

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

На правах рукописи

Красковская Нина Александровна

**Функциональная роль сигма 1 рецептора генетической модели
болезни Хантингтона**

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: Красковская Н.А.
Научный руководитель: д.б.н.,
Безпрозванный И.Б.

Санкт Петербург – 2020

Научно-квалификационная работа выполнена на кафедре «Медицинская физика» Института биомедицинских систем и технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор высшей школы

– *Журихина Валентина
Владимировна,
д.ф.-м.н, доцент*

Научный руководитель:

– *Безпрозванный Илья Борисович,
д.б.н., профессор*

Рецензент:

– *Вигонт Владимир
Александрович, к.б.н., н.с.
лаборатории ионных каналов
клеточных мембран Института
Цитологии 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>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат
- ГАМК - гамма-аминомасляная кислота
- БА - болезнь Альцгеймера
- БХ – болезнь Хантингтона
- нДУВК – нейрональный депо-управляемый вход кальция
- НДЗ - нейродегенеративные заболевания
- ПЗКК – потенциал-зависимые кальциевые каналы
- Ca²⁺ – кальций
- С1Р – сигма 1 рецептор
- СШН – средний шипиковый нейрон
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
- ЭпР – эндоплазматический ретикулум
- АМРА-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
- BiP - binding immunoglobulin protein
- DARPP-32 – допамин и цАМФ-регулируемый нейрональный фосфопротеин (dopamine and cAMP - regulated neuronal phosphoprotein)
- IP₃ - инозитол-3-фосфат
- IP₃R – рецептор инозитол-3-фосфата
- IP₃R1 – рецептор инозитол-3-фосфата 1 типа
- НАР - белок, ассоциированный с хантингтином (Htt-associated protein)
- htt – ген белка хантингина
- Htt – белок хантингтин
- MAP2 – белок, ассоциированный с микротрубочками 2 типа (microtubule-associated protein type 2)
- mHtt – мутантная форма белка хантингина

mhtt – мутантная форма гена белка хантингтина

NMDAR – N-метил-D-аспаратный рецептор

MAM – мембрана ЭПР, ассоциированная с митохондрией

PBS - фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline)

STIM2 – strome interaction molecule type 2

RyR – рианодиновый рецептор

SERCA – АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулула

WT - мышь дикого типа (wild type)

YAC128 – мышьяная трансгенная линия, несущая полноразмерный мутантный ген НТТ человека со 128 повторами глутамина в составе искусственной хромосомы дрожжей (yeast artificial chromosome)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	6
Актуальность работы.....	6
Цель и задачи работы.....	9
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость.....	11
Апробация диссертации.....	12
Публикации.....	12
Представление научного доклада: основные положения.....	12
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.....	14
Объекты, (предмет) и методы исследования.....	14
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
Влияние лигандов сигма 1 рецептора на формирование и поддержание синаптических контактов нейронов стриатума в кортико-стриатальной культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128.....	14
Влияние агониста сигма 1 рецептора на интенсивность нейронального депо-управляемого входа кальция в дендритных шипиках нейронов стриатума в кортико-стриатальной культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128.....	18
Влияние агониста сигма 1 рецептора на содержание кальция в эндоплазматическом ретикулуме в культуре нейронов стриатума, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128.....	20
Влияние агониста сигма 1 рецептора на формирование и поддержание синаптических контактов нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей в условии гиперэкспрессии белков семейства STIM.....	22
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	25
ВЫВОДЫ.....	28
Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации).....	29
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	30

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы Болезнь Хантингтона (БХ) является нейродегенеративным, доминантно наследуемым генетическим заболеванием. Известно, что при БХ в первую очередь поражается стриатум, так как клеточной гибели наиболее подвержены нейроны именно этой области — ГАМКергические средние шипиковые нейроны (СШН), которые составляют 95% нейронов стриатума. Повреждение стриатума при БХ приводит к развитию неконтролируемых непроизвольных движений (хореи), основному клиническому симптому данного заболевания.

На клеточном уровне БХ характеризуется накоплением мутантного белка хантингина (mHtt) в клетках головного мозга. Увеличение количества повторов кодона CAG в первом экзоне гена хантингина (*htt*) выше порога в 35 триплетов приводит к патологическому удлинению полиглутаминового тракта в белке и развитию фенотипа БХ¹. Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не установлена однозначная связь между накоплением mHtt в нейронах стриатума и их селективной гибелью при БХ. В связи с этим, поиск лекарственных препаратов для лечения НДЗ является важным приоритетом современной нейромедицины и нейробиологии и является предметом пристального внимания со стороны фармацевтических компаний на протяжении многих лет. К сожалению, подавляющее большинство разработок потерпели неудачу в клинических испытаниях. Те немногие препараты, что сейчас применяются в клинической практике (тетрабеназин для лечения БХ) облегчают тяжесть симптомов и не способны остановить прогрессию заболевания, кроме того, имеют целый ряд побочных эффектов. Данное обстоятельство указывает на необходимость поиска новых терапевтических мишеней.

Результаты исследований последних лет указывают на нарушения в кальциевом (Ca²⁺) гомеостазе нейронов стриатума при БХ^{2,3}. Ca²⁺ является одним из важнейших вторичных посредников в нейронах, преобразующий поступающие сигналы в активацию эффекторных ферментов и запуску

кальций-опосредованных внутриклеточных реакций. Известно, что нейрональная активность, в том числе, механизмы синаптической передачи, во многом зависят от уровня кальция в его депонируемом компартменте - ЭР. Поскольку ЭР является основным динамическим депо кальция и участвует в генерации специфических форм кальциевой сигнализации в нейронах, существует несколько сигнальных каскадов для мобилизации кальция из ЭР. В основном, они опосредуются при помощи IP_3R1 и рианодиновых рецепторов. При помощи кальциевой визуализации было показано, что кальций довольно быстро выходит из ЭР в соме и дендритах в условиях покоя при инкубировании нейронов в бескальциевой среде. Выход кальция происходит благодаря наличию в мембране ЭР пассивных каналов утечки кальция, таких как белок пресинилин 1⁴. После утечки из ЭР, свободный кальций из цитозоля немедленно выкачивается через обменники и насосы на плазматической мембране для поддержания высокого электрохимического градиента. Соответственно, подразумевается наличие особого механизма, обеспечивающего приток кальция из внеклеточного матрикса для поддержания стабильного уровня кальция в ЭР, в отсутствие притока через потенциал-зависимые и лиганд- управляемые кальциевые каналы⁵.

Депозитивно-управляемый вход кальция (ДУВК) представляет собой каскад биохимических реакций, которые активируются при опустошении запасов кальция в ЭР. В ходе этого процесса активируются специфические белки - кальциевые сенсоры, расположенные на мембране ЭР и ответственные за запуск этого процесса, которые в свою очередь, активируют расположенные на плазматической мембране высокоселективные кальциевые каналы, по которым кальций заходит в цитозоль и далее закачивается во внутриклеточные депо, в основном, в ЭР при помощи кальций-зависимой АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA). В невозбудимых клетках ДУВК является основным источником восполнения внутриклеточных запасов кальция. Основными элементами ДУВКа в

невозбудимых клетках являются белки Strome interaction molecule type 1 (STIM1) и Calcium release-activated calcium channel protein 1, кодируемый геном ORAI1 (сокращенно ORAI1). Белок STIM1 является кальциевым сенсором, располагающимся на мембране ЭПР, и является ключевым белком, необходимым для активации ДУВКа ^{6, 7}. При снижении концентрации кальция в ЭР, STIM1 олигомеризуется и релокализуется в область контакта между плазматической мембраной и мембраной ЭР, где связывается с деполуправляемыми кальциевыми каналами плазматической мембраны, с белками семейства ORAI1 и Transient receptor potential canonical (TRPC) и запускается вход кальция из внеклеточного матрикса ^{8,9}.

