



На правах рукописи

ЧЕРНЮК
Дарья Павловна

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ VCL-2 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ
С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2022

Работа выполнена в лаборатории молекулярной нейродегенерации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО СПбПУ)

Научный руководитель:

Безпрозванный Илья Борисович,

доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной нейродегенерации ФГАОУ ВО СПбПУ

Официальные оппоненты:

Романова Ирина Владимировна,

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Вигонт Владимир Александрович,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук»

Защита состоится « **26** » **декабря 2022** г. в 12:00 на заседании диссертационного совета **У.1.5.2.22** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/defences-calendar/the-degree-of-candidate-of-sciences/chernyuk_darya_pavlovna/ ФГАОУ ВО СПбПУ.

Автореферат разослан: « ____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Термином нейродегенеративные заболевания (НДЗ) определяется большая группа нейропатологий, развивающихся у лиц преимущественно зрелого возраста, для которых характерно прогрессирующая гибель определенных групп нервных клеток, сопровождающаяся атрофией соответствующих отделов головного мозга. Болезнь Альцгеймера (БА) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, возникающим преимущественно у людей пожилого возраста. При БА в первую очередь поражаются клетки гиппокампа, области мозга, ответственной за формирование и хранение памяти. В связи с этим, основным проявлением данного заболевания является прогрессирующая потеря памяти, со временем приводящая к слабоумию и полной потере способности к самообслуживанию. Из-за роста благосостояния населения и увеличения продолжительности жизни в развитых странах БА приобретает статус огромной социальной и экономической проблемы.

В настоящее время не достигнуто полного понимания причин возникновения и развития БА, поэтому современные методы терапии лишь несколько смягчают симптомы, но пока не позволяют ни остановить, ни замедлить развитие заболевания. Лекарства, которые сейчас используются для лечения БА, способны только облегчить симптомы. В основном это препараты, восполняющие дефицит нейротрансмиттеров - ингибиторы ацетилхолинэстеразы. На основании доминирующей «амилоидной гипотезы» было разработано несколько стратегий, направленных на поиск терапевтических агентов для лечения БА. Соответственно, основной мишенью при разработке лекарственной терапии являлся бета-амилоид. Согласно проведенным клиническим испытаниям с 2002 по 2012 год только один препарат было официально одобрен к применению для лечения БА, Мемантин, который является антагонистом NMDA рецепторов глутамата [Morris, Clark et al. 2014]. В то время как стратегии антиамилоидной терапии до сих пор не были успешными у пациентов [Karran, Mercken et al. 2011], недавно разработанный Aducanumab, возможно, будет иметь большой успех [Sevigny, Chiao et al. 2016], однако на данный момент его эффективность вызывает большие споры в научном сообществе. В связи с этим, все больше ученых сходятся во мнении, что необходимо более детальное изучение физиологической и патологической роли бета-амилоида, а также поиск новых сигнальных путей, вовлечённых в патогенез БА и новых объектов потенциального терапевтического воздействия помимо β амилоида.

Степень разработанности темы исследования. Впервые о болезни Альцгеймера мир услышал 3 ноября 1906 года на 37-м съезде психиатров Юго-Западной Германии. Чуть позже в 1907 году вышла статья чешского психиатра и невропатолога Оскара Фишера, где описывается наличие бляшек и нейрофибриллярных клубков в 12 из 16 случаях старческого слабоумия [Fischer 1907]. 1976 году Роберт Катцман вывел, что старческая форма БА является, примерно, четвертой или пятой в списке причин смерти населения США, и предположил, что старческое слабоумие и болезнь Альцгеймера необходимо рассматривать как одно заболевание [Katzman 1976]. С развитием методов прижизненной визуализации головного мозга ученые получили более широкий спектр инструментов для исследования развития и причин возникновения болезни Альцгеймера. Так в 1980х годах были получены данные о раннем изменении гиппокампа

у пациентов с БА [Ferris S. H. 1980, Frackowiak R. S. 1981, Mony J. De Leon 1989]. Благодаря этим открытиям, было выявлено что гиппокамп — это ключевое место патологии БА. В 1990 году при помощи метода конфокальной микросъемки была обнаружена корреляция между когнитивными функциями пациентов с БА и количеством синаптических контактов во взятых у них биопсиях мозга — чем сильнее выражены когнитивные нарушения у пациентов, тем большая потеря синаптических контактов между нейрональными клетками у них наблюдается [Dekosky ST 1990, Terry RD 1991]. Это открытие очень важно, так как именно оно позволило сделать вывод, что болезнь Альцгеймера — это не просто нейродегенеративное заболевание, при котором погибают нервные клетки головного мозга, а болезнь "синаптической потери". Это заключение дало толчок исследованиям развития БА в сторону изучения особенностей синаптических контактов, их образования и функционирования. В 1992 году нейробиолог Марк Маттсон показал, что в развитие БА вовлечен гомеостаз кальция [Mattson MP 1992]. Это открытие дало начало развитию самой молодой, но перспективной гипотезы патогенеза болезни Альцгеймера – «кальциевой гипотезе». К 2010 году накопилось много исследований, согласно которым дисрегуляция баланса кальция сопровождает развитие БА. Поэтому в современной нейробиологии появилось предположение, что именно нарушение кальциевого сигналинга может быть первопричиной, которая приводит к каскаду молекулярных нарушений в головном мозге, включая образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков.

В 2009 году И. Б. Безпрозванный предложил, что одну из важнейших ролей в патогенезе нейродегенеративных заболеваний играют изменения в нейрональной Ca^{2+} сигнализации, которые также наблюдается при нормальном старении [Bezprozvanny 2009]. Нейрональный кальций является одним из важнейших вторичных посредников в нейронах, который принимает непосредственное участие в синаптической передаче.

Нейроны очень чувствительны к внутриклеточному Ca^{2+} гомеостазу, поэтому даже самые малые аномалии в Ca^{2+} сигнализации могут привести к разрушительным последствиям в течение длительного периода времени. Нарушение механизмов кальциевого сигналинга является одним из самых ранних изменений на молекулярном уровне в этиологии БА. Было показано, что мутации в PSEN (белки пресенилины), ассоциированные с наследственной формой БА, опосредуют высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭР) либо непосредственно [Tu, Nelson et al. 2006, Supnet and Bezprozvanny 2011], либо путем модуляции кальциевых каналов ЭР [Kasri, Kocks et al. 2006, Wu, Yamaguchi et al. 2013, Shilling, Muller et al. 2014]. Одним из каналов, расположенных на мембране ЭР, является инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор (IP3R). Его функциональная активность повышается вследствие мутаций в PSEN [Shilling, Muller et al. 2014]. IP3R представляет собой внутриклеточный кальциевый канал, для которого существует три изоформы [Baker, Fan et al. 2017, Rossi and Taylor 2018]. Изоформа IP3R1 является изоформой, преимущественно экспрессирующейся в головном мозге. IP3R1-опосредованное высвобождение кальция регулируется несколькими посттрансляционными модификациями, и было идентифицировано более 100 различных белков-регуляторов данного процесса [Prole and Taylor 2016]. Из-за его повсеместной экспрессии, IP3R1-опосредованное высвобождение кальция участвует во многих клеточных процессах, таких как выживание клеток, апоптоз, аутофагия и многие другие [Yamazaki, Fujii et al. 2012, Ivanova,

Vervliet et al. 2014, Kania, Roest et al. 2017]. Важной частью этих процессов является «квази-синаптическая» передача кальциевого сигнала из ЭР в митохондрии посредством так называемых митохондриально-ассоциированных мембран ЭР (МАМ), через IP3R на стороне ЭР и по потенциал-зависимому анионному каналу и митохондриальному кальциевому унипортеру на митохондриальной стороне [Szymanski, Janikiewicz et al. 2017]. Трансфер кальция в митохондрии необходим в особенности для поддержания механизмов синтеза АТФ и в целом для нормального функционирования клеток [Bravo, Vicencio et al. 2011, MacVicar, Mannack et al. 2015]. Как повышение, так и понижение IP3R-опосредованного трансфера кальция в митохондрии приводят к их дисфункции и индуцируют клеточную гибель [Decuypere, Bultynck et al. 2011].

Функциональная активность IP3R во многом определяется белками-регуляторами. В недавних исследованиях научная группа под руководством Г. Балтынка продемонстрировала, что IP3R является мишенью анти-апоптотических белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), включая Bcl-2 и Bcl-XL [Rong, Bultynck et al. 2009, Monaco, Decrock et al. 2012]. Эти белки характеризуются четырьмя гомологичными доменами, причем третий (BH3) является ключевым для осуществления анти-апоптотической функции. Bcl-2/Bcl-XL посредством их гидрофобного кармана противодействует пермеабиллизации наружной митохондриальной мембраны путем скаффолдинга и нейтрализации про-апоптотических членов семейства Bcl-2, белков Bax и Bak, предотвращая их олигомеризацию и образование пор [Davids and Letai 2012].

