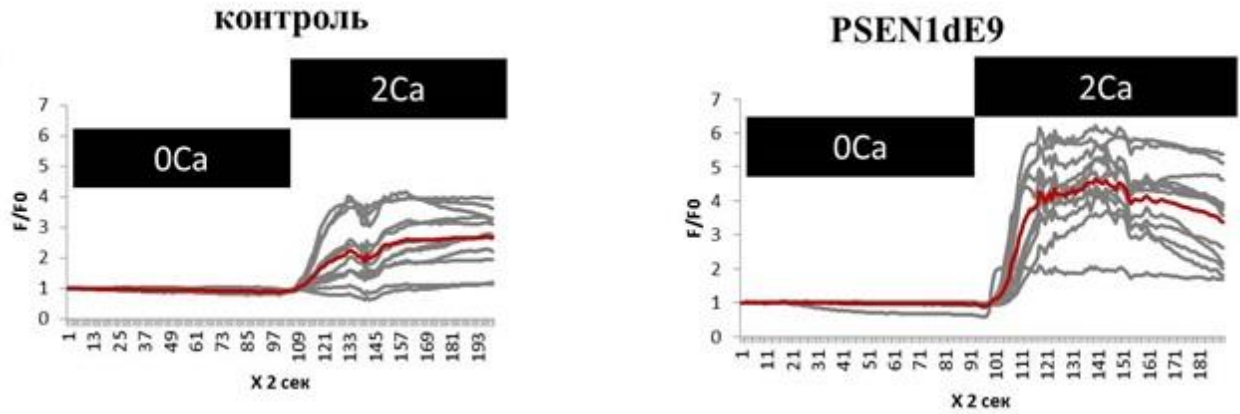
m – грибовидные, t – тонкие, s – пеньковые. \*\* -  $p < 0,005$ .



### **3.1.2 Экспрессия пресенилина-1 с делетированным 9 экзоном вызывает повышение депо-управляемого входа кальция в клетках линии НЕК293Т**

Делеция 9 экзона в гене, кодирующем белок пресенилин-1 приводит к повышению его функции пассивного канала утечки кальция из ЭР. Чтобы понять, как это влияет на ДУВК, мы рассмотрели культуры клеток линии НЕК293Т, которые были трансфицированы либо плазмидой GCaMP5.3 (контроль), либо ко-трансфицированы плазмидами GCaMP5.3 и PSEN1dE9 (PSEN1dE9). После рассадки, на 3 день производилась трансфекция, на 4 день сменялась среда, и на 5 день проводился кальциевый имиджинг. Перед процедурой клетки выдерживались в течение 5 мин в растворе тапсигаргина, для блокирования неспецифических кальциевых каналов, что позволяло нам анализировать работу именно ДУВК. Далее стекло переносилось под объектив в раствор, не содержащий кальция. Начиная запись, в течение 2-3 минут стекло перфузировалось тем же раствором, после чего начинали подавать раствор с 2М содержанием кальция (рисунок 8А). Полученные данные показали, что наличие PSEN1dE9 приводит к значительному увеличению ДУВК (рисунок 8Б).