Долгое время считалось, что ДУВК отсутствует в нейронах, пока не было показано, что белки семейства ORAI, а так же белок STIM1 и его гомолог STIM2 экспрессируются в ЦНС ¹⁰. В частности, было обнаружено, что белок STIM2 наиболее интенсивно экспрессируется в нейронах и является более чувствительным кальциевым сенсором, чем его гомолог STIM1, поскольку обладает более низким сродством к кальцию и активируется даже при незначительных изменениях в концентрации кальция в ЭПР. Экспрессия белков из семейства STIM2 была выявлена в нескольких нейрональных компартментах, в том числе, в дендритных шипиках ¹⁰.

Дендритные шипики представляют собой постсинаптические компартменты глутаматэргических синапсов, получающие возбуждающие импульсы из пресинаптической терминали. Дендритные шипики являются весьма динамичными структурами, поэтому предполагают, что изменения в морфологии шипиков отражают функциональные изменения, происходящие в синапсе в ходе синаптического ремоделирования. В частности, многие нейродегенеративные заболевания, в частности, болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Хантингтона (БХ), характеризуются нарушением в формировании синаптических контактов или потерей их стабильности.

Нарушения в синаптической передаче и потеря синаптических контактов являются одними из самых ранних признаков дисфункции нейронов, наблюдаемых при нейродегенеративных заболеваниях. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что в поддержании стабильности дендритных шипиков нейронов разных типов важную роль играет нейрональный депо-управляемый вход кальция (нДУВК). Нарушения в работе нДУВКа, наблюдаемые при нейродегенеративных заболеваниях, приводят к нарушению стабильности синаптических контактов, что морфологически проявляется в элиминации дендритных шипиков и было продемонстрировано на различных мышинных моделях БА и модели БХ^{3, 10-12}.

Один из возможных способов нормализации Ca²⁺ баланса в нейронах при БХ является ингибирование активности нДУВКа через сигма 1 рецептор (С1Р). С1Р является трансмембранным белком ЭПР, регулирующим функцию IP₃R, стабилизируя Ca²⁺ сигнализацию между ЭПР и митохондрией¹³. Предполагается, что данный рецептор действует как Ca²⁺ сенсор и его активация при помощи агониста может способствовать нормализации Ca²⁺ гомеостаза в нейронах стриатума при БХ¹⁴. Нормализация Ca²⁺ баланса в области постсинапса за счет подавления гиперактивности нДУВКа, является перспективным подходом при разработке новых лекарственных препаратов для терапии БХ. Нейропротекторное действие С1Р на молекулярном уровне будет способствовать восстановлению синаптических контактов и предупреждать развитие болезни на клеточном уровне.

Цель и задачи работы

Целью диссертационного исследования является выяснение функциональной роли сигма 1 рецептора в регуляции депо управляемого входа кальция в нейронах стриатума на модели БХ. Для достижения указанной цели поставлены следующие задачи:

1. Оценить влияние активации сигма 1 рецептора с помощью лигандов на плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатальной культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128.
2. Измерить интенсивность депо-управляемого входа кальция в нейронах стриатума в первичной культуре нейронов стриатума, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128 до и после активации сигма 1 рецептора с помощью высокоселективного агониста.
3. Оценить содержание кальция в ЭпР в первичной культуре нейронов стриатума, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128 до и после активации сигма 1 рецептора с помощью высокоселективного агониста.
4. Оценить влияние активации сигма 1 рецептора с помощью высокоселективного агониста на плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей в условии гиперэкспрессии белка STIM2.

Научная новизна

В настоящей работе впервые показано, что высокоселективные лиганды С1Р, соединения PRE-084 и NE-100, оказывают влияние на плотность дендритных шипиков нейронов в первичной кортико-стриатной культуре, выделенной из мышей с моделью БХ. В работе впервые показано, что аппликация высокоселективного агониста, соединения PRE-084, ингибирует избыточный нДУВК в дендритных шипиках нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из мышей с моделью БХ, а также повышает содержание кальция в ЭпР в культуре нейронов стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ. В работе также впервые показано, что нейропротекторное действие соединения PRE-084 непосредственно связано с активностью нДУВКа. В стриатуме мышей с моделью БХ, а также в первичной культуре нейронов стриатума, выделенной из мышей с моделью

БХ избыточная активность нДУВКА обусловлена повышением экспрессии белка STIM2 в ответ на снижении концентрации Ca^{2+} в ЭпР³. В условиях гиперэкспрессии белка STIM2, в кортико-стриатной культуре нейронов, выделенных из мышей дикого типа, также наблюдается снижение плотности синаптических контактов. В работе впервые показано, что аппликация соединения PRE-084 восстанавливает плотность синаптических контактов СШН в кортико-стриатной культуре в условиях гиперэкспрессии белка STIM2.

Теоретическая и практическая значимость

Нарушения в синаптической передаче и потеря синаптических контактов являются одними из самых ранних признаков дисфункции нейронов стриатума, возникающих при развитии нейродегенеративных заболеваний. В частности, при развитии БХ нарушения кальциевой сигнализации в нейронах и, в особенности, в области постсинапса вследствие гиперактивации нДУВКа вносит вклад в развитие элиминация синапсов. В проекте большая часть исследований посвящена изучению влияния активации С1Р при помощи лигандов на формирование и поддержание синаптических контактов в кортико-стриатальных культурах, выделенных из диких и трансгенных мышей, а также мышей дикого типа в условиях гиперэкспрессии белка STIM2, моделируя, таким образом, повышение активности нДУВКа, наблюдаемое при БХ вследствие токсичного эффекта mHtt.

Результаты проекта также указывают на взаимосвязь нДУВКа и стабильности синаптических контактов. Гиперактивация нДУВКа приводит к снижению количества дендритных шипиков нейронов стриатума, а активация С1Р защищает постсинаптические структуры, оказывая, таким образом, нейропротекторный эффект на молекулярном уровне. Полученные в результате данного проекта данные являются проливают свет на новые аспекты функционирования С1Р в качестве регулятора кальциевого баланса в области постсинапса и делают его перспективной мишенью для

предупреждения развития самых ранних патологических процессов, наблюдаемых при БХ.

Апробация диссертации

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих российских и международных научных и научно-практических форумах, и конференциях:

1. Международный научный форум «Неделя науки - 2017». Санкт-Петербург, Россия. 13-19 ноября 2017.
2. FENS'2018. Берлин, Германия. 7-11 июля 2018.
3. Biomembranes' 2018. Москва, Россия. 1-5 октября 2018.
4. XX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. Санкт-Петербург, Россия. 25 февраля – 2 марта 2019.
5. 2nd European Symposium on Physiopathology of Sigma 1 receptor. Рига, Латвия. 31 мая – 2 июня 2019.
6. ADPD'2019. Лиссабон, Португалия. 26-31 марта 2019.
7. VIII Всероссийский форум «Белки и пептиды». Москва, Россия. 18-22 сентября 2017.

Публикации По результатам научно-квалификационной работы опубликовано 6 научных работ, в том числе 2 статей в изданиях, входящих в перечень ВАК (из них 2 напечатаны также в англоязычной версии журнала), а также 4 работы в сборниках по материалам конференций.

Представление научного доклада: основные положения

В результате исследования были сформулированы следующие основные положения:

1. Одним из признаков БХ, отражающих самые ранние морфофункциональные изменения на клеточном уровне при данной

нейропатологии, является уменьшение плотности дендритных шипиков СШН. Активация сигма 1 рецептора с помощью агонистов восстанавливает плотность дендритных шипиков в средних шипиковых нейронах стриатума в первичной кортико-стриатной культуре, выделенной из мышей с моделью болезни Хантингтона. Активация сигма 1 рецептора с помощью агонистов не оказывает негативного влияния на плотность дендритных в первичной кортико-стриатной культуре, выделенной из мышей дикого типа.