Научная группа Г. Балтынка и другие исследователи установили, что Bcl-2 связывается и ингибирует IP3R через его четвертый домен BH (BH4) [Rong, Bultynck et al. 2009, Monaco, Decrock et al. 2012]. Кроме того, белки семейства Bcl-2 также ассоциированы с БА. Гиперэкспрессия белка Bcl-2 в головном мозге на модели трансгенных мышей с БА замедляла прогрессирование когнитивных нарушений, в то время как образование внеклеточных бляшек уменьшалось [Rohn, Vyas et al. 2008]. Подводя итог вышеизложенному, можно заключить, что мутации в PSEN, ассоциированные с наследственной формой БА, влияют на внутриклеточную передачу кальций-зависимых сигналов, которые опосредуют эти дефекты. В этом проекте мы впервые исследуем, может ли Bcl-2 и/или его домен BH4 нормализовать чрезмерное IP3R-опосредованное высвобождение кальция из ЭР, вызванное мутациями, ассоциированными с наследственной формой БА.

Цели и задачи. Подтверждение гипотезы о том, что нормализация кальциевого выброса из ЭР через IP3R, осуществляемая через белок - регулятор апоптоза Bcl-2 (В-клеточной лимфомы-2), может оказывать благоприятное воздействие на некоторые ранние патологические аспекты функционирования клеток, наблюдаемые при развитии БА, является **целью** данного исследования. Для достижения цели сформулированы и решены следующие научные **задачи**:

1. Проанализировать стабильность исследуемых белков семейства Bcl-2.
2. Подтвердить формирование белкового комплекса между белками Bcl-2 и каналами выброса кальция из эндоплазматического ретикулула *in vivo* на мышинной модели БА.
3. Выяснить, влияет ли Bcl-2-опосредованная регуляция кальциевого выброса из эндоплазматического ретикулула на морфологию синапсов.
4. Установить влияние Bcl-2-опосредованной регуляции кальциевого выброса из

эндоплазматического ретикулула на накопление амилоидных бляшек в мышинной модели БА.

5. Разработать доступный качественный отечественный программный продукт для осуществления исследования с использованием «Водного лабиринта Морриса», апробировать его в лабораторных условиях и сравнить результаты с двумя из самых популярных коммерческих продуктов.

6. Выявить воздействие Vcl-2-опосредованной регуляции кальциевого выброса из эндоплазматического ретикулула в нейронах гиппокампа на когнитивные функции у мышей с патологией БА с использованием разработанного ПО.

Научная новизна. В рамках данного проекта впервые было рассмотрено в качестве терапевтической стратегии для лечения БА ингибирование IP3R-опосредованного чрезмерного выброса кальция из эндоплазматического ретикулула, вызываемого мутациями при наследственной форме БА. Для оценки нейропротекторных свойств в рамках данной терапевтической стратегии оценивались ранние признаки БА, которые, в свою очередь, могут влиять на более поздние аспекты течения заболевания. Интересным преимуществом использования Vcl-2 в качестве ингибитора IP3R-опосредованного высвобождения кальция является анти-апоптотические свойства белка Vcl-2 в качестве ингибитора про-апоптотических белков Bax и Bak, которые в значительной степени не зависят от функциональной активности IP3R.

Таким образом, Vcl-2 может играть двойную роль, выступая, во-первых, в качестве ингибитора IP3R-опосредованного высвобождения кальция, и, во-вторых, в качестве ингибитора Bax/Bak-опосредованного апоптоза в клетках при развитии БА.

Это первое исследование, посвященное способности Vcl-2 ингибировать избыточную передачу кальциевых сигналов, опосредованную IP3R, наблюдаемую при патогенезе БА.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты, полученные в данной работе, о молекулярных механизмах нейрональных клеток обладают высокой научной значимостью для понимания фундаментальных вопросов современной нейробиологии, таких как исследования кальциевой регуляции, стабильности синаптических контактов, механизмов формирования памяти и нарушений, наблюдаемых при болезни Альцгеймера. Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушения гомеостаза кальция могут являться первопричиной развития симптомов БА. Практическая значимость результатов исследования заключается в обнаружении возможной мишени для развития терапевтических подходов для лечения и/или замедления развития БА. Рассмотрен новый молекулярный путь, который может также стать ключевым в разработке терапии БА. Данные работы дают основание предположить, что сверхэкспрессия Vcl-2 имеет множественные нейропротекторные эффекты в моделях БА, которые могут выходить далеко за рамки его канонических анти-апоптотических эффектов. Воздействуя на внутриклеточные каналы высвобождения Ca^{2+} , ВН4 домен Vcl-2 белка может ингибировать избыточное IP3R/RyR-опосредованное высвобождение кальция из ЭР. Эти результаты позволяют предположить, что анти-апоптотические домены Vcl-2 и производные белковые домены, такие как домен ВН4, могут иметь терапевтический потенциал для предотвращения начала БА и задержки нейродегенерации. Кроме того, значимость результатов работы выходит за рамки понимания механизмов патологии болезни Альцгеймера –

обнаруженный молекулярный путь имеет важное значение для других нейродегенеративных заболеваний, в который происходит нарушение кальциевого гомеостаза, для понимания общих процессов старения и формирования памяти и работы сигнальных механизмов нейрональных клеток.

Важное практическое значение имеет разработанный в данном исследовании программный продукт *Minorontikos*. Программа позволяет быстро и качественно обрабатывать данные эксперимента «Водный лабиринт Морриса», выдавая такие параметры, как латентное время поиска, время и процентное время в квадрантах интереса, длина пройденного пути, ошибка углового направления, средняя близость к платформе (или Близость Галлахера, индекс обучения) и число пересечений зоны интереса. Кроме того, одним из выходных файлов является сводная таблица параметров X-Y-T, где X и Y – это координаты местоположения испытуемого животного, T – время, поэтому при необходимости все дополнительные функции положения-времени (а все параметры трассировки объекта являются данными функциями) пользователь может вывести или проверить самостоятельно. Разработанное программное обеспечение *Minorontikos* имеет вид полноценной автономной и самостоятельной программы, не требующей установки дополнительного ПО или плагинов. Это обеспечивает ее свободное использование другими исследователями по всему миру.

Методология и методы исследования. Для выполнения поставленных в данном исследовании задач применялись следующие методы: биоинформатический метод анализа молекулярной динамики, билатеральная стереотаксическая операция с использованием аденоассоциированных вирусов (инжектирование), иммунопреципитация, Вестерн-Блот анализ, иммуногистохимическое окрашивание и HCl-метод поиска антигена, транскраниальная перфузия, конфокальная микроскопия и отработанный протокол проведения «Водного лабиринта Морриса». Для получения качественных и объективных результатов проведения поведенческих тестов в ходе данной работы был разработан доступный качественный отечественный программный продукт «*Minorontikos*», апробирован в лабораторных условиях и сравнен с двумя из самых популярных коммерческих продуктов – *VideoMot* компании TSE Systems и *EthoVision* разработки Noldus. Для разработки *Minorontikos* были использованы языки программирования Rust и C++.

Личный вклад автора. Основные результаты данного исследования получены лично автором с использованием экспериментальной базы Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого. Планирование экспериментов и обсуждение полученных результатов проводилось совместно с научным руководителем д.б.н. И.Б. Безпрозванным. Разработка технического задания ПО для автоматизации поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса» осуществлялось совместно с сотрудниками лаборатории Промышленных систем потоковой обработки данных Санкт-Петербургского государственного политехнического университета Петра Великого Зориным Арсением Геннадьевичем и Болсуновской Мариной Владимировной. Написание программного кода *Minorontikos* было выполнено Зориным Арсением Геннадьевичем. Обработка, статистический анализ и подготовка результатов к публикациям проводилась лично автором, тексты публикаций подготавливались совместно с соавторами

Положения, выносимые на защиту:

1. В *in vivo* условиях в гиппокампальных нейронах белок Vcl-2 взаимодействует с белками-проводниками кальциевого выхода из эндоплазматического ретикулаума – каналами IP3R1 и RyR2, мутантная же форма Vcl-2^{K17D} стабильно взаимодействует только с RyR2, а ее сродство с IP3R1 значительно снижено.

2. Интерфейс и функционал программы Minorontikos, разработанной для анализа поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса», в рамках данного исследования соответствует по удобству использования и функциональным возможностям таким популярным коммерческим продуктам, как программы VideoMot и EthoVision.

3. Гиперэкспрессия и нативной, и мутантной формы Vcl-2 белка в CA1 области гиппокампа на ранних стадиях способствует предотвращению синаптотоксического эффекта у мышей трансгенной линии 5xFAD в более зрелом возрасте. Однако только экспрессия мутантной формы Vcl-2^{K17D} обладает амилоид-протекторными свойствами и улучшает когнитивные функции 5xFAD мышей.

Достоверность результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается их согласованностью, использованием комплекса современных взаимодополняющих нейробиологических методов исследования, анализа и статистической обработки полученных результатов при помощи t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна-Уитни, однофакторного дисперсионного анализа и критерия Краскела-Уоллиса, а также сравнением полученных данных с имеющимися на данный момент литературными источниками.

