

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Пчицкая Екатерина Игоревна

"Механизмы регуляции кинетики кальциевых сигналов и морфологии дендритных шипиков гиппокампальных нейронов белками семейства EB"

Тема научно-квалификационной работы (диссертации)

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.06.01_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Пчицкая Екатерина Игоревна
Научный руководитель: д.б.н., Безпрозванный
Илья Борисович

Санкт Петербург – 2019 год

Научно-квалификационная работа выполнена на кафедре «Биофизика» Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Зав. кафедрой: – Скворцов Алексей Николаевич
д.б.н., доцент

Научный руководитель: – Безпрозванный Илья Борисович
д.б.н., профессор, Высшая школа биомедицинских систем и технологии, Институт биомедицинских систем и технологий

Рецензент: – Абушик Полина Александровна
к.б.н., с.н.с., ИЭФБ РАН

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Недавние исследования динамики тубулинового цитоскелета нейронов с применением прижизненной микроскопии позволили детектировать временный вход динамических микротрубочек в дендритные шипики. Было высказано предположение, что вход динамических микротрубочек служит для доставки грузов в дендритный шипик и регулирования связанных с синаптической пластичностью процессов, но детальные механизмы влияния этого процесса на синапс остаются неизученными. В данной работе рассматривается влияние белка EB3, крепящегося к положительному концу тубулиновых микротрубочек, на кальциевую сигнализацию и морфологию дендритных шипиков, а также его потенциальную роль в регуляции депоуправляемого входа кальция (ДУВК).

Как показали недавние исследования, ДУВК является одним из ключевых механизмов гомеостаза кальция, контролирующим стабильность дендритных шипиков [1]. ДУВК из внеклеточной среды в цитоплазму активируется при снижении концентрации кальция в внутриклеточном кальциевом депо – гладком эндоплазматическом ретикулуме. При опустошении кальциевого депо, белок-кальциевый сенсор STIM2 (stromal interacting molecule 2), располагающийся на мембране эндоплазматического ретикулума, транслоцируется к клеточной мембране, где запускает вход кальция в нейрон путем взаимодействия с кальций-проводящими каналами. Предыдущие исследования автора работы Пчицкой Е.И. продемонстрировали, что депоуправляемый вход кальция снижен в различных мышинных моделях Болезни Альцгеймера (БА), и это является причиной потери грибовидных дендритных шипиков, формирующих сильную синаптическую связь [2-5]. Предполагается, что синаптические контакты данного типа представляют собой клеточный субстрат памяти, процессы формирования которой нарушены при БА [6]. Активация ДУВК способна предотвратить прогрессирующую потерю синапсов и восстановить дефекты синаптической пластичности [4], что указывает на важность нормального функциониро-

вания ДУВК для поддержания синаптических контактов, и перспективность применения активаторов ДУВК для лечения БА. Тем не менее, на данный момент в распоряжении ученых имеется лишь ограниченная информация о механизмах регуляции ДУВК в дендритных шипиках, и их изучение также является актуальной задачей современной нейробиологии и нейрофизиологии.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключается в изучении роли белков EB в регуляции депо-управляемого входа кальция в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов и их морфологии.

Задачи:

1. Проанализировать локализацию белков EB2 и EB3 в первичных гиппокампальных нейронах для определения гомолога, характерного для синапсов;
2. Продемонстрировать взаимодействие синапс-специфичного гомолога EB-белков с белком STIM2 в синапсах гиппокампальных нейронов и идентифицировать ключевую аминокислотную последовательность, отвечающую за их взаимодействие;
3. Провести анализ влияния содержания кальция в эндоплазматическом ретикулуме на взаимодействие белка STIM2 с EB-белками;
4. Оценить влияние нарушения взаимодействия белка STIM2 с синапс-специфичным EB-белком на морфологию дендритных шипиков и кинетику депо-управляемого входа кальция в первичных гиппокампальных нейронах;
5. Провести анализ изменения распределения дендритных шипиков по типам, вызванного гиперэкспрессии синапс-специфичного гомолога EB, в первичных гиппокампальных нейронах, выделенных из мышей дикого типа и мышей линии PC1-M146V, моделирующих Болезнь Альцгеймера.

Научная новизна

Научная новизна выпускной квалификационной работы аспиранта определяется тем, что в ней впервые было показано, что белок end-binding protein 3 (EB3) взаимодействует с белком-кальциевым сенсором STIM2, запускающим депо-управляемый вход кальция в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов, а также была идентифицирована аминокислотная последовательность на цитозольной части белка STIM2, отвечающая за их взаимодействие. В работе впервые было продемонстрировано, что взаимодействие этих белков критически важно для поддержания количества грибовидных дендритных шипиков, и стабильного значения амплитуды депо-управляемого входа кальция. Полученные в ходе работы над диссертацией результаты впервые продемонстрировали, что гиперэкспрессия белка EB3 вызывает значительные изменения в морфологии синапсов в нейронах, моделирующих БА, а именно восстанавливает процент дендритных шипиков грибовидного типа.

Теоретическая и практическая значимость

Нейродегенеративные заболевания – группа заболеваний нервной системы, характеризующиеся прогрессирующим нарушением морфологии и функций определенной группы нервных клеток и их последующей гибелью. Нейродегенеративные заболевания, как правило, затрагивают людей в преклонном возрасте, и из-за неуклонного старения населения в развивающихся странах эта группа заболеваний встречается все чаще и представляет серьезную проблему для человечества. Эффективная терапия, способная остановить прогрессирующую потерю нервных клеток отсутствует, и доступное на данный момент лечение способно только облегчить симптомы заболевания. Все больше независимых исследований показывают, что дисрегуляция кальциевого гомеостаза в нейронах является движущей силой процесса нейродегенерации при БА [7]. Более того, для Болезни Альцгеймера была высказана

так называемая «кальциевая гипотеза», утверждающая, что первопричиной развития БА являются нарушения в кальциевом гомеостазе [8], которая все больше набирает популярность в связи массовым провалом антиамилоидных агентов в клинических испытаниях последних лет [9]. Разработка лекарственных средств, способных нормализовать кальциевый сигналинг в нейронах, представляет собой перспективное направление для лечения нейродегенеративных заболеваний, представляющее большой интерес со стороны фармакологической промышленности. Было продемонстрировано нарушение ДУВК при БА, а так же потенциальная возможность применения активаторов ДУВК для ее лечения [4]. Более того, различные нарушения ДУВК, указывающие на его важность для функционирования нейрона, были обнаружены и в других нейродегенеративных заболеваниях, а именно болезни Хантингтона [10] и Болезни Паркинсона [11]. Данная работа, направленная на изучение молекулярных механизмов регуляции ДУВК, оценку его влияния на кинетику кальциевых токов в дендритных шипиках, решает фундаментальную задачу по исследованию синаптической кальциевой регуляции и стабильности, а так же позволяет разработать новые терапевтические мишени для разработки активаторов ДУВК, направленных на лечение БА и возможно других нейродегенеративных заболеваний.