Аппликация

2. Показано, что уже на 14 сутки культивирования в нейронах стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ наблюдается изменение кальциевой регуляции, а именно наблюдается значительная активация входа кальция по сравнению с нейронами стриатума, выделенными из мышей дикого типа. Активация сигма - 1 рецептора при помощи селективного агониста, способствует снижению интенсивности входа кальция в культуре нейронах стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ до уровня нейронов дикого типа.
3. Активация С1Р стабилизирует уровень кальция в эндоплазматическом ретикулуме в нейронах стриатума в культуре, выделенной из мышей с моделью БХ, повышая его уровень до значений, наблюдаемых для нейронов стриатума в культуре, выделенной из диких мышей.
4. Активации сигма 1 рецептора с помощью агониста препятствует элиминации дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатальной культуре, выделенной из диких мышей в условии гиперэкспрессии белка STIM2.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты, (предмет) и методы исследования

Объектом исследования являются первичные **диссоциированные** культуры нейронов стриатума и ко-культуры нейронов коры и стриатума, выделенные из диких мышей и мышей с моделью болезни Хантингтона

Предметом исследования выпускной квалификационной работы является функциональная роль сигма 1 рецептора в генетической модели болезни Хантингтона.

В ходе работы над выпускной квалификационной работой применялись следующие **методы**: генотипирование трансгенных животных, выделение и ведение первичных диссоциированных культур нейронов стриатума, первичной ко-культуры нейронов коры и стриатума, методы кальциевой визуализации, вестерн блот анализ, наработка лентивирусных частиц, иммунофлуоресцентное окрашивание, получения микрофотографий фрагментов дендритного древа нейронов при помощи конфокальной микроскопии, подсчет плотности дендритных шипиков при помощи программного обеспечения «Neuronstudio», статистическая обработка результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние лигандов сигма 1 рецептора на формирование и поддержание синаптических контактов нейронов стриатума в кортико-стриатальной культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128

В качестве модели для исследования БХ *in vitro* работе используются первичные смешанные кортико-стриатные культуры, выделенные из диких мышей (WT) и мышей с моделью БХ (YAC128). Только в условиях ко-культуры СШН формируют синаптические контакты с нейронами коры, что позволяет нейронам кортекса осуществлять синаптическую передачу к нейронам стриатума, которые, в свою очередь, отвечают электрофизиологической активностью и формируют синаптические

контакты, в результате чего на дендритном древе СШН клеток формируются многочисленные постсинаптические структуры - дендритные шипики (Рис. 1).

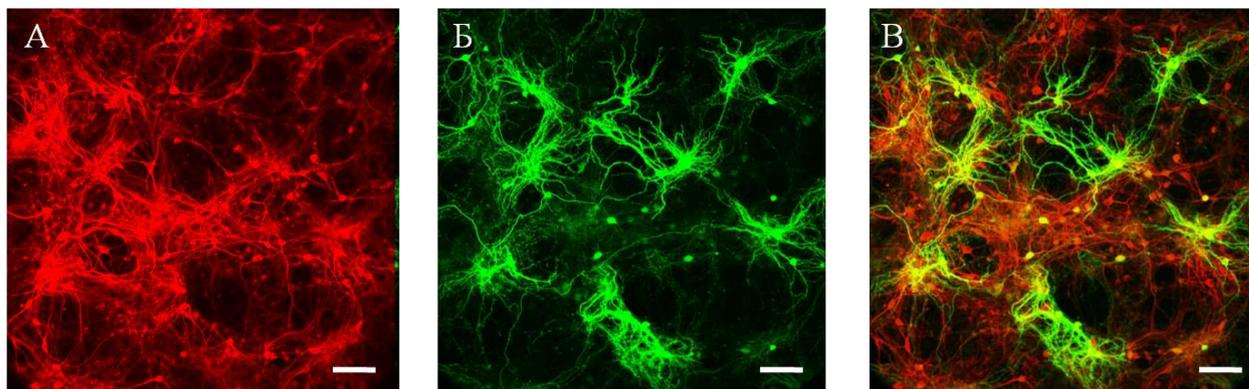


Рис.1. Первичная смешанная кортико-стриатная культура. Микрофотографии, иллюстрирующие общий вид кортико-стриатной культуры нейронов, выделенной из мышей дикого типа на 21 DIV. А – иммунофлуоресцентное окрашивание кортико-стриатной культуры антителами к маркерному белку нейронов MAP2 (вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa 594). Б -иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к маркерному белку СШН -DARPP-32 (вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa 488). В – составное изображение, полученное при наложении микрофотографий А и Б. Конфокальная микроскопия, $\times 20$. Масштаб 50 мкм.

На 21-е сутки культивирования в кортико-стриатных культурах, полученных от мышей линии YAC128, происходит элиминация синаптических связей, что морфологически проявляется в уменьшении количества дендритных шипиков в СШН стриатума по сравнению с диким типом (рис. 2, а, б). Эти данные подтверждают гипотезу о нарушении формирования синаптических связей как одного из самых ранних проявлений нейродегенеративных процессов, происходящих в СШН под действием mHtt при БХ.

Добавление агониста С1Р, соединения 3-PPP, в концентрации 100 нМ в кортикостриатную культуру, полученную от мышей линии YAC128, восстанавливало плотность дендритных шипиков СШН стриатума до уровня культур дикого типа. Добавление 3-PPP в кортико-стриатную культуру от мышей дикого типа не влияло на плотность синаптических контактов (рис. 2, д, е). Поскольку наше предположение о нейропротекторных свойствах С1Р

основывалось на структурном сходстве молекул 3-PPP и придопида, для дальнейших исследований были выбраны более специфические лиганды C1P — агонист 2-(4-морфолинил)-1-фенилциклогексанкарбоксилат (PRE-084) и антагонист 4-метокси-3-(2-фенилэтокси)-N,N-дипропилбензолэтанамин (NE-100). Добавление агониста PRE-084 в концентрации 100 нМ в кортико-стриатную культуру от мышей линии YAC128 также способствовало восстановлению синаптических связей между нейронами коры и стриатума, но не влияло на их количество в культурах от мышей дикого типа (рис. 2, в, г). В то же время аппликация антагониста C1P, соединения NE-100, в концентрации 100 нМ не оказывала статистически достоверного влияния на плотность дендритных шипиков СШН в кортико-стриатной культуре, выделенной из мышей как дикого типа, так и от мышей линии YAC128 (рис. 2, ж, з). Однако одновременное добавление в культуру соединений PRE-084 и NE-100 в одинаковой концентрации (100 нМ) приводило к некоторому уменьшению плотности дендритных шипиков в кортико-стриатных культурах от мышей линии YAC128 по сравнению с аппликацией только агониста PRE-084 и никак не влияло на плотность дендритных шипиков в кортико-стриатной культуре от мышей дикого типа (рис. 2, и, к). Гистограммы, иллюстрирующие влияние лигандов C1P на плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатных культурах, выделенных из мышей дикого типа и линии YAC128, представлены на рисунке 3. Полученные данные позволяют предположить, что активация C1P с помощью агонистов оказывает нейропротекторный эффект, повышая плотность дендритных шипиков в кортико-стриатных культурах от мышей линии YAC128 и способствуя восстановлению синаптических связей *in vitro*, не оказывая при этом негативного воздействия на синаптические контакты в культурах от мышей дикого типа.

