

На правах рукописи

Лыткина Ольга Александровна

**Сравнительный анализ функции альфа- и гамма-синуклеинов в
синаптических везикулах**

03.01.04 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательском институте общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук

Научные руководители: член-корр. РАН, доктор химических наук
Бачурин Сергей Олегович

доктор медицинских наук
Нинкина Наталья Николаевна

Официальные оппоненты: **Ярыгин Константин Никитич**
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной биологии

Шамакина Инна Юрьевна
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный научный центр наркологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая лабораторией психофармакологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Защита состоится « » _____ 2014 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ «ИБМХ» РАН) по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10 стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «ИБМХ» РАН
Автореферат разослан « » _____ 2014 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Активные исследования белков синуклеинов определяются важной ролью, которую эти белки, и прежде всего, альфа-синуклеин, играют в патогенезе ряда распространенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся образованием в тканях нервной системы больных специфического типа патогистологических включений – телец Леви, в составе которых альфа-синуклеин является основным компонентом и обнаруживается в агрегированном нерастворимом состоянии. Среди нейродегенеративных болезней, при которых отмечается патологическое накопление в клеточных депозитах аномальных форм альфа-синуклеина, – болезнь Паркинсона, деменции с тельцами Леви, мультисистемная атрофия и другие, менее распространенные заболевания. Поскольку эффективное лечение для данной группы заболеваний отсутствует, чрезвычайно актуальными представляются исследования, которые позволят определить молекулярные мишени для разработки патогенетической терапии альфа-синуклеинопатий. Данное исследование, направленное на изучение механизма взаимодействия белков семейства синуклеинов с синаптическими везикулами – принципиально важного элемента нейротрансмиссии, – является необходимым этапом для определения нормальной функции данных белков и их роли в патогенезе заболеваний с нарушенным метаболизмом синуклеинов.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось проведение сравнительного анализа функции альфа- и гамма-синуклеинов в синаптических везикулах. Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать связывание альфа- и гамма-синуклеинов с синаптическими везикулами и с белками, участвующими в синаптической нейротрансмиссии.
2. Провести сравнительный анализ способности гамма-синуклеина влиять на прогрессию нейродегенерации, обусловленной нарушением функции белка CSP-а в генетически модифицированных мышцах.

3. Выявить участие альфа- и гамма-синуклеинов в формировании синапс-подобных контактов при дифференцировке клеточных культур по нейрональному типу.

Научная новизна работы. Несмотря на обширные исследования белков семейства синуклеинов, проводимые различными лабораториями, полученные данные оказались недостаточными, чтобы даже на уровне гипотез была сформулирована концепция роли гамма-синуклеина в каскадных путях нейротрансмиссии. В данной диссертационной работе впервые проведен сравнительный биохимический и функциональный анализ альфа- и гамма-синуклеинов в синаптических везикулах. Получены новые данные о непосредственном взаимодействии гамма-синуклеина с синаптическими везикулами, причем эффективность взаимодействия оказалась такой же, как и выявленная ранее для альфа-синуклеина, что является первым указанием на возможную роль гамма-синуклеина в регуляции нейротрансмиссии. Было впервые установлено, что гамма-синуклеин, в отличие от альфа-синуклеина, не связывается с основными белками SNARE-комплекса в синапсах дофаминергических нейронов и, таким образом, имеет отличный от альфа-синуклеина механизм регуляции работы синапсов. Различия в функциональных механизмах, в которые вовлечены альфа- и гамма-синуклеины, были подтверждены в экспериментах с использованием новой созданной в данной работе линии трансгенных мышей с генетически инактивированным кошачаперонным CSP-а белком, принимающим участие в образовании синаптического SNARE-комплекса, и одновременно повышенной экспрессией в нервной системе гамма-синуклеина. Полученные новые данные позволили не только расширить знания о роли альфа- и гамма-синуклеинов в функционировании синаптических везикул, но и внести существенные коррективы в ранее принятую концепцию функционального замещения и дублирования функций альфа- и гамма-синуклеинами.