Апробация результатов диссертационного исследования. На разработанное в диссертационном исследовании программное обеспечение получено Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2020619187 «Программа автоматизации исследования прохождения водного лабиринта Морриса» от 13 августа 2020 года (авторы Зорин А.Г., Болсуновская М.В., Чернюк Д.П., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б.). Результаты исследования докладывались: на XVI Всероссийской конференции с международным участием «СОВЕЩАНИЕ ПО ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ имени академика Л.А. Орбели» 19-22 октября 2020 года, Санкт-Петербург, Россия; на конференции с международным участием «Эколого-биологическое благополучие флоры и фауны» (EBWFF-2020) 23-24 сентября 2020 года, Благовещенск, Россия; на конференции Российского Нейрохимического Общества «RUSNEUROCHEM» 22-24 мая 2022 года, Санкт-Петербург. По материалам работы написано 3 научных статьи, индексируемых в базах данных РИНЦ, Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, описания полученных результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и списка литературы. Текст диссертации изложен на 108 страницах, содержит 1 таблицу, иллюстрирован 29 рисунками. Список литературы содержит 169 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Стабильность белковых молекул Bcl-2 и Bcl-2^{K17D}

Для проверки эффекта специфического связывания белка Bcl-2 именно с IP3R рецептором, а не двойного ингибирования IP3R и RyR, согласно литературным данным, была выбрана мутация K17D. Однако информация о стабильности молекулы белка Bcl-2 с этой мутацией не была обнаружена. Поэтому прежде, чем использовать вирусные вектора для гиперэкспрессии белков интереса *in vivo*, было принято решение проверить и сравнить молекулярную стабильность нативной формы Bcl-2 белка и его мутантной формы Bcl-2^{K17D} при помощи биоинформатических методов.

Релаксация сконструированной модели белка Bcl-2^{K17D} методом молекулярной динамики (МД) в водном окружении в течение 100 нс не выявила нестабильности третичной структуры глобулы белка, и компактная глобулярная структура сохраняется в течение всего времени моделирования МД (Рисунок 1). Усредненная величина среднеквадратичных флуктуаций (RMSD) атомов C α основной цепи укладывается в диапазон 2.5 Å (Рисунок 1B), и это немного выше, чем у молекулы Bcl-2 дикого типа.

Наибольшие изменения в положении молекулы Bcl-2^{K17D} произошли на участке свободной петли, в перестройке и изменении пространственного положения $\alpha 2$ и $\alpha 3$ спиралей и развороте аминокислотного остатка Аргинина R44 (Рисунок 1А, Б). Таким образом замена 17 аминокислоты с положительно заряженного Лизина на отрицательно заряженную Аспарагиновую кислоту, находящуюся в ВН4 домене, приводит к конформационным изменениям $\alpha 2$ и $\alpha 3$ спирали, в том числе развороту положительно заряженного Arg-44, находящегося в ВН3 домене, который, как известно из литературных данных, ответственен за анти-апоптотические свойства Bcl-2 белка [Chipuk, Moldoveanu et al. 2010].

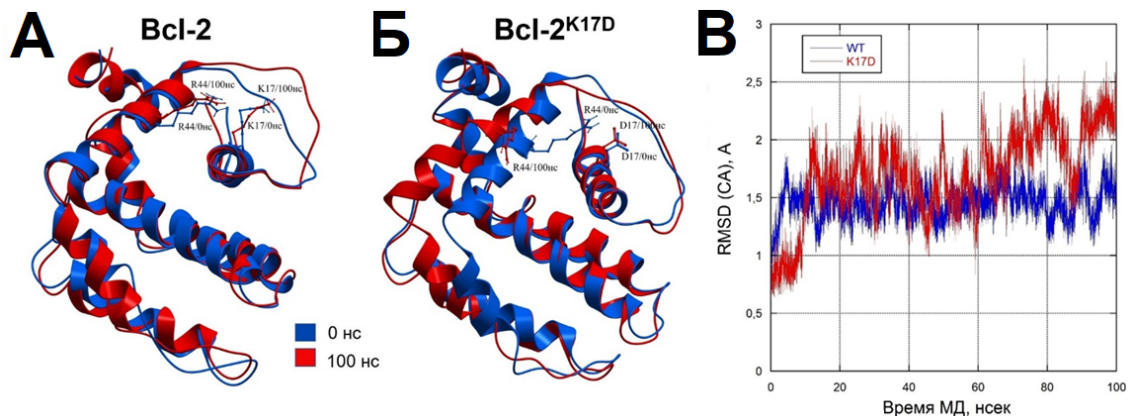


Рисунок 1 – Анализ конформационной стабильности Bcl-2 белков. Подвижность третичной структуры моделей белков Bcl-2 (А) и Bcl-2^{K17D} (Б). Синим цветом обозначены структуры в начальный момент времени МД (0 нс), красным – в конце анализа (100 нс). Отдельно показаны аминокислотные остатки R44, K17 (у Bcl-2) и D17 (у Bcl-2^{K17D}). В) Среднеквадратичное отклонение положений атомов (RMSD) C α основных цепей молекулярных моделей белков Bcl-2 нативной формы (дикого типа, WT) и Bcl-2^{K17D} с мутацией (K17D).

Таким образом, *in silico* эксперименты показали, что мутация K17D может повлиять на пространственное положение домена ВН3 и, соответственно, на анти-апоптотические функции и

активацию Вах и Ваk белков [Brunelle and Letai 2009, Del Gaizo Moore and Letai 2013, Callens, Kraskovskaya et al. 2021]. При наличии мутации K17D из-за замены положительно заряженной а.к. на отрицательно заряженную могут также произойти изменения, которые не были выявлены нами за период в 100 нс, однако первые наши эксперименты свидетельствуют о том, что несмотря на изменения положений некоторых участков молекулы, ее вторичная глобулярная структура остается стабильной.

2. Взаимодействие белков Bcl-2 и Bcl-2^{K17D} с IP3R1 и RyR2.

Для того, чтобы перейти в экспериментах на *in vivo* уровень исследования, т.е. экспрессировать белки Bcl-2 и Bcl-2^{K17D} в CA1 зоне гиппокампа 5xFAD мышиной модели болезни Альцгеймера, было необходимо сконструировать рабочие вирусные вектора, кодирующие Bcl-2 и Bcl-2^{K17D}, связанные с mCherry-флуоресцентной меткой. Решить эту задачу помогли коллеги Балтынк Гирт и Тим Вервлит из Лаборатории молекулярной и клеточной сигнализации Католического Университета. Они сконструировали 3 аденоассоциированных вируса AAV-mCherry, AAV-3xFLAG-Bcl-2 и AAV-3xFLAG-Bcl-2K17D. Для дальнейших экспериментов были выбраны следующие дозы при стереотаксических операциях 1 мкл для AAV-3xFLAG-Bcl-2 при 6.63E+11 вч/мл, 0.6 мкл для AAV-3xFLAG-Bcl-2K17D при 1.20E+12 вч/мл и 0.5 мкл для AAV-mCherry при 3.15E+12 вч/мл.

Связывание белков Bcl-2-WT и Bcl-2K17D с белками IP3R1 и RyR2 определяли при помощи ко-иммунопреципитации и Вестерн-Блот анализа с образцами мышей линии 5xFAD, инжестированными аденоассоциированными вирусами, кодирующими белок Bcl-2 дикого типа и мутантную форму Bcl-2K17D (Рисунок 2).

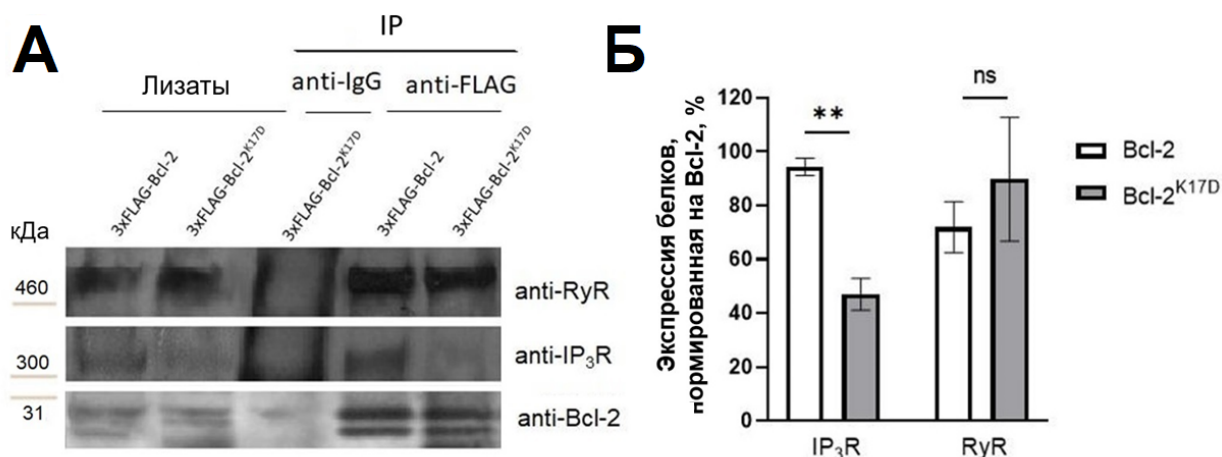


Рисунок 2 – Результаты ко-иммунопреципитации IP3R1 и RyR2 из лизата гиппокампа взрослых мышей антителами к белку Bcl-2. А) Вестерн-Блот анализ иммунопреципитации IP3R1 и RyR2 из лизатов гиппокампа мышей линии 5xFAD, инжестированных адено-ассоциированными вирусами, кодирующим белки Bcl-2 дикого типа и его мутантную форму Bcl-2^{K17D}. Шкала слева – примерная молекулярная масса (кДа). Б) Гистограмма относительной экспрессии белков IP3R1 и RyR2, нормализованной по уровню экспрессии Bcl-2 белка. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка. Эксперимент повторяли 3 раза, ns – нет статистической значимой разницы, ** p<0.005.