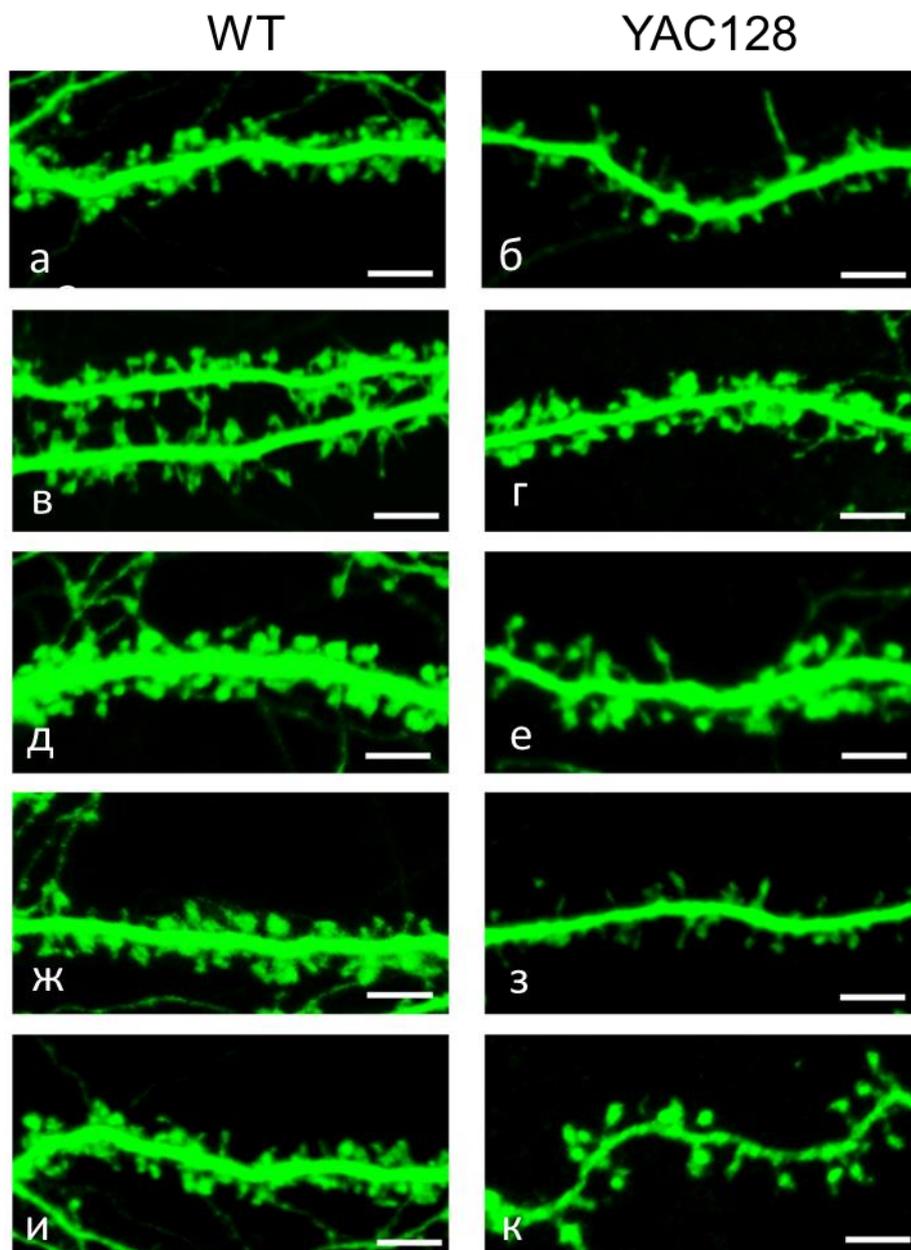


Рис.2. Влияние лигандов сигма-1 рецептора на плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортикостриатной культуре. Микрофотографии фрагментов дендритного древа СШН на 21 DIV в кортико-стриатной культуре, выделенной из мышей дикого типа (WT) и линии YAC128 после воздействия лигандами С1Р. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры нейронов антителами к белку DARPP32 (вторичные антитела Alexa 488). а, б — без лигандов С1Р; в, г — аппликация агониста PRE-084 (100 нМ); д, е — аппликация агониста 3-PPP (100 нМ); ж, з — аппликация антагониста NE-100 (100 нМ); и, к — аппликация агониста PRE-084 и антагониста NE-100. Конфокальная микроскопия, x100. Масштабная линейка 10 мкм.

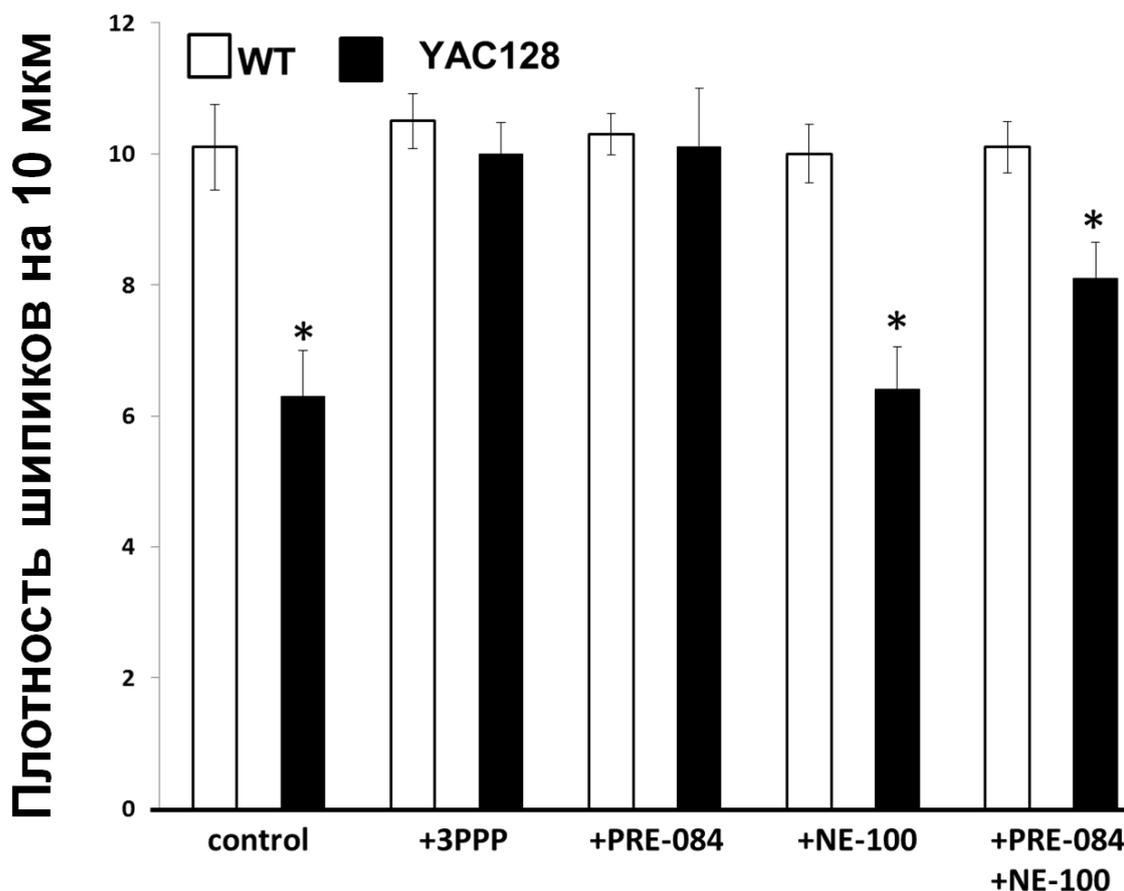


Рис.3. Гистограмма, отражающие изменения плотности дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре после аппликации лигандов сигма 1 рецептора. * $p < 0.05$ Сравнения проводились внутри культур нейронов, выделенных из мышей одного генотипа относительно выборки контроль (в отсутствии воздействия лигандами). Данные представлены как среднее значение \pm доверительный интервал для обоих генотипов.