Практическая значимость. Высокая практическая значимость работы во многом определяется темой исследования. Проведенный сравнительный анализ

пресинаптических белков альфа- и гамма-синуклеинов в синаптических везикулах полосатого тела, в котором располагаются синапсы нейронов черной субстанции, позволил получить новые знания, необходимые для установления роли этих белков в патогенетических процессах, ассоциированных, прежде всего, с болезнью Паркинсона и другими, менее распространенными, но также неизлечимыми в настоящее время нейродегенеративными заболеваниями. Определение молекулярных мишеней дает потенциальную возможность наметить новую стратегию для создания эффективных болезнь-модифицирующих препаратов для коррекции синуклеинопатий. Кроме того, в процессе выполнения работы для достижения поставленных целей была создана уникальная линия бессинуклеиновых мышей – тройной генетический нокаут с инактивацией всех трех членов семейства синуклеинов. Данная линия представляет самостоятельный научно-практический интерес и уже используется в целом ряде других исследований.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Конференции по Программе «Фундаментальные науки – медицине» (Москва, Россия, 2012), на V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, Россия, 2012), на Международной конференции «Эффективные инструменты современной науки – 2012» (Прага, Чехия, 2012), на Всероссийской молодежной конференции «Медицинские основы жизнедеятельности организма в норме, патологии и эксперименте» (Омск, Россия, 2012), на 17-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых, (Пущино, Россия, 2013), на III Конференции молодых ученых ИФАВ РАН (Черноголовка, Россия, 2013), на I Национальной конференции с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике» (Москва, Россия, 2014).

Публикации и личный вклад автора. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи и 7 публикаций в сборниках докладов научных конференций. Личный вклад автора в получении результатов является

определяющим. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работ, сделанных в соавторстве с научными руководителями.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах, иллюстрирована 29 рисунками и 1 таблицей. Список цитируемой литературы включает 156 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе использовали линии генетически модифицированных мышей. Всего было использовано 4 линии с направленной инактивацией генов (генетические нокауты) и 1 линия с повышенной эктопической экспрессией гена (конвенционный трансген). Мыши, нокаутные по гену альфа-синуклеина (α -KO), были получены из лаборатории A. Rosenthal (Genentech, США). Мыши, нокаутные по гену бета-синуклеина (β -KO) и CSP-а, были получены из лаборатории T. Sudhof (Genentech, США). Мыши, нокаутные по гену гамма-синуклеина (γ -KO), и линия трансгенных мышей $Thy1m\gamma^{tg}$ были получены из лаборатории V. Buchman (Кардиффский университет, Великобритания). Все оригинальные и полученные в ходе работы новые линии мышей вели на генетическом фоне C57Bl6J. В качестве контрольных животных использовали линию C57Bl6J.

Колонии экспериментальных и контрольных мышей содержали в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 часов светлого времени, 12 часов темного времени). Работы с животными проводили в соответствии с "Правилами лабораторной практики в Российской Федерации" от 2003 г.

Генотипирование. Геномную ДНК выделяли из биопсий уха животных с помощью набора DiatomTM DNA Prep 200 (ООО "Лаборатория ИзоГен", Россия). Генотипирование нокаутных животных проводили методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим разделением амплифицированных фрагментов ДНК в агарозном геле. Определение количества трансгенных аллелей в геноме мышей линии Thy1my^{tg} и линии CSP-a/Thy1my^{tg} проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени на установке StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия).

Получение синаптических везикул. Синаптические везикулы выделяли из полосатого тела мозга мышей. Ткани полосатого тела гомогенизировали на льду в 10 объемах буфера, содержащего 0,32 М сахарозы, 5 мМ HEPES (pH 7.4) и ингибитор протеаз (Complete mini EDTA-free protease inhibitors, Roche Applied Science). Клеточный дебрис и ядра отделяли центрифугированием при 1000×g, 10 минут при 2°C. Полученный супернатант центрифугировали при 20000×g 20 минут при 2°C для осаждения синаптосомальной фракции. Осадок ресуспендировали на вортексе в 0,32 М сахарозе, переносили в стеклянный (glass-Teflon) гомогенизатор и добавляли 4 объема холодной бидистиллированной воды для осмотического вскрытия синаптосом и высвобождения везикул, гомогенизировали и инкубировали на льду в течение 5 минут. Далее добавляли 0,25 М HEPES (pH 7.4) и 1 М тартрата калия до конечной концентрации 25 и 100 мМ, соответственно, и центрифугировали синаптосомальный лизат в течение 20 минут при 20000×g при 2°C для осаждения вскрытых синаптосом. Супернатант, содержащий синаптосомальные везикулы, центрифугировали 40 минут при 120000×g при 2°C для осаждения везикул (рис 1). Полученный осадок, содержащий синаптические везикулы, ресуспендировали в буфере для внесения и денатурировали кипячением в течение 5 минут, замораживали и использовали для анализа в денатурирующем полиакриламидном геле.