А



Б

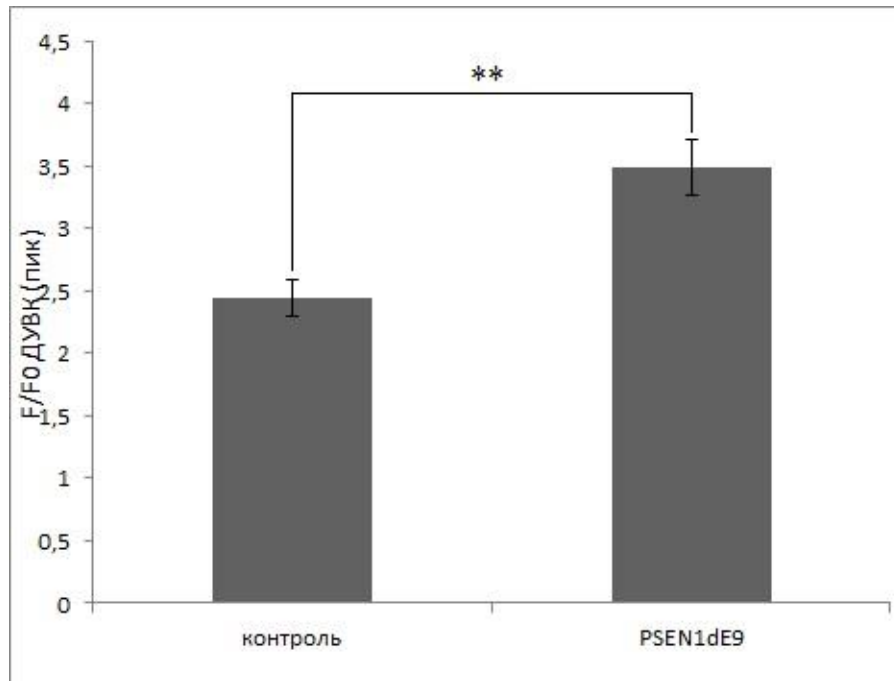
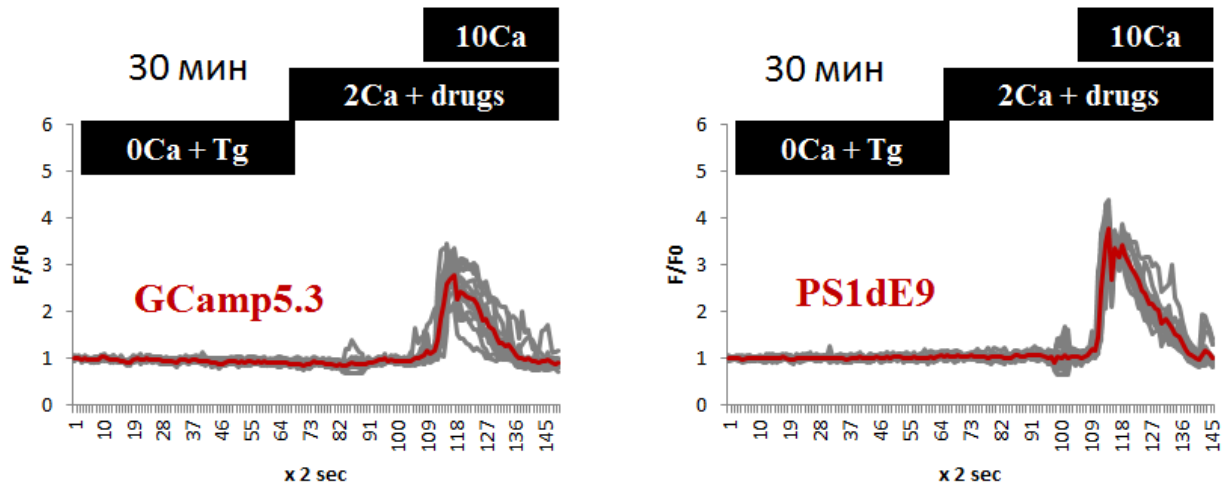


Рис. 8 Депо-управляемый вход кальция в клетках линии НЕК293Т, экспрессирующих GCaMP5.3 (контроль) либо GCaMP5.3 + PSEN1dE9 (PSEN1dE9). А – Интенсивность флуоресценция клеток в ответ на вход кальция в клетках линии НЕК293Т, результат представлен в виде отношения интенсивности флуоресценции клетки к интенсивности свечения фона. Б – средние значения пиков. Значения представлены как среднее ± стандартная ошибка от среднего. \*\* -  $p < 0,005$ .