Влияние агониста сигма 1 рецептора на интенсивность нейронального депо-управляемого входа кальция в дендритных шипиках нейронов стриатума в кортико-стриатальной культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128

Исследование нДУВКа в дендритных шипиках нейронов стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ и мышей дикого типа производили в кортико-стриатной культуре. Оценку интенсивности нДУВКа рассчитывали при помощи определения интенсивности флуоресценции генетически кодируемого кальциевого индикатора GCamp5.3, которым трансфецировалась ко-культура при смене среды (искусственная цереброспинальная жидкость) с нулевым содержанием кальция на среду, содержащую 10 мМ хлорид кальция на 14 день культивирования (DIV). Активацию входа кальция стимулировали при помощи аппликации

ингибитора АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума – тапсигаргина. Аппликация селективного агониста рецептора, соединения PRE-084 в концентрации 1 мкМ производилась за 16 часов до проведения измерений. В ходе проведения эксперимента было установлено, что для нейронов стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ, наблюдается значительная активация входа кальция по сравнению с диким типом. Максимальная амплитуда входа кальция в нейронах стриатума в ко-культурах, выделенных из мышей дикого типа, составила $2,03 \pm 0,37$ отн.ед. В нейронах стриатума кортико-стриатной культуре нейронов, выделенных из мышей с моделью БХ, наблюдалось усиленная активация входа кальция, что выражалось в повышении максимальной интенсивности флуоресценции в среднем до $3,85 \pm 0,41$ отн. ед. (рис. 4). Активация С1Р при помощи PRE-084 в ко-культуре, выделенной из мышей линии YAC128 за 16 часов до проведения измерений, снижала амплитуду входа кальция в нейронах стриатума, выделенных из трансгенных мышей до $2,45 \pm 0,45$ отн.ед. (Рис. 5) и не влияла на вход кальция в нейронах дикого типа (рис. 5). Гистограмма, иллюстрирующая значение максимальной амплитуды входа кальция в нейронах стриатума, приведена на рисунке 6.

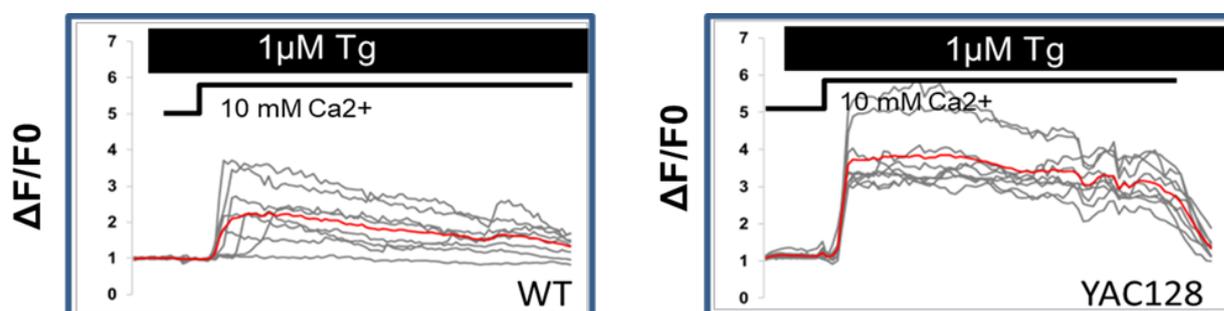


Рис. 4. Интенсивность нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах стриатума в ко-культурах, выделенных из диких (WT) и трансгенных мышей (YAC128). Кривые временной зависимости интенсивности флуоресценции в нейронах стриатума, трансфицированных плазмидой, кодирующей кальциевый сенсор GCaMP5.3. Серым цветом показана динамика входа кальция в отдельной клетке. Красным цветом показана усредненная кривая изменения интенсивности флуоресценции. Добавление кальциевой среды с содержанием 10 мМ хлорида кальция (10 мМ Ca²⁺), показаны черными прямоугольными линиями над кривыми. Измерение производилось на 14 DIV.

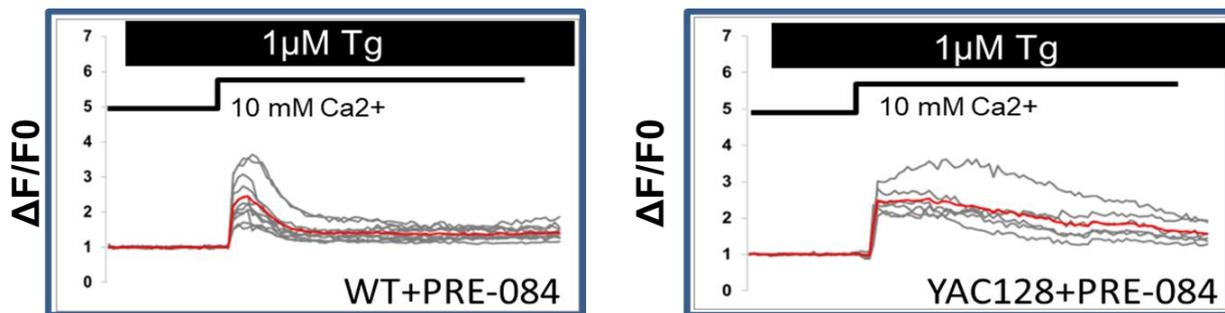


Рис. 5. Интенсивность нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах стриатума в ко-культурах, выделенных из диких (WT) и трансгенных мышей (YAC128) после активации C1P. Кривые временной зависимости интенсивности флуоресценции в нейронах стриатума, трансфецированных плазмидой, кодирующей кальциевый сенсор GCaMP5.3. Серым цветом показана динамика входа кальция в отдельной клетке. Красным цветом показана усредненная кривая изменения интенсивности флуоресценции. Добавление кальциевой среды с содержанием 10мМ хлорида кальция (10 мМ Ca²⁺), показаны черными прямоугольными линиями над кривыми. Интенсивность входа кальция в кортико-стриатных культурах, выделенных из мышей дикого типа (WT) и мышей линии с моделью БХ (YAC128) производили через 16 часов после аппликации в культуру соединения PRE-084 в концентрации 1 мкМ на 14 DIV.

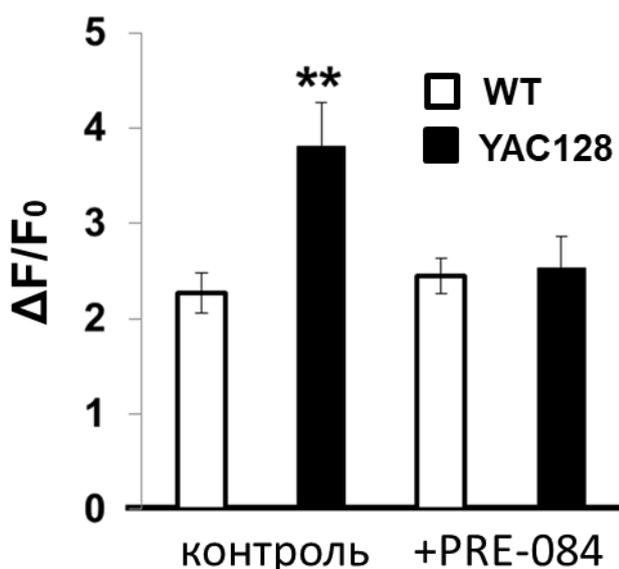


Рис. 6. Гистограмма, иллюстрирующая влияние активации C1P на Интенсивность нейронального депо-управляемого входа кальция в нейронах стриатума в ко-культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей. ** $p < 0.01$ по сравнению с диким типом (WT)

Влияние агониста сигма 1 рецептора на содержание кальция в эндоплазматическом ретикулуме в культуре нейронов стриатума, выделенной из диких и трансгенных мышей линии YAC128

В продолжение экспериментов по изучению влияния активации С1Р на кальциевый сигналинг при БХ была проведена оценка содержания кальция в ЭПР в культуре нейронов стриатума, выделенной из диких и трансгенных мышей. Содержание кальция в ЭПР рассчитывалось по изменению интенсивности флуоресценции химического кальциевого индикатора «Fluo-4» в ответ на аппликацию ионофора иономицина в концентрации 5 мкМ. Согласно полученным данным, в нейронах стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ, наблюдается пониженная концентрация кальция в ЭПР. Полученные результаты согласуются с данными по изучению динамики входа кальция. По нашим предположениям, усиление входа кальция в нейронах стриатума, выделенных из мышей с моделью БХ является одним из компенсаторных механизмов, направленных на восполнение запасов кальция в ЭПР. Активация С1Р с помощью агониста повышает концентрацию кальция в ЭПР и т.о., нормализует динамику до уровня диких мышей. Графики, иллюстрирующие изменение интенсивности флуоресценции «Fluo-4» в ответ на выход кальция из ЭПР после аппликации иономицина в нейронах стриатума в культуре, выделенной из диких и трансгенных мышей до и после активации С1Р, приведены на рисунке 7. Максимальная интенсивность выхода кальция из ЭПР в нейронах стриатума в ко-культуре, выделенной из диких мышей, составила $1,73 \pm 0,14$ отн.ед.. В нейронах стриатума, выделенных из трансгенных мышей, интенсивность выхода кальция падала до $1,24 \pm 0,05$ отн.ед. Активация С1Р с помощью агониста PRE-084 повышала концентрацию кальция в ЭПР до $1,74 \pm 0,16$ отн.ед в нейронах и не влияла на уровень кальция в нейронах стриатума, выделенных из диких мышей, значение интенсивности для которых составило $1,63 \pm 0,22$ отн.ед. Гистограмма, иллюстрирующая влияние активации С1Р на динамику кальция приведена на рисунке 8.