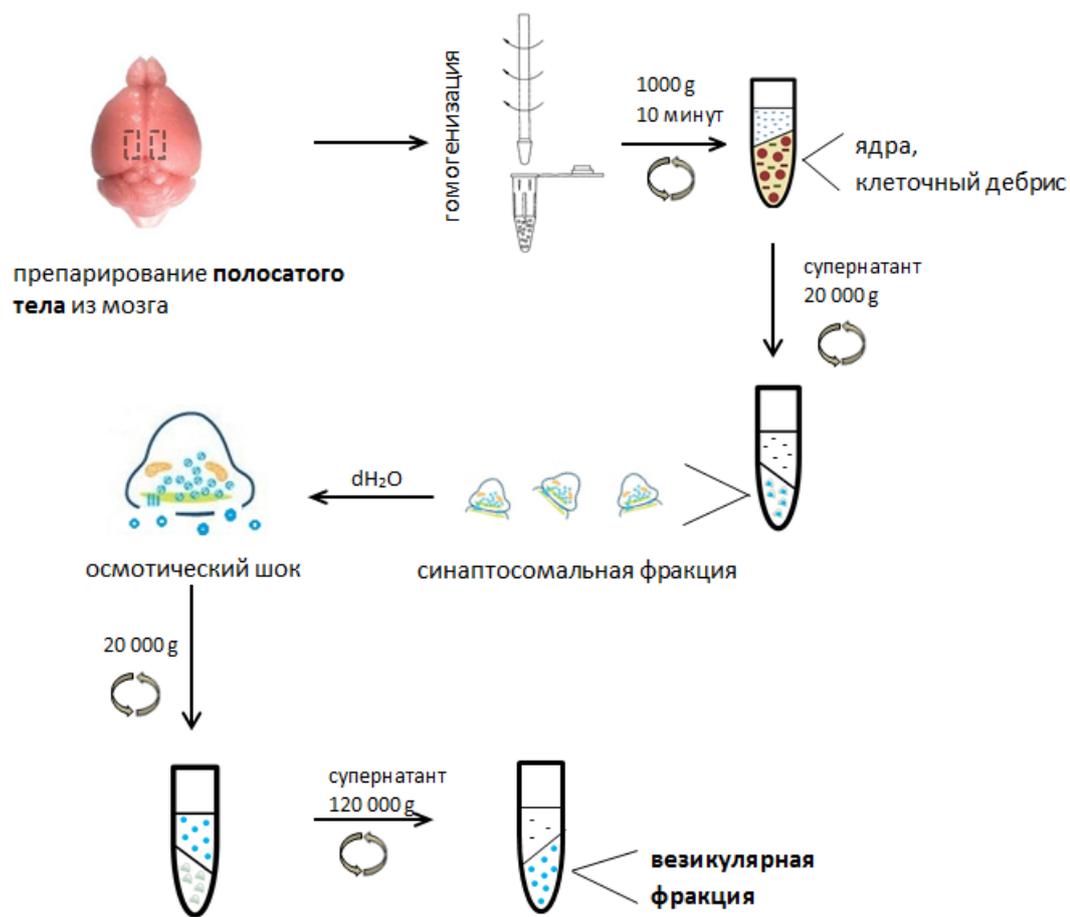


Рисунок 1 – Схема выделения синаптических везикул

Анализ белков методом иммуноблоттинга. Анализируемые образцы разделяли в полиакриламидном геле, содержащем 10-16% акриламида/бисакриламида 1:30 (Sigma, США) в зависимости от размера анализируемых белков. После разделения в геле белки окрашивали Кумасси или фиксировали для последующего иммуноблоттинга.