На рисунке 2А представлен репрезентативный снимок эксперимента, а на рисунке 2Б показан количественный анализ трех независимых экспериментов. 3xFLAG-Bcl-2 и 3xFLAG-Bcl-2^{K17D} подвергали иммунопреципитации с использованием антител anti-FLAG, а присутствие IP3R1 и RyR2 в иммунопреципитированном образце определяли с помощью иммуноблоттинга. В каждом эксперименте в качестве входной нагрузки использовалась часть образца, а именно 1/15 клеточного лизата. На рисунке 2А показан образец сверхэкспрессии 3xFLAG-Bcl-2K17D в качестве контрольного совместного IP с anti-IgG.

Наличие полосы в пробе на уровне 320 кДа, соответствующего молекулярной массе IP3R1, свидетельствует о взаимодействии белков IP3R1 и Bcl-2 дикого типа (Рисунок 2). О взаимодействии белков Bcl-2 и RyR2 свидетельствует наличие полосы в пробе на уровне 550 кДа.

Таким образом, подтвердилось, что Bcl-2 связывается и с IP3R1, и с RyR2, а мутантная форма Bcl-2^{K17D} хорошо взаимодействует с RyR2 и намного хуже с IP3R1. Это согласуется с ранее полученными данными бельгийской команды ученых [Rong, Bultynck et al. 2009, Davids and Letai 2012, Monaco, Decrock et al. 2012]. Ими было выявлено, что сайт связывания белка Bcl-2 на IP3R1 обладает сильной гомологией с рианодиновыми рецепторами, и добавление ВН4 домена белка Bcl-2 способно сократить RyR-зависимый кальциевый выход из ЭР [Vervliet, Decrock et al. 2014].

3. Анализ морфологии дендритных шипиков в гиппокампе мышей линии 5xFAD после гиперэкспрессии белков Bcl-2.

Так как болезнь Альцгеймера – это заболевание синаптической потери, следующим этапом данного исследования стала проверка влияния экспрессии белков Bcl-2 на стабильность синаптических контактов. Для этого трансгенная линия мышей 5xFAD была скрещена с М-линией мышей на той же породе. Таким образом мы вывели группу мышей 5xFAD-М с наследственной формой БА, у которой 1-3% нейронов экспрессируют зеленый флуоресцентный белок (GFP). Это позволило нам упростить визуализацию морфологии нейрональных клеток.

Анализ морфологии дендритных шипиков происходил на шестимесячных мышках 5xFAD-М и WT-М. На рисунке 3 представлены репрезентативные конфокальные снимки из каждой экспериментальной группы (А), а также параметры для анализа стабильности синаптических контактов – это среднее число дендритных шипиков на вторичном дендрите длиной 10 мкм (Б) и процентное число грибовидных (В), пеньковых (Г) и тонких (Д) дендритных шипиков для каждой из исследуемых групп.

Согласно полученным данным между контрольными мышками М-line и 5xFAD-М, инжектированных AAV2/7-Cherry вирусом, существует статистически значимая разница в процентном соотношении грибовидных и пеньковых шипиков, а также в плотности дендритных шипиков. Данный результат согласуется с литературными данными [Dorostkar, Zou et al. 2015] и неоднократно был подтвержден исследованиями нашей лаборатории [Khavinson, Ilina et al. 2021].

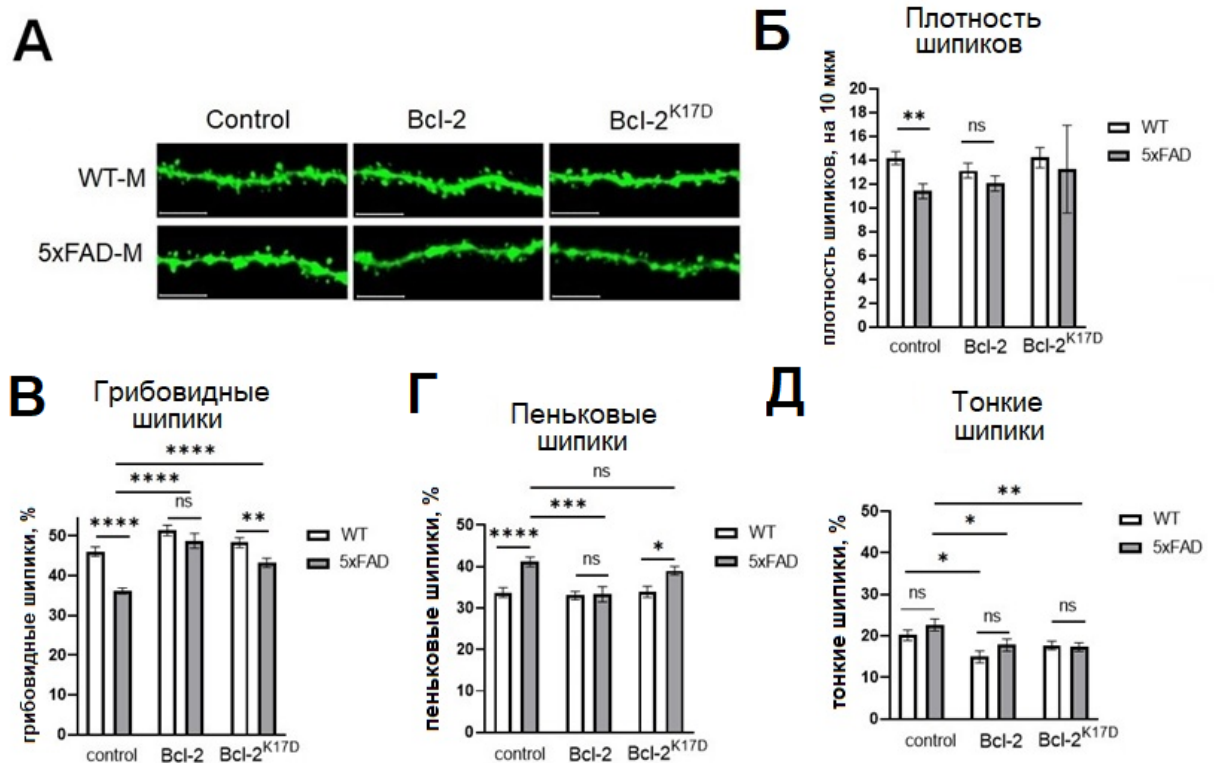


Рисунок 3 – Результаты анализа морфологии дендритных шипиков на срезах гиппокампа мышей дикого типа (WT-M) и мышей линии 5xFAD-M в возрасте 6 месяцев, инжестрированных контрольным вирусом (Control), Bcl-2, Bcl-2^{K17D}. А) Репрезентативные снимки дендритных шипиков в экспериментальных группах. Б, В, Г, Д) Гистограммы, иллюстрирующие плотность шипиков и процентные соотношения грибовидных, пеньковых и тонких шипиков в экспериментальных группах. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n=21$ для каждой группы, ns – нет статистической значимой разницы, ** $p<0.005$ и **** $p<0.0001$.

После инжестрирования Bcl-2 вируса мышам WT-M не наблюдалось изменений в морфологии дендритов, кроме снижения процента тонких шипиков. У мышей же 5xFAD-M наблюдались значительные изменения в виде увеличения процента грибовидных шипиков, уменьшения процента пеньковых и тонких шипиков. При этом в группах Bcl-2 дикого типа ни в одном из параметров нет разницы между WT-M и 5xFAD-M мышами. После инжестрирования Bcl-2^{K17D} вируса мышам WT-M не наблюдалось значительных изменений в морфологии дендритных шипиков. У мышей 5xFAD-M после инжестрирования вируса Bcl-2^{K17D} наблюдалось увеличение числа грибовидных шипиков и значительное снижение числа тонких шипиков. Изменений процентности пеньковых шипиков и плотности шипов в этой группе обнаружено не было, однако наблюдался сильный разброс данных в плотности шипиков. Кроме того, в группах инжестрированных Bcl-2^{K17D}, как и в группах, инжестрированных контрольным вирусом, сохраняется разница между WT-M и 5xFAD-M мышами в процентном соотношении числа грибовидных и пеньковых шипиков. Исходя из полученных, результатов можно сделать следующий вывод: гиперэкспрессия Bcl-2 в CA1 области гиппокампа на ранних стадиях развития мышей трансгенной линии 5xFAD способствует предотвращению синаптотоксического эффекта в нейронах гиппокампа в более зрелом возрасте. Происходит значительное увеличение

процентного соотношения грибовидных шипиков и снижение пеньковых шипиков до уровня, наблюдаемого у здоровых мышей. Несмотря на то, что гиперэкспрессия мутантной формы белка Bcl-2 тоже имеет положительный эффект на процентное соотношение грибовидных и пеньковых шипиков, она не может привести к улучшению морфологии дендритных шипиков в мышцах 5xFAD-M до уровня здоровых мышей.