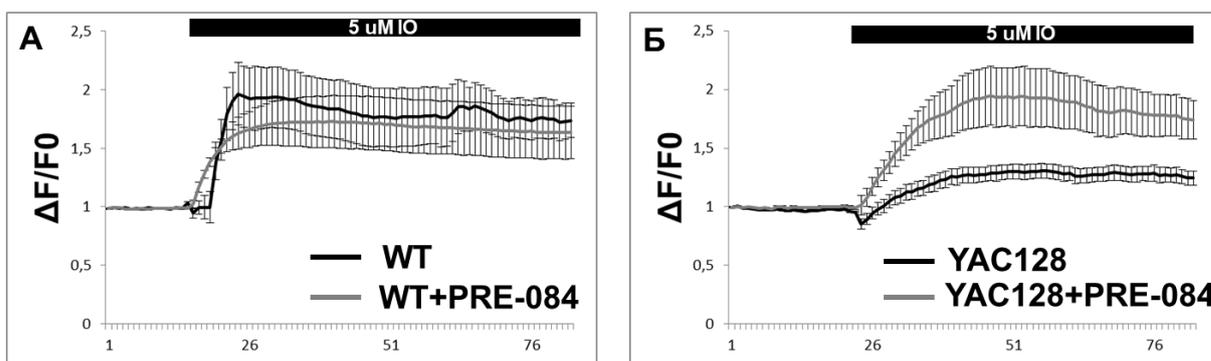


Рис. 7. Содержание кальция в нейронах стриатума в ко-культурах, выделенных из диких и трансгенных мышей в отсутствии (А) и в присутствии (Б) агониста C1P. Кривые временной зависимости интенсивности флуоресценции в нейронах стриатума в ответ на аппликацию иономицина в конечной концентрации 5 мкМ. Измерение производили через 16 часов после аппликации в культуру соединения PRE-084 в концентрации 1 мкМ на 14 DIV.

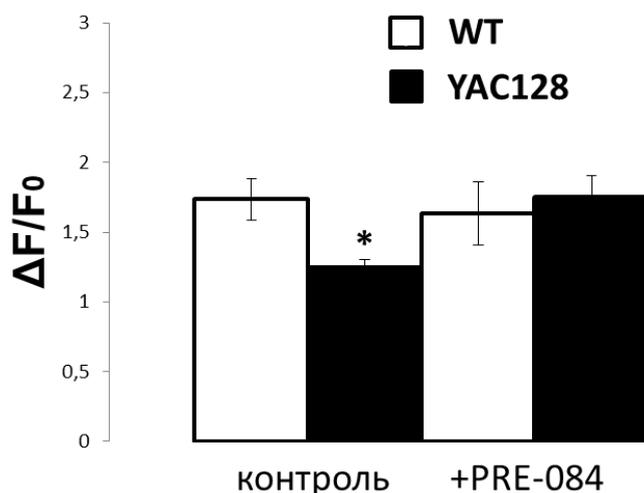


Рис. 8. Гистограмма, иллюстрирующая влияние активации C1P на содержание кальция в ЭпР в культуре нейронов стриатума, выделенной из диких (WT) и трансгенных мышей (YAC12). * $p < 0.05$ по сравнению с диким типом (WT).

Влияние агониста сигма 1 рецептора на формирование и поддержание синаптических контактов нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей в условии гиперэкспрессии белков семейства STIM

В предыдущих исследованиях было установлено, что уровень экспрессии STIM2 повышен в СШН стриатума у трансгенных животных с моделью БХ, а также в культуре нейронов стриатума, выделенной из трансгенных животных. Нокаун как белка STIM2 в кортико-стриатной

культуре, выделенной из мышей с моделью БХ снижает активность нДУВКа и восстанавливает плотность синаптических контактов.

Для подтверждения негативного влияния гиперактивации нДУВКа на стабильность постсинаптических структур, в кортико-стриатной культуре нейронов дикого типа производилось повышение уровня белка STIM2 путем гиперэкспрессии при помощи вирус-опосредованной трансдукции для моделирования избыточной активации данного биохимического пути, наблюдаемого при БХ. Эффективность вирус-опосредованной гиперэкспрессии STIM2 в культуре нейронов была подтверждена при помощи метода вестерн блот (рис. 9). В частности, первичная культура нейронов стриатума была трансдуцировалась на 7 день культивирования. На 14 день культура была пролизирована и полученные пробы были проанализированы при помощи метода вестерн блот с антителами к белку STIM2. В качестве контроля использовался лентивирус, кодирующий красный флуоресцентный белок mcherry.

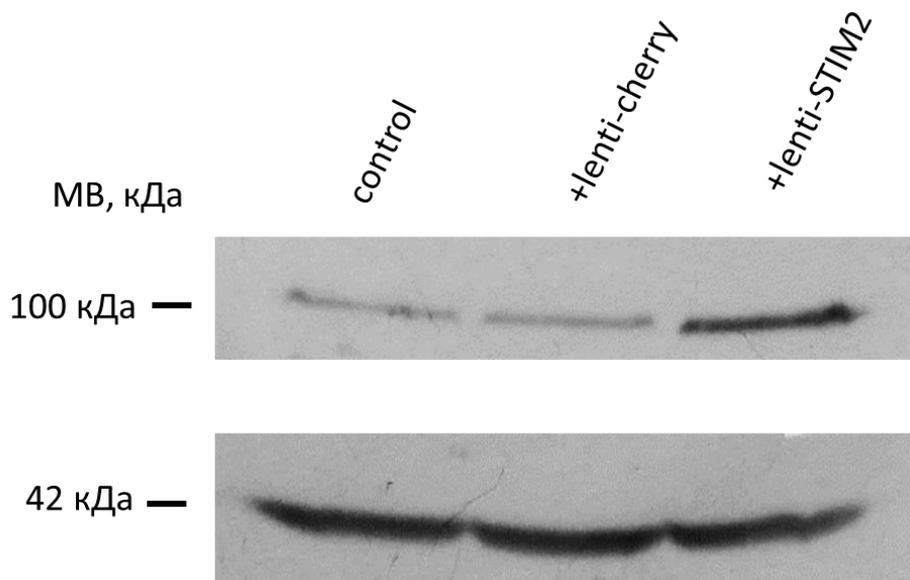


Рис. 9. Подтверждение наличия гиперэкспрессии белка STIM2 в первичной культуре нейронов стриатума при помощи вестерн блот анализа. В качестве контроля общего содержания белка в пробе использовалась окрашивание на актин. МВ – молекулярный вес.

Согласно полученным результатам при гиперэкспрессии белка STIM2 наблюдалось снижение общего количества дендритных шипиков. Активация

C1P путем добавления селективного агониста C1P, соединения PRE-084 в концентрации 1 мкМ, в культуру нейронов препятствовало элиминации дендритных шипиков на фоне гиперэкспрессии белка STIM2 (рис. 10).