### **3.1.3 Наличие PSEN1dE9 мутации приводит к увеличению нДУБК в нейронах гиппокампа**

Мы предположили, что увеличение функции пресенилинов как каналов утечки кальция из ЭР, приводит к увеличению ДУБК, что мы и доказали на линейных клетках линии НЕК293Т. Так же мы показали, что PSEN1dE9 мутация обладает нейротоксическим действием. Связан ли данный эффект с увеличением нДУБК в нейронах? Для того чтобы ответить на данный вопрос, мы рассмотрели нДУБК в первичных гиппокампальных культурах. В качестве контроля использовались культуры, трансфецированные плазмидой GCaMP5.3, в качестве модели БА с мутированным PS1 – культуры, ко-трансфецированные плазмидами PSEN1dE9 и GCaMP5.3. Трансфекция проводилась на 7 день после посадки культуры, на 15 день проводился кальциевый имиджинг, культура предварительно инкубировалась в растворе тапсигаргина в течение 30 мин. После инкубации стекло переносилось под объектив и перфузировалось раствором с нулевым содержанием кальция около 2 минут, далее подавался раствор, содержащий 2М кальций и смесь ингибиторов неспецифических каналов, примерно через 1,5-2 минуты непосредственно на стекло вносился раствор с 10М содержанием кальция. Анализ показал, что наличие PSEN1dE9 мутации приводит к значительному увеличению нДУБК в нейронах гиппокампа (рис.9).

А



Б

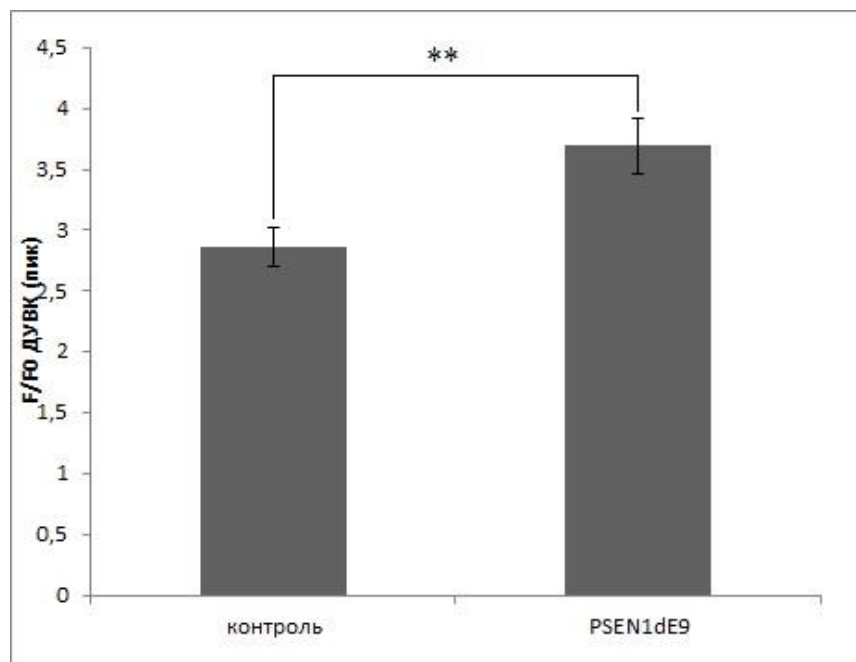


Рис. 9 Депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа, экспрессирующих GCamp5.3 (контроль) либо GCamp5.3 + PSEN1dE9 (PSEN1dE9). А – Интенсивность флуоресценция клеток в ответ на вход кальция в клетках нейронов гиппокампа, результат представлен в виде отношения интенсивности флуоресценции клетки к интенсивности свечения фона. Б – средние значения пиков. Значения представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка от среднего. \*\* -  $p < 0,005$ .

## 3.2 Обсуждение результатов

Нейрональный депо-управляемый вход кальция – один из важнейших стабилизаторов синаптических контактов, нарушения в котором наблюдаются при нейродегенеративных заболеваниях. Рассмотренные ранее мутации, ассоциированные с БА, приводили к переполнению кальциевых депо, вследствие чего снижался нДУВК, и что в свою очередь дестабилизировало синаптические контакты. В нашей работе мы рассматривали мутацию PSEN1dE9, которая в отличие от ранее исследованных мутаций из-за усиления функция пресенилинов как каналов пассивной утечки кальция приводит к увеличенному выходу кальция из ЭР. Основным предположением, которое проверялось в данной работе, являлось то, что данная мутация приводит к увеличению нДУВК, и что такое изменение дестабилизирует синаптические контакты.