4. Анализ числа амилоидных бляшек в мозге 5xFAD мышей после гиперэкспрессии белков Bcl-2.

Основной «визитной карточкой» болезни Альцгеймера до сих пор считается наличие амилоидных скоплений в головном мозге. Мышиная модель 5xFAD является одной из самых агрессивных моделей с НБА, фенотип которой проявляется в 6-9 месяцев, а скопление амилоидных бляшек можно зарегистрировать начиная с 4-х месячного возраста. Поэтому следующим экспериментом в ходе выполнения данной работы стал анализ числа амилоидных бляшек в мозге 5xFAD мышей после инъецирования вирусными векторами с целью гиперэкспрессии Bcl-2 белков. Таким образом, мы проверили влияние Bcl-2-опосредованного ингибирования IP3R (в случае экспрессии Bcl-2^{K17D}) или совместного ингибирования IP3R и RyR (в случае экспрессии Bcl-2) на амилоидогенез.

Подсчет числа амилоидных бляшек происходил на срезах мозга толщиной 100 мкм, сделанных на мышцах 5xFAD и WT в возрасте 6 месяцев, которым в 3,5 месяца инъецировались контрольный, Bcl-2 или Bcl-2^{K17D} вирусы. Для расчета были выбраны 3 зоны - CA1 и CA3 области гиппокампа и область коры, находящаяся латерально над CA1. Для каждой группы в эксперименте участвовали 3 мыши, с каждой мыши было отснято билатерально по 3 среза, суммарно в каждой группе для каждой зоны n=18. По результатам этого эксперимента стало очевидно, что подсчет амилоидных бляшек в CA3 зоне гиппокампа не отображает очевидные особенности трансгенной линии 5xFAD, что согласуется с нашими предыдущими исследованиями [Chernyuk, Vlasova et al. 2016], после чего было решено учитывать только области CA1 гиппокампа и коры. Количественный анализ площади, занимаемой амилоидными бляшками, в каждой из выбранных зон представлен на рисунке 4.

Результаты показали, что гиперэкспрессия белка Bcl-2 дикого типа не снижает число амилоидных бляшек в мозге 5xFAD ни в CA1 зоне гиппокампа, ни в коре. Зато после инъецирования вирусом, кодирующим мутантную форму Bcl-2^{K17D}, в обеих исследуемых зонах произошло значительное сокращение числа амилоидных бляшек в обеих анализируемых зонах.

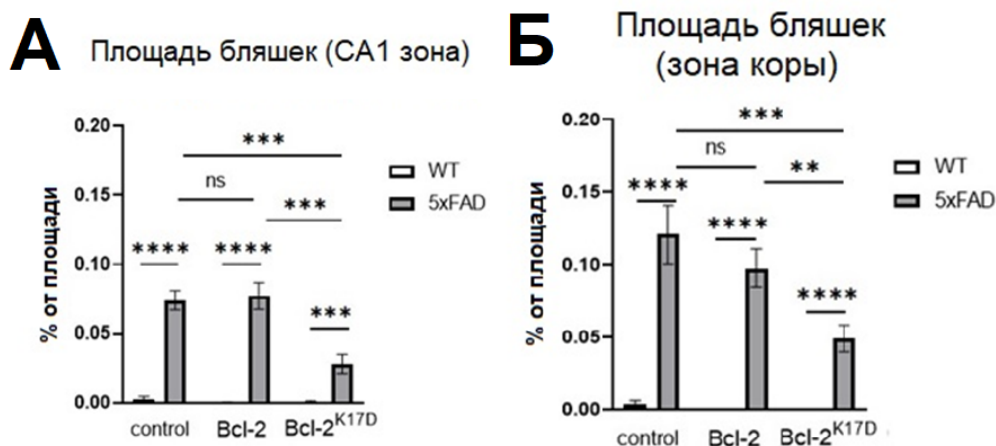


Рисунок 4 – Результат подсчета числа амилоидных бляшек в области CA1 гиппокампа (А) и в зоне коры (Б) WT и 5xFAD мышей, инжестированных контрольным, Bcl-2 и Bcl-2^{K17D} вирусами. Гистограммы процента площади, занимаемой бляшками, от общей анализируемой площади во всех экспериментальных группах. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка. n=18, ns – нет статистической значимой разницы, *** p<0.0005, **** p<0.0001.

Из полученных данных можно сделать вывод, что гиперэкспрессия нативного белка Bcl-2 не обладает амилоид-протекторными свойствами, в отличие от его мутантной формы Bcl-2^{K17D}. Несколько исследовательских групп указывали на роль RyR в нарушении регуляции передачи сигналов Ca²⁺, поскольку нейрональная экспрессия RyR была увеличена в различных мышиных моделях БА и клеточных линиях [Chan, Mayne et al. 2000, Bruno, Huang et al. 2011, Chakroborty, Briggs et al. 2012, Bussiere, Lacampagne et al. 2017, Lacampagne, Liu et al. 2017]. Сообщалось, что лечение Дантроленом, ингибитором RyR, нормализует нарушенную передачу кальциевых сигналов в ЭР и уменьшает отложения Aβ [Chakroborty, Briggs et al. 2012]. Эти данные также согласуются с полученными нами результатами, и мы можем выдвинуть предположение, что на 5xFAD мышью модели болезни Альцгеймера ингибирование только RyR2-зависимого кальциевого выхода из ЭР приводит к большему терапевтическому эффекту, нежели блокировка и RyR2, и IP3R1 каналов. Мы можем также заключить, что на уровне морфологии нейронов лучшие синаптопротекторные свойства показывает именно нативная форма белка Bcl-2, однако при анализе эффекта на основной физиологический признак БА, амилоидные бляшки, наилучшим кандидатом в терапевтические агенты является мутантная форма Bcl-2^{K17D}. На уровне синаптических контактов, блокировка двух каналов кальциевого выхода из ЭР является достаточной для сокращения дефектов при БА, но на тканевом уровне, возможно, положительный синаптопротекторный эффект нивелируется остальными функциями нативной формы Bcl-2.

5. Minopontikos

Так как для реализации последнего из запланированных экспериментов по анализу эффекта Bcl-2-опосредованного ингибирования кальциевого выхода из ЭР на когнитивные функции 5xFAD мышью модели БА возникла необходимость создания собственного программного

продукта для автоматизированного анализа результатов поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса» (MWM), эта часть работы была сделана совместно с программистами СПбПУ.

Нами была разработана и реализована программа Minorontikos, способная информативно и качественно обрабатывать результаты проведения теста Водный лабиринт Морриса. Лаконичный интерфейс программы представлен на рисунке 5.

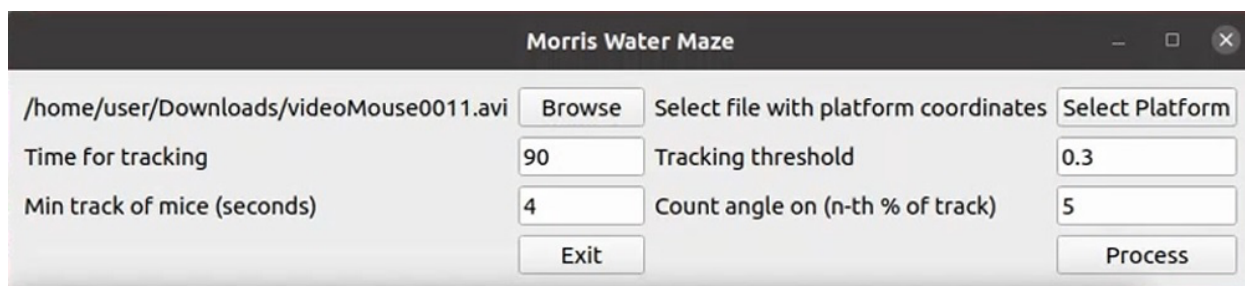


Рисунок 5 – Интерфейс программы Minorontikos. «Browse» – загрузка видеофайла, «Select Platform» – возможность загрузить координаты и размеры положения платформы, сделанной в предыдущих экспериментах, «Time for tracking» – задаваемое время эксперимента, «Tracking threshold» – порог отслеживания объекта, «Min track of mice» – время минимального отслеживаемого трека, «Count angle on» - % от длины отслеживаемого трека для расчета угловой ошибки.

Процесс обработки заключается в нахождении, отслеживании и регистрации проделанного мышью пути, во время которого окно программы выводит на экран видео со всеми зонами-интереса, отслеживаемым животным и его траекторией (Рисунок 6).