Полученные в исследовании результаты о молекулярных механизмах регуляции ДУВК белком тубулинового цитоскелета EB3, влияние этого белка на морфологию и кальциевую сигнализацию дендритных шипиков, имеют важную теоретическую значимость. Подобные результаты указывают ранее не известное роль тубулинового цитоскелета в регуляции кальциевого сигналинга и морфологии дендритных шипиков нейронов.

Апробация работы

Результаты исследования докладывались на 12й международной конференции по болезни Альцгеймера и Паркинсона AD/PD 2015, 18-22 марта 2015 года, Ницца, Франция, на V Съезде биофизиков России, 4-10 октября 2015 года, Ростов-на-Дону,

Россия, на научном форуме с международным участием «Неделя науки СПбПУ» 13-19 ноября 2017 года, Санкт-Петербург, Россия, на 5й международной научной конференции по молекулярной нейродегенерации ICMN2018, 11-13 июня 2018 года, Стокгольм, Швеция, на 11м FENS форуме нейронаук, 7-11 июля 2018 года, Берлин, Германия, на юбилейной научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии и мультидисциплинарные подходы в диагностике и лечении социально-значимых заболеваний» 17-20 октября 2018 года, Санкт-Петербург, Россия, на 14й международной конференции по болезни Альцгеймера и Паркинсона AD/PD 2019, 26-21 марта 2019 года, Лиссабон, Португалия.

Публикации

По материалам научно-квалификационной работы опубликовано 10 статей, в том числе 2 на русском языке и 8 на английском языке, и 3 тезиса докладов в сборниках научных и научно-практических конференций.

Представление научного доклада: основные положения

1. Из белков семейства EB специфичным для дендритных шипиков является гомолог EB3;
2. Белок STIM2 взаимодействуют с белком EB3 при помощи аминокислотной последовательности Ser-X-Iso-Pro, расположенной на цитозольной части белка STIM2;
3. Взаимодействие белков STIM2 и EB3 зависит от концентрации кальция в ЭР клетки;
4. Амплитуда ДУВК в дендритных шипиках и процент дендритных шипиков грибовидного типа в гиппокампальных нейронах снижается при разрушении взаимодействия белков EB3 и STIM2;
5. Гиперэкспрессия белка EB3 вызывает увеличение числа грибовидных дендритных шипиков у нейронов дикого типа и предотвращает их потерю в нейронах, полученных из мышей-моделей БА линии PS1-M146V.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты, предмет и методы исследования

Объектом исследования выпускной квалификационной работы аспиранта являются механизмы кальциевой сигнализации в нейронах.

Предметом исследования выпускной квалификационной работы является влияние тубулин-связывающих белков семейства EB и их взаимодействия с индуцирующим ДУВК в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов белком STIM2 на кальциевую сигнализацию и морфологию гиппокампальных нейронов.

В ходе работы над выпускной квалификационной работой применялись следующие методы: культивирование диссоциированных нейронов гиппокампа мышей, ведение клеточной линии HEK293T, иммуноцитохимическое окрашивание, иммунопреципитация, выделение рекомбинантных белков, GST pull-down эксперименты, выделение плазмидной ДНК, сайт-направленный мутагенез, кальций-фосфатная трансфекция, анализ морфологии дендритных шипиков в программном обеспечении NeuroStudio, флуориметрический анализ изменения внутриклеточной концентрации кальция, методы статистической обработки данных.

Результаты и их обсуждение

Для исследования локализации белков EB2/3 первичные гиппокампальные нейроны на DIV16 были зафиксированы при помощи 4% раствора параформальдегида и далее окрашены с помощью метода иммуноцитохимии анти-EB2 и анти-EB3 антителами. В качестве нейронального маркера для визуализации структуры нейрона использовался белок MAP2, для визуализации клеточных ядер использовался флуоресцентный краситель DAPI. Полученные конфокальные изображения демонстрируют, что белок EB2 преимущественно локализуется в соме и слабо представлен в дендритах, в то время как EB3 широко экспрессируется в нейрональных отростках (Рис. 1, А). Для исследования экспрессии белков EB2/3 в синаптических контактах при помощи субклеточного фракционирования была получена грубая си-

наптосомальная фракция из гиппокампов трехмесячных мышей дикого типа линии C57BL/6. При помощи метода Вестерн-блот было произведено сравнение экспрессии белков EB2/3 и STIM2 в лизате целого гиппокампа и полученной из него синаптосомальной фракции. Эксперимент продемонстрировал, что белки EB3 и STIM2 широко представлены в синаптических контактах гиппокампаальных нейронов, в отличие от белка EB2, экспрессия которого наблюдается на минимальном уровне (Рис. 1, Б). Таким образом, исходя из анализа субклеточной локализации, было предположено, что из белков семейства end-binding protein основную роль в функционировании синапсов играет гомолог EB3. В дальнейших экспериментах гомолог EB2 не рассматривался, так как работа направлена на исследование процессов, протекающих в дендритных шипиках нейронов.