Для иммуноблоттинга белки из геля переносили на Hybond-P мембрану (Amersham, Великобритания) в приборе для полусухого переноса, после чего мембрану инкубировали с первичными антителами к исследуемым белкам: гамма-синуклеину – кроличьи поликлональные, клон SK23, полученные из лаборатории V. Buchman, (разведение 1:500), альфа-синуклеину – мышинные моноклональные, клон Syn211, Santa Cruz Biotechnology (разведение 1:500), синаптофизину – мышинные моноклональные, клон 2, BD Transduction

Laboratories (разведение 1:5000), SNAP-25 – мышинные моноклональные, клон 20, BD Transduction Laboratories (разведение 1:1000), синиптобревину/VAMP2 – мышинные моноклональные, клон 69.1 (разведение 1:3000), синтаксину-1 – мышинные моноклональные, клон 78.2 (разведение 1:2000), CSP-а – кроличьи поликлональные, Santa Cruz Biotechnology (разведение 1:1000). После инкубации мембраны отмывали и инкубировали с соответствующими вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика (разведение 1:3000) или мыши (разведение 1:2000), конъюгированными с пероксидазой хрена (GE Healthcare). Количественную оценку иммунных комплексов проводили с помощью метода хемилюминесценции (реагент ECL+, Amersham, Великобритания). Интенсивность свечения полос оценивали с помощью программного пакета AlphaImager 2200 (AlphaInnotech Corporation, США).

Получение рекомбинантных синуклеинов. Кодированные области альфа- и гамма-синуклеинов человека и их химерные варианты – ga- и ag-синуклеины – клонировали в экспрессионный вектор pRK172 или pGEX4T-1 (GE Healthcare, UK). Полученными плазмидами трансформировали бактериальную систему *Escherichia coli* BL21(DE). Очистку рекомбинантных синуклеинов проводили по протоколу для выделения термостабильных белков с модификациями. В случае GST-конъюгированных синуклеинов кипячение не проводили. После ультразвуковой обработки бактериальных лизатов к полученному осветленному супернатанту добавляли 1/6 объема глутатион-сефарозы 4B (GE Healthcare, UK), инкубировали при 4°C в течение 2 часов при медленном вращении, отмывали частицы сефарозы 4 раза холодным PBS с центрифугированием при 1000×g 1 минуту и использовали отмывые частицы сефарозы в экспериментах GST pull-down.

Клеточные культуры. Адгезивная перевиваемая клеточная линия нейробластомы человека (SH-SY5Y) была получена из Европейской коллекции клеточных культур (European Collection of Cell Cultures – ECACC), каталожный № 94030304. Культуру SH-SY5Y вели, не допуская монослоя, перевивая каждые 3-4 дня. Проводили не более 20 пассажей, после чего использовали

новую аликвоту. Дифференцировку клеточных культур по нейрональному типу проводили добавлением ретиноевой кислоты в культуральные среды до конечной концентрации 10 мкМ (All-trans retinoic acid, Sigma, США).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линии бессинуклеиновых мышей. Создание линии мышей, не имеющих собственных эндогенных синуклеинов, проводили в два этапа. На первом этапе в серии перекрестных скрещиваний между мышами нокаутных линий α -КО и γ -КО была получена линия двойного нокаута по генам альфа- и гамма-синуклеинов – $\alpha\gamma$ -КО. В первом раунде скрещивания все полученное потомство было гетерозиготным по каждой из аллелей. Этих животных скрещивали между собой и, в соответствии с менделевским типом наследования, во втором поколении получали девять возможных генотипов, при этом вероятность получения двойных нокаутов при скрещивании двойных гетерозигот составляла 1/16. После генотипирования всех доживших до половозрелого возраста 337 потомков было выявлено 19 особей с генотипом $\alpha\alpha\gamma\gamma$ (нокаутных по генам альфа- и гамма-синуклеинов) – $\alpha\gamma$ -КО.

На втором этапе проводили скрещивание полученных двойных нокаутов с мышами нокаутной линии β -КО, в результате чего все потомки первого поколения получались гетерозиготными по каждому из трех аллелей (AaBbGg). Далее проводили скрещивание между собой полученных гетерозиготных по локусам всех трех синуклеинов мышей. Гены, кодирующие три типа синуклеинов как у человека, так и у мыши находятся на разных хромосомах. В результате такого скрещивания ожидается получение среди потомков 27 вариантов генотипов, причем вероятность получения варианта с мутированными синуклеинами в гомозиготном состоянии для всех трех генов