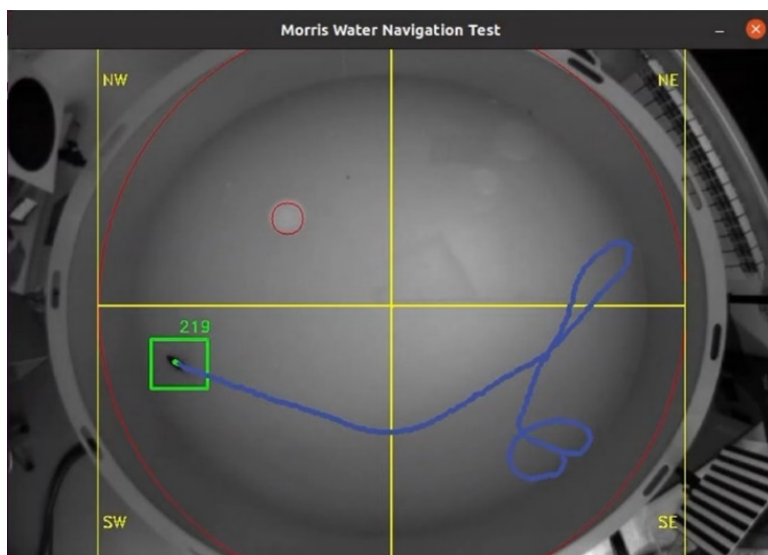


Рисунок 6 – Снимок (стоп-кадр) окна программы Minorontikos во время процесса обработки

В качестве выходных данных для каждого эксперимента программа создает отдельную подпапку в директории самого видео, в которой содержатся следующие файлы: видео файл процесса обработки (Рисунок 6), иллюстрация траектории движения грызуна со всеми зонами интереса, текстовый файл с перечнем всех посчитанных параметров после обработки, таблица X-Y-T параметров для каждого кадра экспериментального видео файла, где X-Y – координаты положения грызуна, T – время. Параметры, которые обсчитывает Minorontikos:

1. Латентное время поиска платформы (латентное время) – время, за которое подопытное животное находит платформу.
2. Время (в кадрах и секундах) и процентное время плавания в квадрантах – время плавания грызуна в воображаемых квадрантах, где может находиться (или находилась) спрятанная платформа.
3. Количество пересечений зоны платформы – количество пересечений подопытным животным зоны, где находится (или ранее находилась) платформа.
4. Средняя близость (индекс обучения или близость Галлахера) – средняя мера близости, которая опирается на постоянную оценку расстояния между местоположением платформы и животным.
5. Общая длина траектории, проделанной животным.
6. Средняя скорость движения.
7. Ошибка углового направления (угловая ошибка) – величина отклонения угла между ориентацией животного в определенной точке своего плавания в бассейне и прямым путем начала движения животного к платформе.

В ходе выполнения данного исследования, было налажено проведение поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». Сконструирована экспериментальная установка, соответствующая всем требованиям проведения поведенческих тестов. Стандартный протокол был апробирован на мышах линии 5xFAD с наследственной формой болезни Альцгеймера (данные не показаны). Результаты проведения теста и их анализ при помощи разработанного ПО Minopontikos соответствуют фенотипическим характеристикам 5xFAD трансгенной линии мышей, которые согласуются с многочисленными литературными данными [Bryan, Lee et al. 2009, Bromley-Brits, Deng et al. 2011, Edwards, Hamlin et al. 2014, Flanigan, Xue et al. 2014].

Для сравнительного анализа объективности функционирования разработанного в данном исследовании ПО (Minopontikos) было выбрано 30 видеофайлов из эксперимента MWM с 10 трансгенными мышами 5xFAD – четвертое испытание каждой из подопытных мышей за первый день обучения (10шт), за последний день обучения (10шт) и тестовое испытание, проводимое на пятый день (10шт).

Параметрами для сравнения с коммерческими программами VideoMot и EthoVision были выбраны латентное время поиска платформы, процентное время нахождения в квадранте интереса, где находилась платформа, угловая ошибка поиска и количество пересечений зоны интереса, где ранее была размещена платформа (для тестового испытания). Результаты обсчёта всех трёх программ представлены в таблице 1.

Дисперсионный анализ результатов обсчёта одних и тех же видеофайлов с эксперимента MWM в трех программах выявил незначительные различия для двух ключевых параметров – латентного времени поиска платформы и процентного времени нахождения в квадранте интереса. Для латентного времени поиска в первый день обучения $p=0,994$, $F=0,006$, в последний – $p=0,869$, $F=0,141$ (тест Брауна-Форсайта). Тест Краскела-Уоллиса для первого дня обучения $p=0,915$, для последнего – $p=0,646$. Для процентного времени нахождения в квадранте интереса в первый, последний день обучения и в тестовый день результаты следующие: $p=0,958$ ($F=0,043$), $p=0,295$ ($F=1,278$), $p=0,171$ ($F=1,888$) по тесту Брауна-Форсайта, и $p=0,716$, $p=0,200$, $p=0,147$ по

тесту Краскела-Уоллиса. Данные статистической обработки позволяют сделать вывод, что различия при подсчете процентного времени во всех трёх программах незначительны, как и для латентного времени поиска платформы.

Таблица 1 – Средние величины значений параметров (\pm стандартные ошибки), полученные с использованием трех разных программ. Статистически значимые различия между значениями параметров по критерию Брауна-Форсайта при $p < 0.05$ выделены жирным шрифтом.

Параметры	Результаты обсчета параметров, среднее \pm стандартная ошибка		
	Программы		
	VideoMot	EthoVision	Minopontikos
Латентное время поиска платформы в первый день обучения	64,29 \pm 11,16	63,22 \pm 11,70	64,95 \pm 11,20
Латентное время поиска платформы в последний день обучения	57,10 \pm 8,43	63,05 \pm 9,56	57,69 \pm 8,12
Процентное время нахождения в квадранте интереса в первый день обучения	35,46 \pm 9,50	33,67 \pm 8,88	31,55 \pm 9,85
Процентное время нахождения в квадранте интереса в последний день обучения	25,46 \pm 2,87	28,73 \pm 3,15	21,95 \pm 2,97
Процентное время нахождения в квадранте интереса в тестовый день	21,48 \pm 3,34	20,54 \pm 3,15	13,67 \pm 2,80
Угловая ошибка поиска в первый день обучения	34,20\pm17,84	7,13\pm28,18	39,62\pm6,68
Угловая ошибка поиска в последний день обучения	6,70\pm27,93	18,65\pm26,15	43,45\pm10,84
Угловая ошибка поиска в тестовый день	1,25\pm15,10	34,04\pm28,14	35,47\pm11,95
Количество пересечений зоны интереса в тестовый день	0,9\pm0,31	-	1,10\pm0,41

Распределения значений латентного времени поиска мышами платформы и процентного времени в квадранте интереса представлены на рисунке 7.

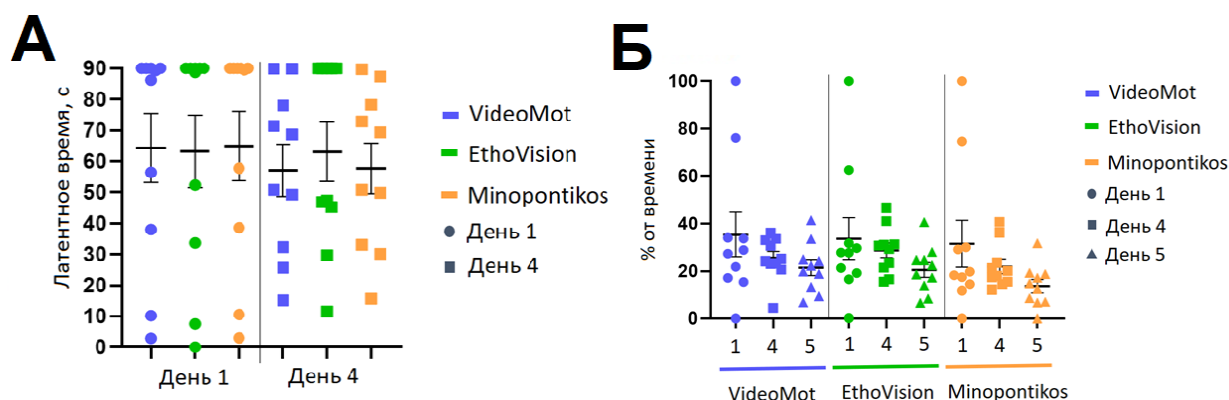


Рисунок 7 – Графики параметров латентного времени поиска скрытой платформы (А) в первый и последний день обучения, День 1 и День 4, соответственно, и процентного времени плавания в одном из квадрантов бассейна (Б) в первый и последний день обучения, День 1 (1) и День 4 (4), соответственно, и в тестовый день, День 5 (5), рассчитанные в трех разных программах: VideoMot (выделено синим), EthoVision (зеленым) и Minopontikos (оранжевым). Результаты представлены как индивидуальные значения и среднее \pm стандартная ошибка.

Расчет параметра угловой ошибки выявил значительное различие результатов всех трёх программ, тест Брауна-Форсайта показал $p=0,0002$ ($F=9,247$). Анализ принципа работы программ показал, что вычисление угловой ошибки во всех программах происходит различными подходами. Так в программе VideoMot угол считывается между двумя прямыми, соединяющими три точки – платформу, начальное положение животного и положение, которое занимает животное через 10 см пути (количество см можно менять), Minorontikos за третью точку берет положение животного через 5% от всего пройденного пути (процент также можно менять). Так как скорость передвижения и длина траектории за одно и тоже время у экспериментальных мышей могут сильно различаться и зависят от индивидуальных особенностей животного, параметр в процентах от всего пройденного пути выглядит более объективным, чем конкретное расстояние.