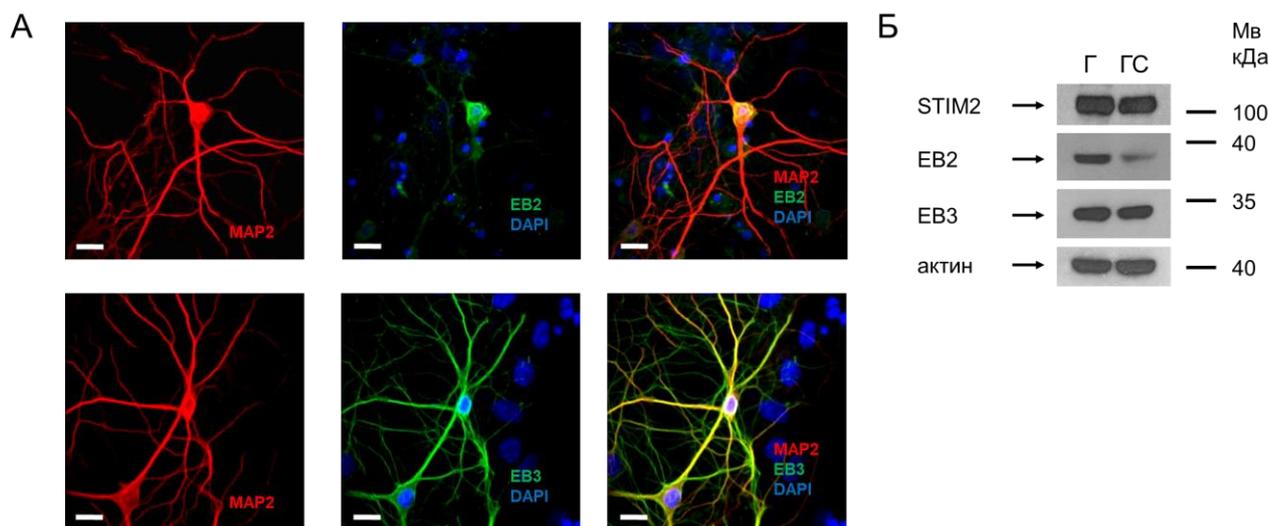


Рисунок 1. **А**, Субклеточная локализация белков EB3 и EB2 в первичных гиппокампаальных нейронах дикого типа, проанализированная методом иммуноцитохимического окрашивания с применением anti- EB2/3 антител (зеленый). MAP2 (красный) использован в качестве нейронального маркера и DAPI (голубой) для идентификации клеточных ядер. Линия масштаба соответствует 10 мкм. **Б**, Вестерн-блот анализ экспрессии белков STIM2, EB2, EB3 в лизатах гиппокампа (Г) и его грубой синаптосомальной фракции (ГС), полученных из трехмесячных мышей дикого типа. Актин использован в качестве контроля нагрузки.

Исходя из литературных данных [12], было выдвинуто предположение, что белки STIM2 и EB3 взаимодействуют в синаптических контактах нейронов. Иммунопреципитация из лизата грубой синаптосомальной фракции целого мозга мыши с помощью кроличьих антител против белка EB3 подтвердила это предположение (Рис.2, А). Анализ литературных данных выявил, что аминокислотная последовательность Ser-X-Iso-Pro в белке STIM2 наиболее вероятно отвечает за связывание с белком EB3. Мы провели pull-down эксперименты с рекомбинантными белками, представляющими собой конъюгаты белка GST с цитозольной частью белка STIM2 с нормальной последовательностью (GST-STIM2) и с мутацией в предполагаемом сайте связывания, замещающей аминокислоты Iso-Pro на Asn-Asn (GST-STIM2-IP/NN). Pull-down анализ подтвердил взаимодействие белков STIM2 и EB3, а также продемонстрировал критическую важность аминокислотной последовательности Ser-X-Iso-Pro в данном взаимодействии (Рис.2, Б).

Влияние концентрации кальция в эндоплазматическом ретикулуме на взаимодействие белков STIM2 и EB3 было проверено на клетках линии НЕК293Т. Через 48 часов после трансфекции плазмидами, кодирующими белки STIM2, STIM2-IP/NN и EB3. Клетки помещались в искусственную спинномозговую жидкость, содержащую кальций в концентрации 2мМ, или безкальциевую жидкость с добавлением ингибитора SERCA-помпы тапсигаргина в концентрации 1мкМ, вызывающего пассивное опустошение эндоплазматического ретикулума клетки. Далее клетки лизировались, и после производилась иммунопреципитация с помощью кроличьих антител против белка EB3. Эксперимент продемонстрировал, что взаимодействие белков STIM2 и EB3 зависит от концентрации кальция в эндоплазматическом ретикулуме, и разрушается при опустошении кальциевого депо (Рис 2, В).