Первым шагом в проверке нашей гипотезы стало доказательство того, что данная мутация вообще дестабилизирует синаптические контакты. Исследования проводились на клеточной модели, в которой нейроны, экспрессирующие мутантный персенелин-1 и флуоресцентный белок Tomato сравнивались с контрольной группой, экспрессирующей только белок tdTomato. Анализ показал достоверное снижение фракции грибовидных шипиков по отношению к общему числу дендритных шипиков (рис. 7). Снижение данного соотношения является показателем того, что данная мутация действительно обладает нейротоксическим действием.

Вторым шагом стало рассмотрение влияния исследуемой мутации на ДУВК в более простой, чем нейрональная культура, модели, в линейных клетках линии HEK293T. В качестве модели БА анализировались клетки экспрессирующие мутантный PS1 и кальциевый сенсор GCaMP5.3, а в качестве контрольной группы, рассматривались клетки, экспрессирующие GCaMP5.3. Кальциевый имиджинг показал, что наличие PSEN1dE9 мутации приводит к статистически значимому повышению ДУВК в клетках,

экспрессирующих мутантный пресенилин-1 (рис. 8). Таким образом, мы показали, что увеличение функции пресенилинов как пассивных каналов утечки кальция действительно приводит к увеличению ДУВК.

Последним этапом нашего исследования стало рассмотрение нДУВК в первичной гиппокампальной культуре. Эксперимент строился аналогично эксперименту с клетками линии НЕК293Т, с изменением времени инкубации в растворе тапсигаргина с нулевым содержанием кальция и составом раствора «2Са», в который были добавлены ингибиторы кальциевых каналов, не участвующих в нДУВК. Эксперимент показал, что по сравнению с контрольной группой, в нейронах, экспрессирующих мутантный пресенилин-1, нДУВК увеличен (рис. 9). Следовательно, наше предположение о том, что PSEN1dE9 мутация дестабилизирует синаптические контакты через увеличение нДУВК, и таким образом оказывает нейротоксическое действие на нейроны, подтвердилось.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе мы показали, что мутация PSEN1dE9 имеет нейротоксический эффект, то есть снижает число грибовидных шипиков в первичной культуре гиппокампа. Мы подтвердили предположение, что токсичный эффект PSEN1dE9 связан с гиперактивацией нДУВК. Ранее мы показали, что в некоторых случаях БА происходит снижение активности нДУВК, и это вызывает патологию БА. Мы считаем, что сниженная активность нДУВК, как и повышенная активность данного пути, может быть причиной дестабилизации синаптических контактов и тем самым вызывать нарушение когнитивных функций наблюдаемых при БА. Таким образом, для нормального существования нейрона требуется поддержание правильного баланса  $Ca^{2+}$  в клетке, и при разработке терапии важно понимать, что разрабатываемые сегодня активаторы нДУВК, стабилизирующие синаптические контакты в случае формы БА с пониженным нДУВК, могут усугубить токсический эффект при противоположной форме БА, требующей снижения нДУВК. И в свою очередь, для больных с последней формой БА требуется разработка отдельной терапии, основанной на ингибировании нДУВК.

## ВЫВОДЫ

1) В данной работе показано, что PSEN1dE9 мутация обладает нейротоксическим действием, то есть приводит к дестабилизации дендритных шипиков, а именно к уменьшению количества грибовидных шипиков по отношению к общему числу шипиков;

2) показано, что PSEN1dE9 мутация вызывает повышение ДУБК в линейных клетках линии HEK293T, что соответствует нашему предположению о том, что повышение функции пресенилинов как пассивных каналов утечки кальция приводит к повышению ДУБК;