(aabbgg) составляет 1/64. Было получено и прогенотипировано 581 взрослое животное, среди которых обнаружено 9 особей с генотипом aabbgg: 5 самок и 4 самца. Далее колония бессинуклеиновых мышей $a^{-/-}b^{-/-}g^{-/-}$ была размножена и велась как отдельная линия, что не требовало постоянного генотипирования. При этом периодически проводился проверочный анализ ДНК у основных производителей. В отдельную суб-линию была выведена группа животных с немодифицированным геномом AABBBGG (WT), которая использовалась далее в качестве контрольной. В процессе данной работы были получены также три колонии двойных нокаутов, которые имели лишь один из трех синуклеинов: bg-КО, ag-КО и ab-КО. Животные всех полученных линий были фертильны и по показателям роста и другим основным внешним признакам не отличались от контрольных животных дикого типа. Иммуноблоттинг препаратов тотального белка, полученных из тканей нервной системы взрослых животных бессинуклеиновой линии ($a^{-/-}b^{-/-}g^{-/-}$), подтвердил отсутствие всех трех синуклеинов (Рис. 2).

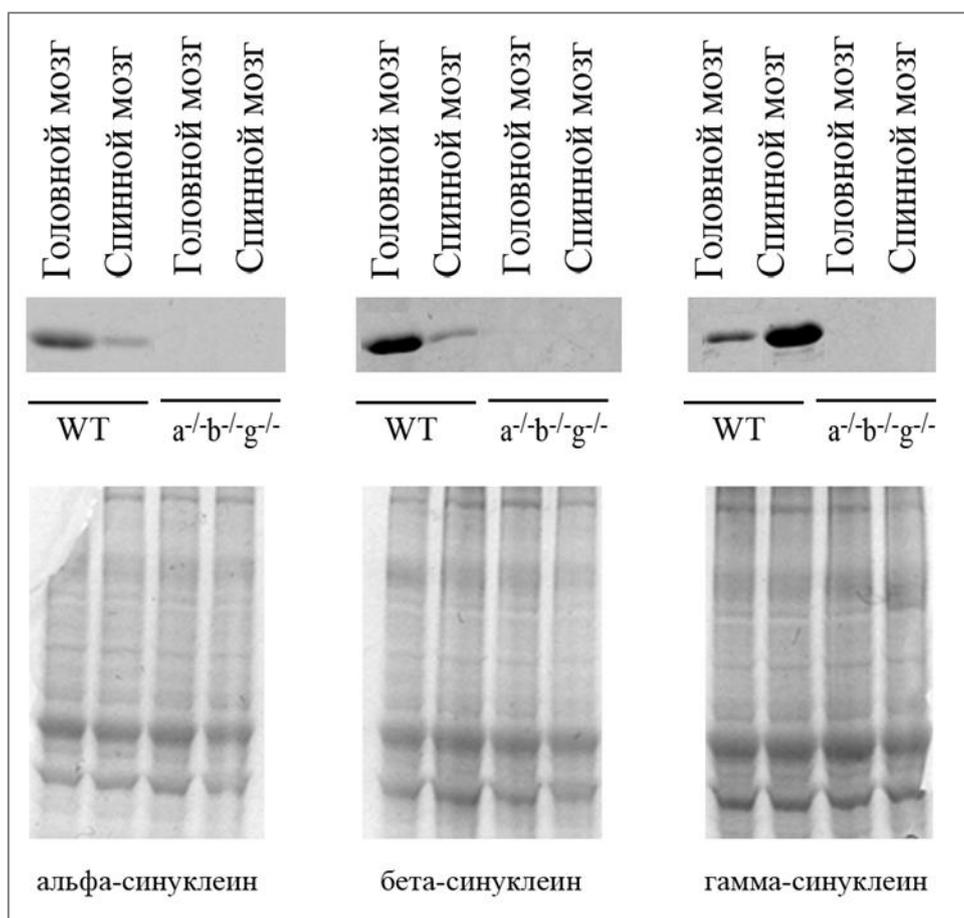


Рисунок 2 – Анализ синуклеинов в тканях головного и спинного мозга нокаутных ($a^{-/-}b^{-/-}g^{-/-}$) и контрольных (WT) мышей методом иммуноблоттинга.

На нижней панели окраска реагентом GelCode остаточного белка в геле после переноса на мембрану.

Анализ связывания рекомбинантного гамма-синуклеина с синаптическими везикулами бессинуклеиновых мышей. Нормальные функции синуклеинов остаются неизвестными, несмотря на многочисленные данные об участии этих белков в различных клеточных процессах. Генетическая инактивация синуклеинов у модельных мышей не сопровождается ярко выраженным фенотипом, но приводит к постепенному развитию синаптической дисфункции у стареющих животных. Ранее было установлено, что альфа-синуклеин способен связываться с везикулярными

структурами, обеспечивающими нейротрансмиссию. Более того, было показано прямое взаимодействие альфа-синуклеина с белками SNARE-комплекса, которые играют ключевую роль в строго регулируемом процессе слияния везикул, содержащих нейромедиаторы, с пресинаптической мембраной в нейрональных синапсах.