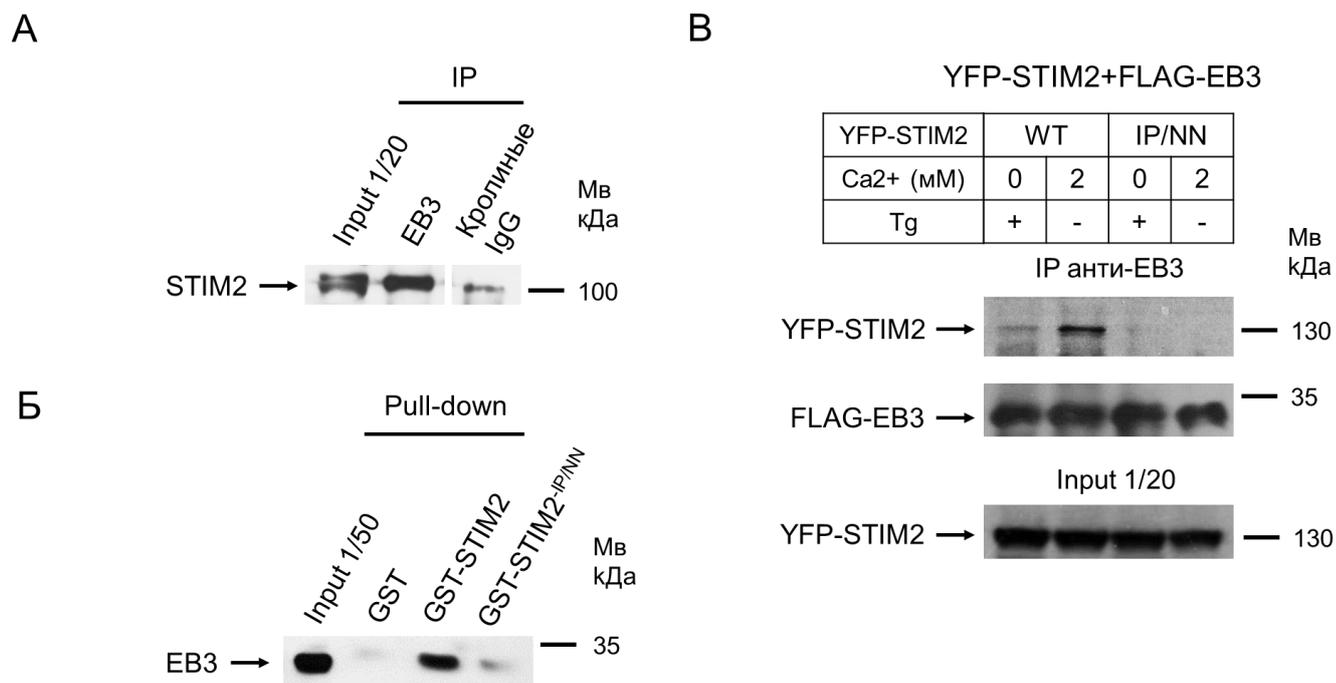
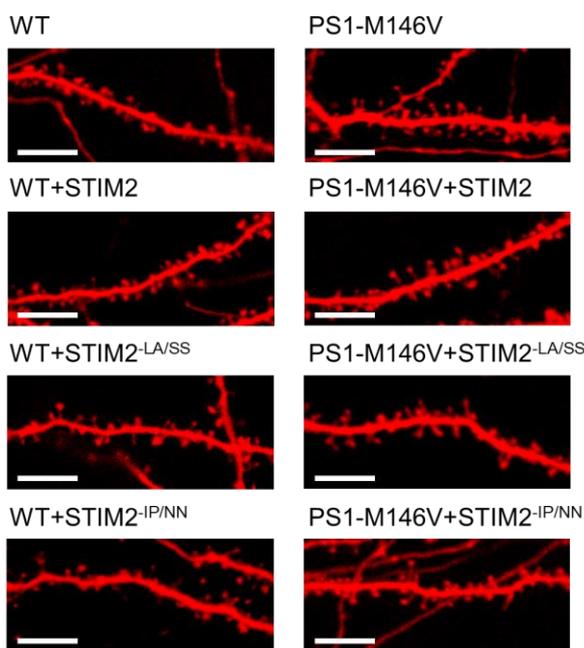


Рисунок 2. **А**, Иммунопреципитация из лизата синаптосомальной фракции целого мозга мыши дикого типа с кроличьими поликлональными антителами против белка EB3 и контрольной кроличьей сывороткой. Нагрузка соответствует 1/10 от объёма лизата, использованного для иммунопреципитации. **Б**, Pull-down анализ взаимодействия между рекомбинантными белками GST, GST-STIM2-CT и GST-STIM2-IP/NN и лизатом грубой синаптосомальной фракции целого мозга мыши дикого типа. Нагрузка соответствует 1/50 от объёма лизата, использованного для эксперимента. **В**, Иммунопреципитация из лизата клеток линии HEK293T, трансфицированных плазмидами, кодирующими белки STIM2, STIM2-IP/NN и EB3 с кроличьими поликлональными антителами против белка EB3 и контрольной кроличьей сывороткой. Нагрузка соответствует 1/20 от объёма лизата, использованного для иммунопреципитации.

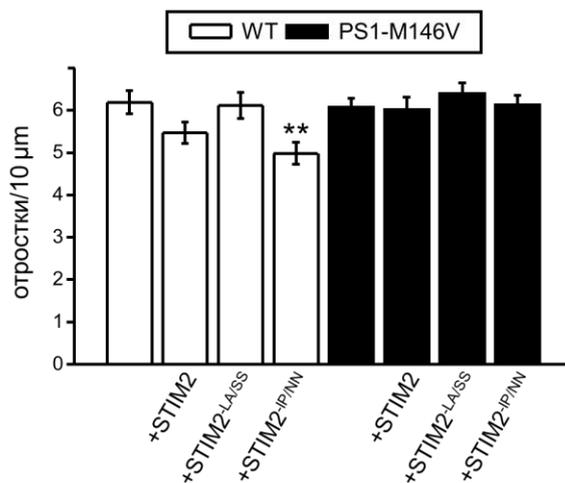
В предыдущих исследованиях нашей лаборатории было продемонстрировано, что гиперэкспрессия белка STIM2-LA/SS, содержащего мутацию в сайте связывания с кальциевым каналом *Orai*, индуцирующим вход кальция в клетку при активации ДУВК, приводит к снижению числа грибовидных шипиков в культуре дикого типа. Гиперэкспрессия белка STIM2, содержащего данную мутацию, не способна в отличие от нормального STIM2 восстановить процент грибовидных шипиков в нейронах, моделирующих БА, полученных из мышей линии PS1-M146V [4]. Эти данные доказывают, что мутантная форма STIM2-LA/SS не является функционально активной. В данном исследовании был применен такой же подход для изучения мутации