3) получены данные, что PSEN1dE9 мутация вызывает повышение нДУБК в первичной гиппокампальной культуре, полученной из новорожденных мышат, то есть нейротоксический эффект данной мутации связан с увеличением выхода кальция из ЭР, приводящего к увеличению нДУБК.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elena Popugaeva<sup>1</sup> and Ilya Bezprozvanny. Role of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2013. Vol. 6, No. 29. P. 1-7.
2. An Introduction to molecular neurobiology/edited by Zach W. Hall. - Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1992. - 557 p.
3. Khachaturian, Z. S. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol. Aging*, 1987. Vol. 8. P. 345–346.
4. Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I. Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*, 2006. Vol. 126. No. 5. P. 981-93.
5. What Is Alzheimer's? [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Чикаго: Alzheimer's Association, 2017. – Режим доступа: [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_what\\_is\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp)
6. 2016 Alzheimer's Statistics. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – USA: A Place for Mom Inc., 2017. – Режим доступа: <http://www.alzheimers.net/resources/alzheimers-statistics/>
7. Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., Wu, Y.-T., and Prina, M. World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, costs and trends. *Alzheimer's Disease International*, London. – 2015. – 84 p.
8. M. Flint Beal, Anthony E. Lang and Albert Ludolph. Neurodegenerative Diseases. *Neurobiology Pathogenesis and Therapeutics/Cambridge University Press*. – 2005. - 985 p.
9. Small, S.A. and K. Duff, Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*, 2008. Vol. 60. No. 4. P. 534-42.
10. Giannakopoulos, P., et al., Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Front Neurol Neurosci*, 2009. Vol. 24. P. 20-9.

11. Thomas D. Bird. Early-Onset Familial Alzheimer Disease. GeneReviews. 1999.
12. Sarah L Cole, Robert Vassar. The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. Molecular Neurodegeneration. 2007. P. 2-22
13. Giuseppe Verdile, Samuel E Gandy and Ralph N. Martins. The role of Presenelin and its Interacting Proteins in the Biogenesis of Alzheimer's Beta Amyloid. Neurochem Res, 2007. Vol. 32. No. 4-5. P. 609-623.
14. Mostafa Bentahir, Omar Nyabi, Jan Verhamme, Alexandra Tolia, Katrien Horré, Jens Wiltfang, Hermann Esselmann, Bart De Strooper. Presenilin clinical mutations can affect  $\gamma$ -secretase activity by different mechanisms. Journal of neurochemistry, 2006. Vol. 96. No. 3. P. 732-742.
15. Ilya Bezprozvanny. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. Trends in Molecular Medicine, 2009. Vol. 15. No.3. P. 89-100.
16. Popugaeva E, Pchtskaya E., Bezprozvanny. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease – A therapeutic opportunity? Biochem Biophys Res Commun, 2017. Vol. 483. No. 4. P. 998-1004.
17. Hua Zhang, Suyu Sun, Lili Wu, Ekaterina Pchtskaya, Olga Zaharova, Klementina Fon Tacer, Shari G. Birnbaum, and Ilya Bezprozvanny. Store-operated calcium channel complex in postsynaptic spines: a new therapeutic target for Alzheimer's disease treatment. J Neurosci, 2016. Vol. 36. No. 47. P. 11837-11850.
18. B6.Cg-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>dE9</sup>)85Dbo/Mmjax. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Bar Harbor, USA: The Jackson Laboratory, 2017. – Режим доступа: [www.jax.org/strain/005864](http://www.jax.org/strain/005864)
19. Varieties of Neuronal Morphology. [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые дан. – Al Ain, UAE: College of Medicine & Health Sciences, 2015. – Режим доступа:<http://humanphysiology.academy/Neurosciences%202015/Chapter%201/P.1.3p%20Neurone%20Micro.html>
20. Николай Ерофеев. Физиология центральной нервной системы: учебное пособие. - Санкт-Петербург:Litres, 2017. - 191 с.

21. Jon I. Arellano, Ruth Benavides-Piccione, Javier DeFelipe, and Rafael Yuste. Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation Between Synaptic and Spine Morphologies. *Front Neurosci*, 2007 Vol. 1. P. 131-143.
22. Sun, S., et al., 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. P. 79-93.
23. Grienberg C. and Konnerth A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 2012. Vol. 73. No. 5. P. 862-85.
24. A. Bourne, J. and K.M. Harris, Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, 2007. Vol. 17. No. 3. P. 381-6.