Кроме процентного времени нахождения в квадранте интереса для тестового испытания было подсчитано количество пересечений зоны интереса, где при обучении находилась платформа. Данный параметр был нами обнаружен в программе VideoMot, но не в EthoVision. При сравнении результатов обсчета VideoMot и Minorontikos, тест Левена показал $p=0,042$ ($F=4.261$), была выявлена разница только при обсчете двух видео, для которых количество пересечений в VideoMot равно 3 и 1, а в Minorontikos – 4 и 0, соответственно.

Таким образом, наиболее стабильным параметром для вычисления во всех трёх программах является латентное время поиска платформы, более того, при более детальном статистическом анализе выявилось, что результаты двух коммерческих продуктов между собой отличаются сильнее, чем результат обсчета нашей программы с каждой из них по отдельности. Также критических различий не обнаружилось и при высчитывании процентного времени нахождения в квадранте интереса. Сравнительный анализ числа пересечений зоны интереса в данном исследовании стал возможен только между Minorontikos и VideoMot. Траектории, детектируемые двумя программами, являются практически идентичными, а разница в количестве пересечений обусловлена точностью выбора зоны, где ранее находилась платформа. В Minorontikos, как и в VideoMot, есть возможность использовать ранее сохраненную зону интереса (например, из видео, снятых в обучающих сессиях), которое до этого было выбрано пользователем вручную. А значит, положение выделенной зоны зависит только от человека, использующего программу.

Таким образом, мы разработали качественное и удобное программное обеспечение, которое помогло решить последнюю из поставленных в данном исследовании задачу – анализ влияния Vcl-2-опосредованной блокировки выхода кальция из ЭР на когнитивные функции 5xFAD мышей.

6. Когнитивные функции 5xFAD мышей после гиперэкспрессии белков Vcl-2.

Для анализа эффектов гиперэкспрессии Vcl-2 белков *in vivo* на организменном уровне, т.е. для анализа изменений когнитивных функций 5xFAD мышью модели с БА, были проведены поведенческие эксперименты с использованием «Водного лабиринта Морриса», который считается лучшим поведенческим тестом при анализе патологии БА для регистрации изменений процессов обучения и пространственной памяти у грызунов.

Для выполнения данного эксперимента мыши инжесктировались необходимыми вирусами в возрасте 3,5 месяцев, затем в возрасте 6 месяцев был проведен тест «Водный лабиринт Морриса». А для обработки результатов была использованная разработанная нами программа Minorontikos.

Для анализа прогресса обучения были высчитаны параметры латентного времени поиска платформы (Рисунок 8А) и процентное время в квадранте интереса (Рисунок 8Б). Для тестового дня эксперимента был вычислен параметр числа пересечений зоны, где в обучающих сессиях находилась платформа (Рисунок 9).

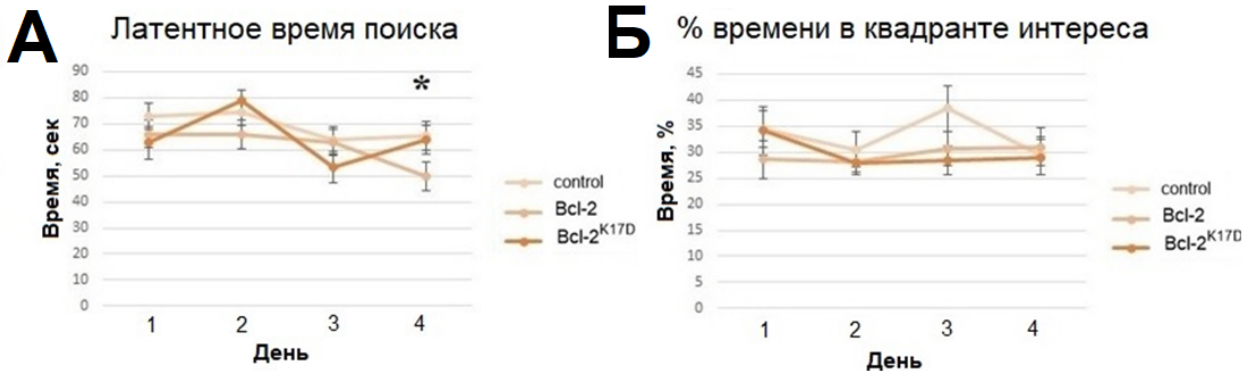


Рисунок 8 – Результаты проведения «Водного лабиринта Морриса» в дни обучения с 5xFAD мышами, инжесктированными контрольным (Control, n=8), Bcl-2 (n=10) и Bcl-2^{K17D} (n=10) вирусами. В графиках латентного времени поиска платформы (А) и процентного времени, проведенного в квадранте интереса (Б), результаты представлены как средние значения группы за весь день обучения ± стандартная ошибка, * p<0.05.

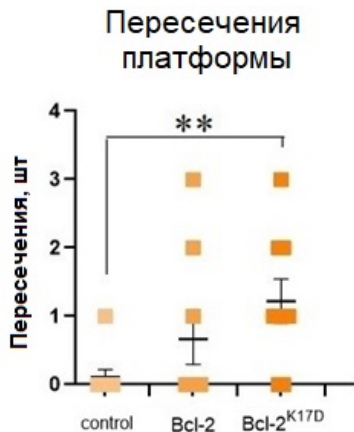


Рисунок 9 – Результаты проведения «Водного лабиринта Морриса» с 5xFAD мышами, инжесктированными контрольным (Control, n=8), Bcl-2 (n=10) и Bcl-2^{K17D} (n=10) вирусами, в тестовый день эксперимента. График количества пересечений зоны, где ранее находилась платформа, показаны индивидуальные значения и среднее ± стандартная ошибка, ** p<0.005.

Результаты проведения MWM свидетельствуют о том, что в контрольной группе 5xFAD мышей во время тренировочных сессий обучения не происходит, латентное время поиска платформы не уменьшается, а время в квадранте интереса не увеличивается (Рисунок 8). Почти такая же ситуация в группе 5xFAD мышей с гиперэкспрессией мутантной формы Bcl-2 белка, но в отличие от контрольной группы, оба рассчитанных параметра имеют сильный разброс данных и «скачкообразную» кривую обучения (Рисунок 8). Процентное время в квадранте интереса для группы 5xFAD мышей с гиперэкспрессией нативной формы Bcl-2 белка также не показывает

тенденции к увеличению в процессе обучения (Рисунок 8Б), но в последний день обучения мышцы этой группы сократили время поиска скрытой платформы и статистический анализ показал разницу между результатами этой группы и двумя остальными (Рисунок 8А). В тестовом дне также статистически значимые различия в числе пересечений зоны, где ранее находилась платформа, обнаружены только в группе 5xFAD с гиперэкспрессией Vcl-2^{K17D} (Рисунок 9).

Таким образом, сделанное выше предположение о том, что подтвержденный нами положительный синаптопротекторный эффект нативной формы Vcl-2 на клеточном уровне организации на более высоких уровнях нивелируется остальными функциями этого белка, получило подтверждение и при проведении поведенческого теста. «Водный лабиринт Морриса» показал, что гиперэкспрессия мутантной формы белка Vcl-2 на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера может помочь избежать серьезных когнитивных нарушений в более зрелом возрасте. К сожалению, делать однозначные выводы по эффекту гиперэкспрессии Vcl-2 белков на процессы обучения невозможно, так как малая выборка и сильный разброс данных в группах Vcl-2 и Vcl-2^{K17D} не позволяют объективно оценить разницу в результатах эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании была выявлена роль ингибирования IP3R-опосредуемого высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума при помощи гиперэкспрессии анти-апоптотического белка Vcl-2 в мышечной модели наследственной формы болезни Альцгеймера. Несмотря на то, что возможное участие Vcl-2 в кальциевом сигналинге через связывание с каналами утечки кальция из ЭР было известно ранее, данный молекулярный путь в условиях патогенеза БА был изучен впервые. Так как для изучения влияния связывания Vcl-2 именно с IP3R каналом нам потребовалось использовать в качестве контроля мутантную форму Vcl-2^{K17D}, где известная по литературным данным мутация K17D «выключает» функцию взаимодействия с IP3R, была впервые проверена молекулярная стабильность белковой молекулы Vcl-2^{K17D}. Результаты показали, что конформационные изменения по сравнению с нативной формой при мутации K17D присутствуют, однако они не влияют на компактность глобулярной структуры, и молекула также как и Vcl-2 без мутации является стабильной. И первые результаты проверки *in vivo* взаимодействия Vcl-2 и Vcl-2^{K17D} с каналами утечки кальция IP3R и RyR подтвердили наше предположение о специфичности связывания. Так при помощи метода иммунопреципитации мы показали, что при экспрессии Vcl-2 в CA1 области гиппокампа 5xFAD мышечной модели БА белок Vcl-2 ингибирует IP3R, и RyR каналы утечки кальция из ЭР, а его мутантная форма Vcl-2^{K17D} имеет хорошее сродство только с RyR. Таким образом, дальнейшее использование Vcl-2 и Vcl-2^{K17D} в наших *in vivo* исследованиях было оправдано и рационально.