IP/NN в белке STIM2. Первичные гиппокампальные нейроны дикого типа или полученные из мышей-моделей БА линии PS1-M146V-KI трансфицировались плазмидой, кодирующей флуоресцентный белок tdTomato, или ко-трансфицировались tdTomato и плазмидами, кодирующими белки STIM2, STIM2-LA/SS и STIM2-IP/NN на 7 день культивирования *in vitro* (DIV). На DIV17 нейроны фиксировались 4% раствором параформальдегида, и затем были получены конфокальные изображения, отражающие их морфологию, и проведен анализ плотности и распределения дендритных шипиков по типам с помощью программного обеспечения NeuroStudio. В соответствии с данными полученными ранее, было обнаружено значительное снижение процента грибовидных шипиков в PS1-M146V нейронах до $28,2 \pm 1,1\%$ по сравнению с $38,5 \pm 1,7\%$ в культурах дикого типа, который поднимался до значения $39,3 \pm 1,9\%$ при гиперэкспрессии белка STIM2. Гиперэкспрессия белка мутантной формы STIM2-LA/SS привела к снижению процента грибовидных шипиков в нейронах дикого типа до $30,1 \pm 1,6\%$ и не смогла восстановить потерю грибовидных дендритных шипиков в PS1-M146V нейронах, что соответствует результатам прошлых исследований [4]. Аналогично, гиперэкспрессия мутантной формы STIM2-IP/NN привела к значительному снижению процента грибовидных шипиков в нейронах дикого типа до $26,7 \pm 1,8\%$ и не смогла восстановить потерю грибовидных дендритных шипиков в PS1-M146V нейронах (Рис. 3, Б). Более того, гиперэкспрессия STIM2-IP/NN вызвала снижение плотности дендритных шипиков с значения $6,2 \pm 2,8$ шипика на 10 мкм длины дендрита до $5 \pm 2,63$ (Рис.3, В). Полученные данные демонстрируют важную роль взаимодействия белков STIM2 и EB3 в регуляции морфологии гиппокампальных дендритных шипиков.

А



Б



В

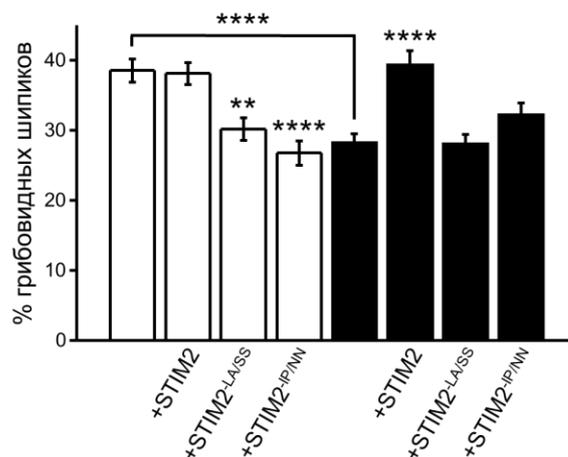


Рисунок 3. А, Конфокальные изображения гиппокампальных нейронов дикого типа (WT) и нейронов, полученных из мышей-моделей БА, несущих мутацию PS1-M146V, трансфицированных плазмидой tdTomato или ко-трансфицированных tdTomato и STIM2, STIM2-LA/SS, STIM2-IP/NN на DIV7 и зафиксированных на DIV17. Линия масштаба соответствует 10 мкм. Б, В, Число дендритных шипиков на 10 μm длины дендрита (Б) и процент дендритных шипиков грибовидного типа (В) для каждой группы клеток на панели А. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

Далее была произведена оценка изменения в амплитуде ДУВК в результате тапсигаргин-индуцируемого опустошения кальциевого депо при аппликации синтетического конкурирующего пептида, нарушающего взаимодействие белков STIM2 и EB3. Первичные гиппокампальные нейроны дикого типа были трансфицированы плазмидой, кодирующей кальциевый сенсор GCamp5.3 на DIV7. На DIV17 перед проведением экспериментов по кальциевому имиджингу нейроны инкубировались в течение 2х часов с контрольным и конкурирующим пептидом в концентрации 5мкМ в искусственной спинномозговой жидкости. Далее производилось опустошение кальциевого депо в безкальциевой искусственной спинномозговой жидкости с до-

бавлением ингибитора SERCA-помпы тапсигаргина концентрации 1мкМ. Регистрация сигнала производилась с помощью монохромной цифровой камеры высокого разрешения (Oxford Instruments, ANDOR Zyla 4.2 sCMOS). ДУВК индуцировался путем замены безкальциевой искусственной спинномозговой жидкости в которой инкубировались нейроны на содержащую кальций в концентрации 2мМ. Для селективности эксперимента относительно ДУВК использовались блокаторы других кальций-проводящих каналов. Эксперимент показал, что нарушение взаимодействия белков STIM2 и EB3 вызывает значительное снижение амплитуды нДУВК в дендритных шипиках гиппокампальных нейронов (Рис. 4), что свидетельствует в пользу того, что взаимодействие данных белков является критичным для функционирования ДУВК в дендритных шипиках.