Исходя из проведенного эксперимента можно предположить, что C1P оказывает непосредственное влияние на активность нДУВКа в нейронах. Гистограмма, иллюстрирующая влияние агониста C1P на плотность дендритных шипиков в условии гиперэкспрессии белков семейства STIM приведена на рисунке 11.

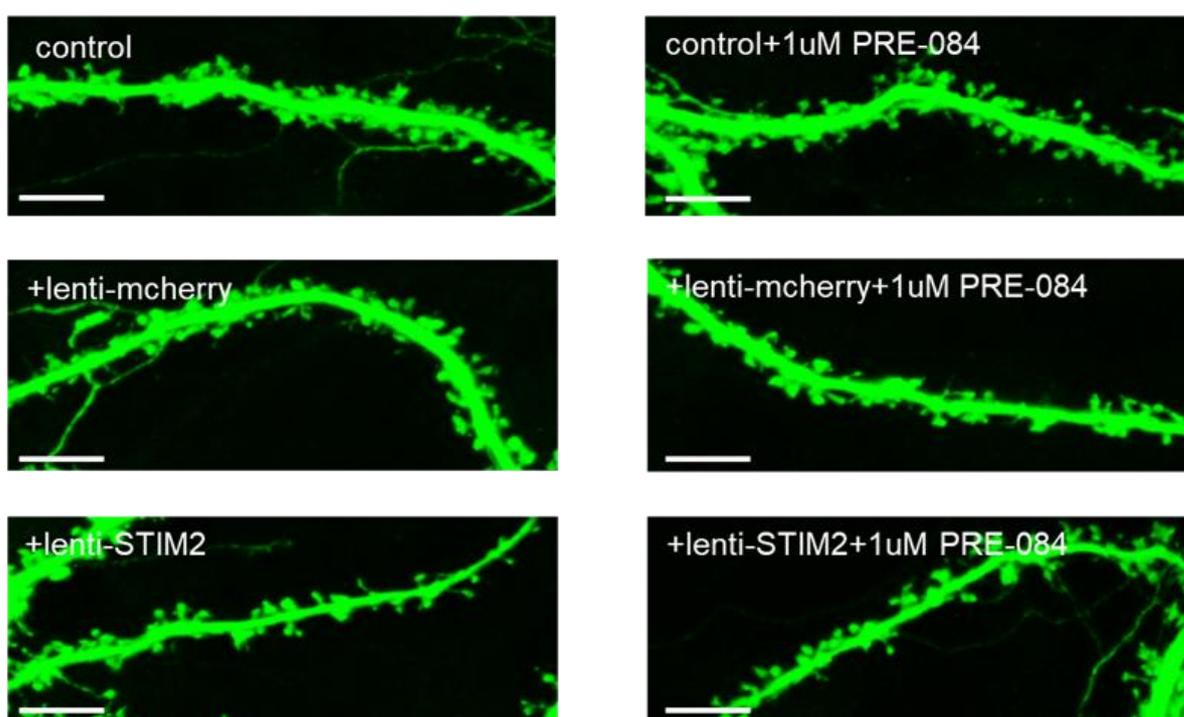


Рис. 10. Микрофотографии фрагментов дендритного дерева СШН в первичной кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей, иллюстрирующие влияние агониста сигма 1 рецептора на морфологию и плотность дендритных шипиков в условиях гиперэкспрессии белков семейства STIM. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры нейронов с антителами к белку DARPP32 (вторичные антитела Alexa 488). Конфокальная микроскопия, x100. Масштабная линейка 10 мкм.

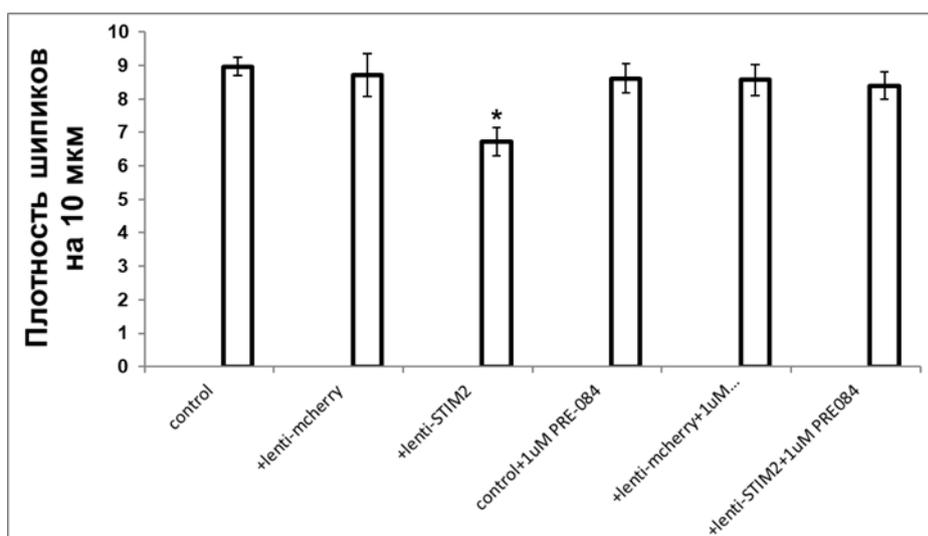


Рис. 11. Гистограмма, отражающие изменения плотности дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре после аппликации агониста сигма 1 рецептора, соединения PRE-084, на фоне гиперэкспрессии контрольного белка (mcherry) и белка STIM2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На клеточном уровне БХ характеризуется накоплением mHtt в клетках головного мозга. Функциональная роль Htt у человека до сих пор выяснена. В связи с этим, до сих пор не установлена однозначная связь между накоплением mHtt в нейронах стриатума и их селективной гибелью при БХ. Одна из возможных причин заключается в особенной чувствительности СШН к нарушению Ca^{2+} регуляции в данном типе клеток, что в долгосрочной перспективе приводит к их гибели. В частности, на мышинной модели БХ, было показано, что белок, ассоциированный с хантингтином 1 типа (HAP1), mHtt и IP3R1 формируют белковый комплекс на мембране ЭПР опосредующий избыточный выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо в результате повышения сродства IP3 к своему рецептору¹⁵. Снижение содержания Ca^{2+} в ЭПР приводит к нарушению фолдинга белков, накоплению и агрегации непроцессированных белков, вызывая ЭПР стресс. Для восполнения запасов Ca^{2+} в ЭПР запускается компенсаторный механизм

– ДУВК². На различных клеточных моделях БХ было выявлена повышенная активация данного биохимического пути, а также повышения уровня экспрессии белка STIM2, отвечающего за активацию данного биохимического пути^{2, 3, 16}. Кроме того, гиперактивация ДУВКа была продемонстрирована на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, полученных от пациентов с БХ¹⁷. Со временем, вследствие чрезмерной активации данного биохимического пути, компенсаторный механизм становится патологическим, поскольку Ca²⁺ начинает накапливаться в цитоплазме, в конечном итоге индуцируя апоптоз СШН.

Нарушения кальциевой регуляции в нейронах негативно сказывается на функционировании синапсов, в особенности на область постсинапса, которая представляет собой особый компартмент нейрональных клеток, функциональная активность которого во многом определяется внутриклеточной концентрацией. В предыдущих исследованиях нашей лаборатории было показано нарушение синаптической передачи между нейронами коры и стриатума, которое приводило к потере синаптических контактов, выражающееся в снижении плотности постсинаптических структур, называемых дендритными шипиками в нейронах стриатума на 21 день культивирования (DIV) в культурах, выделенных из мышей с моделью БХ по сравнению с культурами, выделенными из мышей дикого типа^{3, 18}.