Анализ морфологии дендритных шипиков в CA1 области гиппокампа показал полное восстановление стабильных синаптических контактов при гиперэкспрессии Vcl-2 белка в этой зоне мозга мышей 5xFAD, и отсутствие каких-либо негативных эффектов в контрольных группах. Кроме того, даже мутантная форма Vcl-2^{K17D} показала наличие положительного эффекта на стабильность синаптических контактов при патологии БА. Однако при анализе наличия внеклеточных A β скоплений (амилоидных бляшек) у взрослых 5xFAD мышей амилоидпротекторный эффект показала именно мутантная форма Vcl-2.

Для осуществления дальнейшей работы и анализа эффекта экспрессии Bcl-2 и Bcl-2^{K17D} в гиппокампе 5xFAD мышей нам потребовалось разработать собственное программное обеспечение для автоматизированного анализа результатов поведенческого теста «Водного лабиринта Морриса». Данный программный продукт в ходе реализации получил название Minorontikos, был апробирован в лабораторных условиях, с его помощью был налажен стандартный протокол проведения «Водного лабиринта Морриса» и получены объективные данные фенотипического отличия 5xFAD от здоровых взрослых мышей (данные не представлены). Полученные при помощи Minorontikos результаты полностью согласуются с многочисленными литературными данными по когнитивному фенотипу 5xFAD мышшиной линии. Так же нами было сделано сравнение интерфейса и функционирования Minorontikos с двумя популярными зарубежными коммерческими продуктами, считающимися наиболее эффективными в обработке результатов поведенческих тестов (VideoMot, и EthoVisio). Результат сравнения показал, что разработанный нами программный продукт ничем не уступает в функционале этим коммерческим программам, а интерфейс его более прост в использовании благодаря узкой специализации в обработке поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». Таким образом в рамках данного исследования была решена проблема отсутствия доступного программного обеспечения для выполнения анализа когнитивных функций мышей при помощи «Водного лабиринта Морриса». Дальнейшие результаты этого анализа показали, что гиперэкспрессия Bcl-2^{K17D} имеет более выраженный нейропротекторный эффект, чем его нативная форма.

Заключая вышеперечисленные результаты данного исследования, можно сделать вывод, что анти-апоптотический белок Bcl-2 играет важную роль в кальциевом сигнальном пути при патологии наследственной формы болезни Альцгеймера, его взаимодействие с каналами утечки кальция из эндоплазматического ретикулума может оказывать благоприятное воздействие на некоторые ранние патологические аспекты функционирования клеток, наблюдаемые при развитии БА. Однако первоначальная идея о ключевой роли взаимодействия именно с IP3R каналами не подтвердилась, так как при анализе амилоидных скоплений и когнитивных функций наилучший результат показала мутантная форма Bcl-2^{K17D}, для которой характерно взаимодействия только с RyR каналами. Дальнейшее исследование Bcl-2^{K17D}, изменений его анти-апоптотических функций за счет особенностей молекулярной структуры и участие в кальциевом сигналинге является перспективной мишенью для разработки возможной терапии для лечения болезни Альцгеймера

Полученные результаты позволяют нам сделать следующие **выводы**:

1. Молекулярная структура белка Bcl-2 с мутацией K17D, несмотря на изменения положений некоторых участков, по сравнению с нативной формой белка Bcl-2, остается стабильной и сохраняет компактную глобулярную структуру.
2. Результаты иммунопреципитации показали, что один из каналов утечки кальция из эндоплазматического ретикулума во внутриклеточное пространство белок RyR2 взаимодействует с белками Bcl-2 дикого типа и его мутантной формы Bcl-2^{K17D}, второй же важный канал выхода кальция, белок IP3R1, взаимодействует с Bcl-2 дикого типа, а средство между IP3R1 и мутантной формой Bcl-2^{K17D} значительно снижено.

3. Гиперэкспрессия нативной формы белка Bcl-2 при помощи аденоассоциированных векторов в СА1 области гиппокампа на ранних стадиях развития патологии болезни Альцгеймера способствует предотвращению синаптотоксического эффекта у мышей трансгенной линии 5xFAD в более зрелом возрасте. Несмотря на то, что гиперэкспрессия мутантной формы белка Bcl-2 тоже имеет положительный синаптопротекторный эффект, она не может привести к улучшению морфологии дендритных шипиков в мышцах 5xFAD до уровня здоровых мышей.

4. Гиперэкспрессия нативного белка Bcl-2 у 5xFAD мышей в возрасте 3,5 месяцев не показывает амилоид-протекторные свойства в зрелом возрасте ни в коре, ни в гиппокампе головного мозга животного. Однако мутантная форма Bcl-2^{K17D} уменьшает число амилоидных бляшек в двух исследуемых зонах.

5. Разработанная в данном исследовании программа Minorontikos для автоматизированного обсчета результатов поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса» успешно прошла апробацию в лабораторных условиях, отвечает всем нуждам пользователя при обработке MWM, имеет удобный интерфейс, при сравнении с коммерческими продуктами (VideoMot и EthoVision) не уступает им по качеству обработки экспериментальных данных, а в некоторых случаях даже выигрывает, например, при высчитывании угловой ошибки поиска.

6. Когнитивные функции 5xFAD мышей улучшаются после гиперэкспрессии мутантной формы Bcl-2^{K17D} в СА1 области гиппокампа. Это согласуется с результатами экспериментов по анализу амилоидных отложений в мозге 5xFAD мышей, и дает сделать предположение, что в дополнении к анти-апоптотическим свойствам белка Bcl-2 взаимодействие его именно с RyR каналами обладает терапевтическим эффектом в рамках 5xFAD мышинной модели наследственной формы БА.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, индексируемые в международных базах данных:

1. **Д. П. Чернюк**, А. Г. Зорин, К. З. Деревцова, Е. В. Ефимова, В. А. Приходько, Ю. И. Сысоев, О. Л. Власова, М. В. Болсуновская, И. Б. Безпрозванный. Автоматический анализ данных поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*, 2021, Т. 71, № 1, стр. 126-135. (Scopus, Web of Science)

2. **Д.П. Чернюк**, А.В. Большакова, О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный. Возможности и перспективы поведенческого теста «Водный лабиринт Морриса». *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, 2021, том 107, № 3, с. 267–287. (CA)

3. Я.В. Горина, А.Б. Салмина, **Д.П. Чернюк**, А.В. Большакова, П.М. Балаба, И.Б. Безпрозванный, О.Л. Власова. Особенности развития и анализа нарушений социального поведения и когнитивных функций у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*, 2021. Том 71, №5, С. 667-679. (Scopus, Web of Science)

Материалы конференций:

4. **Chernyuk D.**, Vervliet T., Gordeev A., Polozova M., Pchitskaya E., Bultynck G., Bezprozvanny I. (2022) Bcl-2 protein prevents synaptic loss in 5×FAD mouse model of Alzheimer's disease.

RUSNEUROCHEM 2022: Всероссийская с международным участием конференция Российского нейробиохимического общества, г. Санкт-Петербург (22-24 мая 2022 г.). – Тезисы докладов. – СПб, с. 50.

5. Zorin A., **Chernyuk D.**, Vlasova O., Bolsunovskaya M., Bezprozvanny I. (2020) Software for analyzing the behavioural test "morris Water Maze". E3S Web Conf., 203, 01029. (Scopus, Web of Science)

6. **Chernyuk D.P.**, Zorin A.G., Bezprozvanny I.B. Automation of the behavioral test “Morris water maze” analysis. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*. 2020. Т. 56. № 7. С. 745-746 (РИНЦ)
Патент:

7. Свидетельство № 2020619187 «Программа автоматизации исследования прохождения водного Лабиринта Морриса» от 13 августа 2020 года (авторы Зорин А.Г, Болсуновская М.В., Чернюк Д.П., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б.)

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н Безпрозванному Илье Борисовичу за возможность работы над интересным исследовательским проектом. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории молекулярной нейродегенерации СПбПУ и сотрудников Высшей школы биомедицинских систем и биотехнологий за поддержку и участие в ходе выполнения проекта, в особенности, Власову Ольгу Леонардовну за организацию работы и содействие в написании и организации защиты диссертации. Автор выражает благодарность коллегам из Лаборатории молекулярной и клеточной сигнализации Католического Университета Левена Балтынку Гирту и Тиму Вервлиту за создание вирусных векторов, сотрудникам Лаборатории Промышленных систем потоковой обработки данных СПбПУ Болсуновской Марине Владимировне и Зорину Арсению Геннадьевичу за помощь в разработке программного обеспечения, а также Пчицкой Екатерине Игоревне и Красковской Нине Александровне за помощь в освоении методик, использовавшихся для выполнения настоящей работы. Забродскую Яну Александровну и Большакову Анастасию Викторовну за помощь в решении административных дел. Работы в рамках настоящей диссертации проводились при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (No. 20-315-90010) и Российского Научного Фонда (No. 20-45-01004).