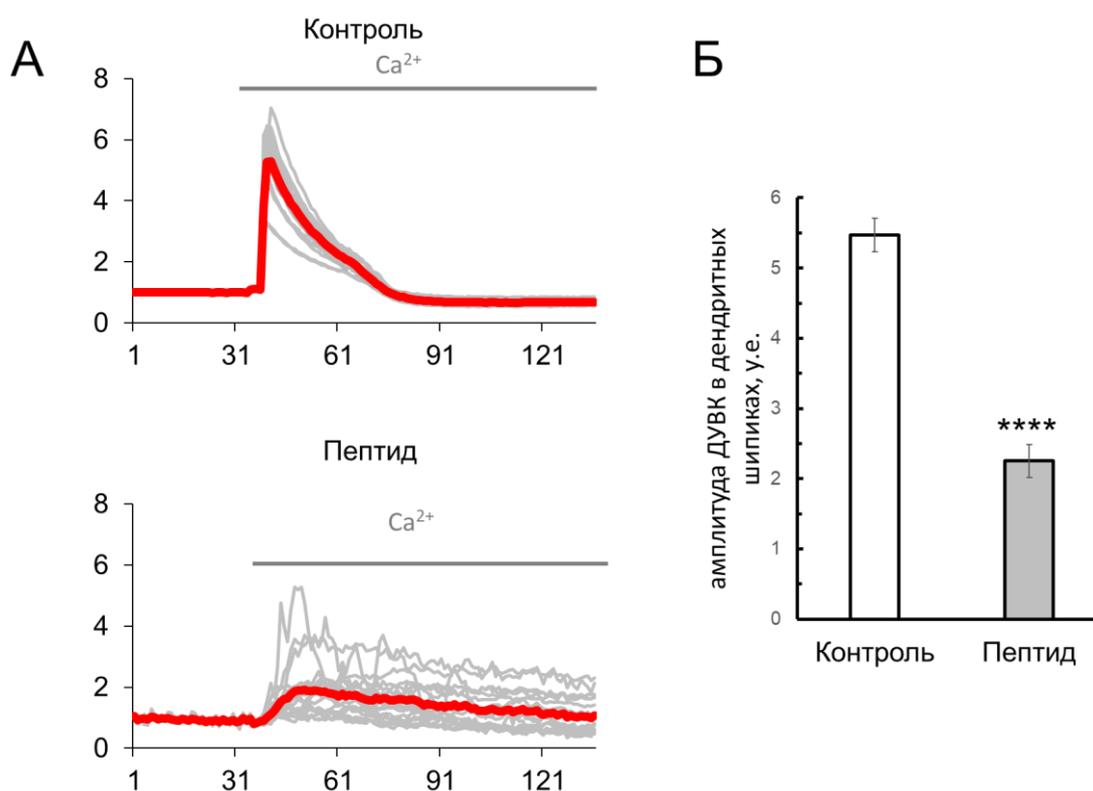


Рисунок 4. Нарушение взаимодействия белков STIM2 и EB3 влияет на ДУВК в дендритных шипиках первичных гиппокампальных нейронов. **А,** Синаптические Ca^{2+} сигналы GCaMP5.3 (F/F0) первичных гиппокампальных нейронов на DIV15, трансфицированных GCaMP5.3 в контрольной группе и при воздействии конкурирующим пептидом в концентрации 5 мкМ. **Б,** Усредненная амплитуда синаптического ДУВК для групп клеток на панели А. Данные представлены как среднее \pm SEM, ****: $p < 0,0001$.

С помощью конфокальной микроскопии был выполнен анализ влияния гиперэкспрессии белка EB3 на распределение дендритных шипиков по типам в первичных гиппокампальных нейронах дикого типа и полученных из мышей-моделей БА линии PS1-M146V-KI. Первичные гиппокампальные нейроны дикого типа и полученные из мышей-моделей БА линии PS1-M146V-KI были трансфицированы плазмидой, кодирующей флуоресцентный белок tdTomato или ко-трансфицированы tdTomato и плазмидой, кодирующей белок EB3, на DIV7. На DIV17 нейроны были зафиксированы, получены конфокальные изображения, отражающие их морфологию и проведен анализ плотности и морфологии дендритных шипиков с помощью программного обеспечения NeuroStudio. Гиперэкспрессия белка EB3 вызывала значительное увеличение процента грибовидных шипиков в нейронах дикого типа до значения $47,8 \pm 2,4\%$. В соответствии с данными полученными ранее, мы обнаружили значительное снижение процента грибовидных шипиков в PS1-M146V нейронах до уровня $28,2 \pm 1,1\%$ по сравнению с $38,5 \pm 1,7\%$ в культурах дикого типа, который поднимался до значения $47,1 \pm 1,9\%$ при гиперэкспрессии белка EB3.

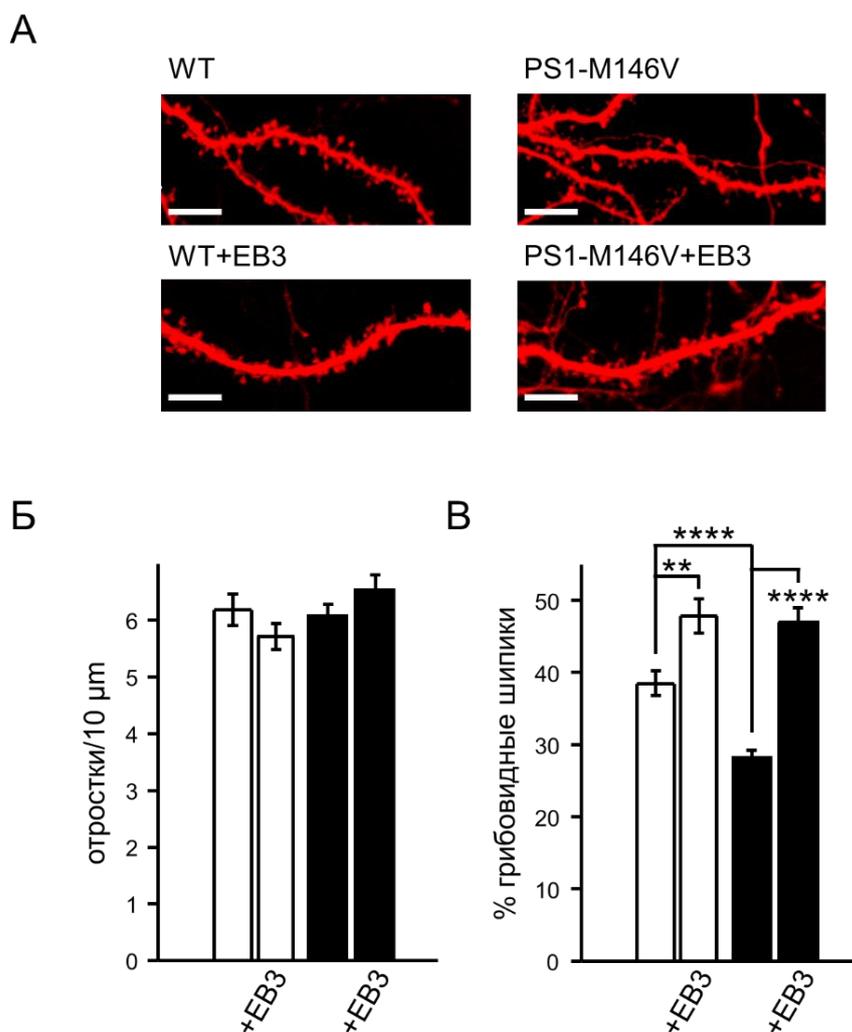


Рисунок 5. А, Конфокальные изображения гиппокампальных нейронов дикого типа (WT) и нейронов, полученных из мышей-моделей БА, несущих мутацию PS1-M146V, трансфицированных плазмидой tdTomato или ко-трансфицированных tdTomato и EB3 на DIV7 и зафиксированных на DIV17. Линия масштаба соответствует 10 мкм. **Б, В,** Число дендритных шипиков на 10 μm длины дендрита (**Б**) и процент дендритных шипиков грибовидного типа (**В**) для каждой группы клеток на панели А. Данные представлены как среднее ± SEM, **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