В частности, потенциальной мишенью для терапевтического воздействия может является С1Р¹⁴. В данном исследовании было продемонстрировано, что терапевтический эффект придопидина, соединения которое в настоящий момент проходит клинические испытания как лекарственный препарат для терапии БХ, а также его структурный аналог, соединение 3-PPP, обусловлен воздействием на С1Р. Однако придопидин изначально был открыт как допаминовый стабилизатор и может иметь смешанную аффинность как к рецептору допамина 2 типа, так и к С1Р¹⁹. Для того, чтобы ответить на вопрос о непосредственной вовлеченности С1Р как в механизмы поддержания синаптических контактов при развитии кортико-

стриатной синаптической дисфункции при БХ, а также о непосредственной вовлеченности С1Р в регуляции нДУВКа в настоящей работе использовался высокоселективный агонист С1Р, соединение PRE-084, обладающее сродством только к данному рецептору, а также о его роли в регуляции нДУВКа была выполнена настоящая работа.

Полученными результатами указывают на непосредственную вовлеченность данного рецептора в механизмы стабилизации синаптических контактов при БХ. В частности оба соединения, как 3-PPP, так и PRE-084 оказывали одинаковый синаптопротекторный эффект, выражающийся в восстановлении количества синаптических контактов между нейронами коры и стриатума на клеточной модели БХ. Более того, было показано, что именно нДУВК является молекулярным механизмом, обуславливающим нейропротекторные свойства С1Р в нейронах стриатума. Ингибирование нДУВКа при активации С1Р с помощью агониста оказывает нейропротекторный эффект на модели БХ *in vitro*, что выражается в восстановлении количества дендритных шипиков, потеря которых наблюдается на самых ранних этапах развития данного заболевания в условиях гиперэкспрессии белка STIM2, а также повышении содержания Ca²⁺ в ЭпР, что необходимо для поддержания функциональной активности СШН.

Подводя итог можно заключить, нарушение Ca²⁺ сигналинга в СШН и, в частности, в дендритных шипиках, вследствие гиперактивации нДУВКа при развитии БХ нарушает функционирование синапсов и со временем приводит к их элиминации. С1Р ингибирует гиперактивность нДУВКа и предотвращает развитие кортико-стриатной синаптической дисфункции. Таким образом, С1Р собой перспективную терапевтическую мишень для лечения БХ, а агонисты рецептора могут иметь терапевтический потенциал при лечении БХ.

ВЫВОДЫ

1. Активации сигма 1 рецептора с помощью агонистов восстанавливает плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из трансгенных мышей линии YAC128 до уровня дикого типа. Аппликация антагониста сигма 1 рецептора не влияет на плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из трансгенных мышей линии YAC128. Одновременная аппликация агониста и антагониста сигма 1 рецептора повышает плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из трансгенных мышей линии YAC128, но не восстанавливает до уровня дикого типа. Аппликация лигандов сигма 1 рецептора не оказывает влияние на плотность дендритных шипиков нейронов стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей.
2. Активации сигма 1 рецептора с помощью высокоселективного агониста снижает интенсивность нейронального депо-управляемого входа кальция в дендритных шипиках нейронов стриатума в первичной кортико-стриатной культуре, выделенной из трансгенных мышей линии YAC128 до и не влияет на интенсивность данного биохимического пути в дендритных шипиках нейронов стриатума в первичной кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей.
3. Активации сигма 1 рецептора с помощью высокоселективного агониста восстанавливает содержание кальция в ЭпР нейронов стриатума в первичной культуре, выделенной из трансгенных мышей линии YAC128 и не влияет на содержание кальция в ЭпР нейронов стриатума в первичной культуре, выделенной из диких мышей.
4. Активации сигма 1 рецептора с помощью высокоселективного агониста восстанавливает плотность дендритных шипиков нейронов

стриатума в кортико-стриатной культуре, выделенной из диких мышей в условии гиперэкспрессии белка STIM2.

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

Публикации в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК:

1. Bol'shakova, A.V., Kraskovskaya, N.A., Gainullina, A.N., Kukanova E.O., Vlasova, O.L., Bezprozvanny, I.B. Neuroprotective Effect of σ 1-Receptors on the Cell Model of Huntington's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017. 164(2), P. 252-258
2. Большакова А.В., Красковская Н.А., Гайнуллина А.Н., Куканова Е.О., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Нейропротекторный эффект Сигма 1 рецептора на клеточной модели болезни Хантингтона. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2017. №3. С. 160-167.
3. Ryskamp D., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci*. 2019. 13(AUG):862.
4. Kraskovskaya N.A., Bolshakova A.V., Bezprozvanny I.B. Sigma 1 receptor restores dendritic spines of medium spiny neurons in Huntington disease in vitro model. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. T.50. Выпуск: 6. Стр: 553-554.

Публикации в других изданиях:

1. Н.А. Красковская, С.Р. Осбанова, И.Б. Безпрозванный, Корбан С.А. Сигма 1 рецептор и депо-управляемый вход кальция в нейронах стриатума. *Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии*. С.183.

2. Н.А. Красковская, А.В. Большакова, Е.О., О.Л. Власова, И.Б. Безпрозванный. Нейропротекторное действие агониста сигма 1 рецептора на модели болезни Хантингтона *in vitro*. *Acta Naturae*. Спецвыпуск. С.70.
3. Nina Kraskovskaya, Anastasia Bolshakova, Ekaterina Kukanova, Anastasia Gainullina, Olga Vlasova, Ilya Bezprozvanny. Neuroprotective effect of sigma 1 receptor in a cellular model of Huntington disease // *Neurodegenerative disease*. 2017. 17 (Suppl.1.). P. 1728
4. Kraskovskaya N.A., Bezprozvanny I.B. Sigma 1 receptor, store operated calcium entry and morphology of dendritic spines of medium spiny neurons. 2nd European Symposium on Physiopathology of sigma-1 receptors. Abstract book. P. 29.
5. Н.А. Красковская, А.В. Большакова. Исследование влияние активации сигма 1 рецептора на нейрональный депо-управляемый вход кальция на клеточной модели болезни Хантингтона// Материалы к научно-практической конференции с международным участием «Неделя Науки СПбПУ». СПб. 2017. С.136-139.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*. 1993; 72: 971-83.
2. Wu J, Shih HP, Vigont V, et al. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chem Biol*. 2011; 18: 777-93.
3. Wu J, Ryskamp DA, Liang X, et al. Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model. *J Neurosci*. 2016; 36: 125-41.
4. Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, et al. Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*. 2006; 126: 981-93.
5. Samtleben S, Wachter B and Blum R. Store-operated calcium entry compensates fast ER calcium loss in resting hippocampal neurons. *Cell calcium*. 2015; 58: 147-59.

6. Liou J, Kim ML, Heo WD, et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*. 2005; 15: 1235-41.
7. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*. 2005; 169: 435-45.
8. Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi YJ, Worley PF and Muallem S. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 337-43.
9. Zhang SL, Yu Y, Roos J, et al. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*. 2005; 437: 902-5.
10. Sun S, Zhang H, Liu J, et al. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron*. 2014; 82: 79-93.
11. Zhang H, Wu L, Pchitskaya E, et al. Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 2015; 35: 13275-86.
12. Zhang H, Sun S, Wu L, et al. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment. *J Neurosci*. 2016; 36: 11837-50.
13. Hayashi T and Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*. 2007; 131: 596-610.
14. Ryskamp D, Wu J, Geva M, et al. The sigma-1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*. 2017; 97: 46-59.
15. Tang TS, Tu H, Chan EY, et al. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*. 2003; 39: 227-39.
16. Vigont V, Nekrasov E, Shalygin A, et al. Patient-Specific iPSC-Based Models of Huntington's Disease as a Tool to Study Store-Operated Calcium Entry Drug Targeting. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 696.
17. Nekrasov ED, Vigont VA, Klyushnikov SA, et al. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Neurodegener*. 2016; 11: 27.
18. Artamonov DN, Korzhova VV, Wu J, et al. Characterization of Synaptic Dysfunction in an In Vitro Corticostriatal Model System of Huntington's Disease. *Biol Membrany*. 2013; 30: 276-88.
19. Sahlholm K, Arhem P, Fuxe K and Marcellino D. The dopamine stabilizers ACR16 and (-)-OSU6162 display nanomolar affinities at the sigma-1 receptor. *Mol Psychiatry*. 2013; 18: 12-4.