Заключение

В зрелых нейронах тубулиновые микротрубочки существуют как автономные структуры различной длины без присоединения к центросоме, как это происходит в не нейрональных клетках [13]. По оценкам, популяция микротрубочек в нейронах является более стабильной, чем в делящихся клетках, что позволяет поддерживать их уникальную протяженную форму. Однако стоит упомянуть, что в нейронах так-

же существует фракция микротрубочек в динамическом состоянии как в дендритах, так и в аксонах [13]. Ранее сформировалась парадигма, что в нейронах тубулиновый и актиновый компоненты цитоскелета не пересекаются, где тубулин формирует клеточный каркас в нейритах, а актин – в дендритных шипиках. Однако, недавние успехи в прижизненной микроскопии клетки позволили детектировать временный вход динамических микротрубочек в дендритные шипики нейрона [10, 14-16]. Функция данного явления остается не изученной. Дистальный конец растущей микротрубочки взаимодействует с специфичной группой белков plus-end-tracking proteins (+TIPs), которые регулируют его динамику и взаимодействие с другими клеточными компонентами [17]. Группа +TIPs белков включает в себя белок End-binding protein 3 (EB3), который, как показано в данной работе является нейрон-специфичным членом семейства белков EB, характерным для дендритных шипиков нейронов [18]. В работе продемонстрировано, что изменение уровня экспрессии EB3 влияет на морфологию дендритных шипиков. Нокдаун EB3 приводит к снижению числа шипиков с грибовидной формой головки, в то время как гиперэкспрессия EB3 вызывает их значительное увеличение [10, 19]. Все вместе эти данные свидетельствуют в пользу того, что белок EB3 вовлечен в регуляцию морфологии дендритных шипиков. Пчицкой Е.И. показано, это взаимодействие EB3 с белком STIM2, происходящее через аминокислотную последовательность Ser-X-Iso-Pro, контролирует нейрональный депо-управляемый вход кальция, жизненно важный для функционирования грибовидных дендритных шипиков [1, 4, 19]. Разрушение взаимодействия STIM2-EB3 ведет к снижению процента грибовидных дендритных шипиков в нейронах [19]. В невозбудимых клетках взаимодействие гомологичных упомянутым выше белкам EB1 и STIM1 регулирует депо-управляемый вход кальция [20] и движение эндоплазматического ретикулума (ЭР) при помощи так называемого tip-attachment complex, когда трубочка ЭР вытягивается вместе с концом растущей тубулиновой микротрубочки [21]. Это позволяет высказать предположение о том, что трубочка ЭР это один из возможных грузов, доставляемый тубулиновой микротрубочкой в шипик, и что тубулиновый цитоскелет может быть вовлечен в регуляцию кальциевого гомеостаза в шипиках [19]. Таким образом, в данной работе впервые

было продемонстрировано, что динамические тубулиновые микротрубочки вовлечены в регуляцию депо-управляемого входа кальция и морфологии дендритных шипиков гиппокампальных нейронов.

Отличительной чертой болезни Альцгеймера является потеря памяти. В предшествующих данной работе публикациях автора, а также другими научными группами, было высказано предположение, что потеря грибовидных шипиков может лежать в основе когнитивных нарушений во время развития БА, и что восстановление нормальной морфологии дендритных шипиков является потенциальным терапевтическим подходом для лечения БА [22-24]. Уменьшение количества грибовидных шипиков было продемонстрировано на нескольких клеточных и животных моделях БА [2, 3, 5, 25, 26] включая мышиную модель PS1-M146V-KI. В настоящем исследовании показано, что гиперэкспрессия EB3 восстанавливает недостаточность числа грибовидных дендритных шипиков в нейронах PS1-M146V-KI. Таким образом, влияние на динамические микротрубочки путем гиперэкспрессии + TIR-связывающего белка EB3 показало многообещающий результат на мышиную модель БА, и эти данные могут быть использованы для разработки терапевтических новых мишеней для лечения этого заболевания.

Аспирант

Пчицкая Е.И.

Список литературы

- [1] Pchitskaya, E., Popugaeva, E., and Bezprozvanny, I. (2017) Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases, *Cell Calcium*, **30**, 30066-30060.
- [2] Sun, S., Zhang, H., Liu, J., Popugaeva, E., Xu, N.J., Feske, S., White, C.L., 3rd, and Bezprozvanny, I. (2014) Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice, *Neuron*, **82**, 79-93.
- [3] Popugaeva, E., Pchitskaya, E., Speshilova, A., Alexandrov, S., Zhang, H., Vlasova, O., and Bezprozvanny, I. (2015) STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity, *Mol Neurodegener*, **10**, 37.
- [4] Zhang, H., Sun, S., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, O., Fon Tacer, K., and Bezprozvanny, I. (2016) Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment, *The Journal of Neuroscience*, **36**, 11837-11850.
- [5] Zhang, H., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, O., Saito, T., Saido, T., and Bezprozvanny, I. (2015) Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease, *The Journal of Neuroscience*, **35**, 13275-13286.
- [6] Koffie, R.M., Hyman, B.T., and Spires-Jones, T.L. (2011) Alzheimer's disease: synapses gone cold, *Mol Neurodegener*, **6**, 63.
- [7] Bezprozvanny, I. (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases, *Trends Mol Med*, **15**, 89-100.
- [8] (2017) Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis, *Alzheimers Dement*, **13**, 178-182.
- [9] Cummings, J., Aisen, P.S., DuBois, B., Frolich, L., Jack, C.R., Jr., Jones, R.W., Morris, J.C., Raskin, J., Dowsett, S.A., and Scheltens, P. (2016) Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025, *Alzheimers Res Ther*, **8**, 016-0207.

- [10] Wu, J., Ryskamp, D.A., Liang, X., Egorova, P., Zakharova, O., Hung, G., and Bezprozvanny, I. (2016) Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model, *The Journal of Neuroscience*, **36**, 125-141.
- [11] Zhou, Q., Yen, A., Rymarczyk, G., Asai, H., Trengrove, C., Aziz, N., Kirber, M.T., Mostoslavsky, G., Ikezu, T., Wolozin, B., and Bolotina, V.M. (2016) Impairment of PARK14-dependent Ca(2+) signalling is a novel determinant of Parkinson's disease, *Nature Communications*, **7**, 10332.
- [12] Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Jr., Hoogenraad, C.C., and Akhmanova, A. (2008) STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER, *Curr Biol*, **18**, 177-182.
- [13] Trebak, M., Vazquez, G., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels, *Cell Calcium*, **33**, 451-461.
- [14] Dent, E.W. (2017) Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics in dendrites and spines, *Mol Biol Cell*, **28**, 1-8.
- [15] Gu, J., Firestein, B.L., and Zheng, J.Q. (2008) Microtubules in Dendritic Spine Development, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 12120-12124.
- [16] Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., and Dent, E.W. (2008) Activity-Dependent Dynamic Microtubule Invasion of Dendritic Spines, *The Journal of Neuroscience*, **28**, 13094-13105.
- [17] Akhmanova, A. and Steinmetz, M.O. (2010) Microtubule +TIPs at a glance, *Journal of Cell Science*, **123**, 3415-3419.
- [18] Nakagawa, H., Koyama, K., Murata, Y., Morito, M., Akiyama, T., and Nakamura, Y. (2000) EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue, *Oncogene*, **19**, 210-216.

- [19] Pchitskaya, E., Kraskovskaya, N., Chernyuk, D., Popugaeva, E., Zhang, H., Vlasova, O., and Bezprozvanny, I. (2017) Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons, *Sci Rep*, **7**, 017-17762.
- [20] Chang, C.L., Chen, Y.J., Quintanilla, C.G., Hsieh, T.S., and Liou, J. (2018) EB1 binding restricts STIM1 translocation to ER-PM junctions and regulates store-operated Ca(2+) entry, *J Cell Biol*,
- [21] Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Hoogenraad, C.C., and Akhmanova, A. (2008) STIM1 is a microtubule plus end tracking protein involved in remodeling of the endoplasmic reticulum, *Current biology : CB*, **18**, 177-182.
- [22] Tackenberg, C., Ghori, A., and Brandt, R. (2009) Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease, *Curr Alzheimer Res*, **6**, 261-268.
- [23] Popugaeva, E., Supnet, C., and Bezprozvanny, I. (2012) Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease, *Messenger*, **1**, 53-62.
- [24] Popugaeva, E. and Bezprozvanny, I. (2013) Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease, *Front Mol Neurosci*, **6**, 29.
- [25] Tackenberg, C. and Brandt, R. (2009) Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid-beta, wild-type tau, and R406W tau, *J Neurosci*, **29**, 14439-14450.
- [26] Penazzi, L., Tackenberg, C., Ghori, A., Golovyashkina, N., Niewidok, B., Selle, K., Ballatore, C., Smith Iii, A.B., Bakota, L., and Brandt, R. (2016) A β -mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D, *Neuropharmacology*, **105**, 84-95.

**Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы
(диссертации)**

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. Popugaeva E., Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity?// *Biochem Biophys Res Commun* – 2017. – Vol. 483 (3). – P. 998–1004.
2. Pchitskaya E., Kraskovskaya N., Chernyuk D., Popugaeva E., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons// *Sci Rep* –2018. – Vol.7. – P. 017–17762.
3. Pchitskaya E. I., Zhemkov V.A., Bezprozvanny I.B. Dynamic microtubules in Alzheimer disease: connection to dendritic spines pathology// *Biochemistry (Moscow)* – 2018. – Vol. 83(9). – P. 1068–1074.
4. Pchitskaya E., Popugaeva E., Bezprozvanny I. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases// *Cell Calcium*. – 2018. – Vol. 70. – P. 87–94.
5. Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease//*Antioxid Redox Signal*. – 2018. – Vol. 29(12) – P. 1176-1188.
6. Popugaeva E., Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? // *Biochem Biophys Res Commun* – 2017. – Vol. 483 (3). – P. 998–1004.
7. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zaharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I. Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in APP knock-in mouse model of Alzheimer's disease // *J Neurosci*. – 2015. – Vol. 35(39). – P. 13275–13286.
8. Zhang H., Sun S., Wu L., Pchitskaya E., Zaharova O., Bezprozvanny I. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment // *J Neurosci*. – 2016. – Vol. 36(47). – P. 11837-11850.

9. Пчицкая Е.И., Крылов И.С., Власова О.Л., Болсуновская М.В., Безprozванный И.Б. Переход от классического деления дендритных шипиков нейронов на типы к альтернативным методам анализа // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2019. Т. 12. № 2. С. 88–100. DOI: 10.18721/JPM.12207

Публикации в других изданиях

1. Пчицкая, Е.И. Красковская Н.А., Попугаева Е.А., Власова О.Л., Безprozванный И.Б. Влияние взаимодействия белка STIM2 с plus-end binding белками на морфологию синапсов // Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ»: материалы научно-практической конференции. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – 2015. – С. 467–469.
2. Пчицкая Е.И., Попугаева Е.А., Власова О.Л., Безprozванный И.Б. Роль белка STIM2 в регуляции синаптических контактов в условиях амилоидной токсичности // V Съезд Биофизиков. Материалы докладов. – 2015. – Т.1. – С. 367.
3. Kraskovskaya N.A., Pchitskaya E.I., Popugaeva E.A., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B. Investigating EB2 and EB3 localization in hippocampal neuronal culture // Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ»: материалы научно-практической конференции. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – 2015. – С. 448–450.
4. Пчицкая Е.И., Жемков В.А., Безprozванный И.Б. Динамические микротрубочки при Болезни Альцгеймера: связь с патологией дендритных шипиков. Биохимия, 2018. Т.93. № 9. С.1343-1350.

Аспирант

Пчицкая Е.И.