Структурное сходство альфа- и гамма-синуклеинов, их преимущественно нейрональная экспрессия и при этом пресинаптическая локализация позволяют предполагать, что гамма-синуклеин также может быть вовлечен в процессы нейротрансмиссии. И хотя было накоплено уже достаточно данных, указывающих на важную роль гамма-синуклеина в функционировании nigrostriарной системы, дофаминового обмена и формировании поведенческих реакций, изучения непосредственного механизма действия этого пресинаптического белка в нейротрансмиссии ранее не проводилось. В данной работе нами было выполнено сравнительное исследование взаимодействия рекомбинантных альфа- и гамма-синуклеинов с синаптическими везикулами. Препараты очищенных везикул синаптосомальной фракции были получены из тканей бессинуклеиновых мышей ($\alpha^{-/-}\beta^{-/-}\gamma^{-/-}$), что позволило исключить возможный вклад эндогенных синуклеинов в исследуемые процессы белкового связывания. Препараты везикул получали из тканей полосатого тела головного мозга – структуры, где располагаются синапсы дофаминергических нейронов черной субстанции и где наблюдаются выраженные дегенеративные изменения у пациентов с болезнью Паркинсона. К препаратам синаптических везикул добавляли рекомбинантный альфа-синуклеин, или гамма-синуклеин, или их химерный вариант га-синуклеин, который использовали для сравнения эффективности связывания гамма-синуклеина с эффективностью связывания альфа-синуклеина. Химерный га-синуклеин содержит большую часть молекулы гамма-синуклеина, включая NAC-область (аминокислоты с 1 по 95), и C-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (аминокислоты с 95 по 140) (Рис. 3) и узнается антителами как против альфа-, так и против гамма-синуклеина. После инкубации везикул с синуклеинами связанные везикулы

осаждали ультрацентрифугированием, промывали и анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против альфа- или гамма-синуклеинов (Рис. 3).

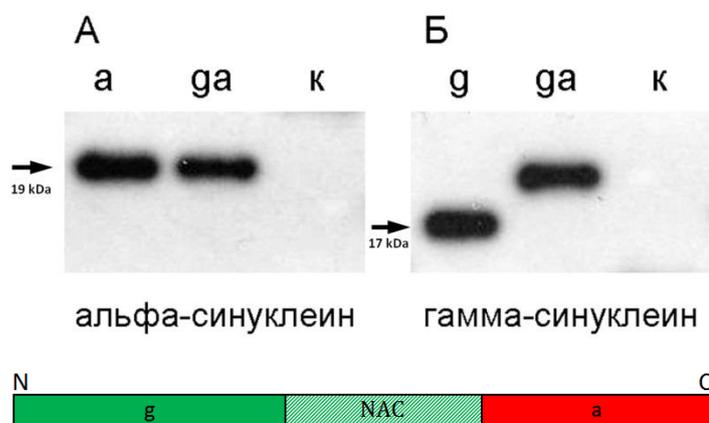


Рисунок 3 – Связывание синуклеинов с очищенной фракцией синаптических везикул из лизатов тканей полосатого тела мозга бессинуклеиновых мышей.

Иммуноблоттинг препаратов везикул после инкубации с альфа- (а), гамма- (g) или химерным (ga) синуклеинами или без добавления синуклеинов (К).

А – детекция антителами к альфа-синуклеину и Б – детекция антителами к гамма-синуклеину.

Было показано, что гамма-синуклеин способен связываться с везикулярными структурами также, как и альфа-синуклеин. Использование химерного ga-синуклеина позволило сделать вывод, что гамма-синуклеин способен взаимодействовать с синаптическими везикулами с такой же эффективностью, как и альфа-синуклеин, поскольку при уравненных интенсивностях сигнала на рентгеновской пленке для ga-синуклеина, связавшегося с везикулами, интенсивность сигнала для альфа- и гамма-синуклеинов были одинаковы (Рис. 3).

Анализ связывания гамма-синуклеина с белками SNARE-комплексов. В работах Т. Sudhof с соавторами было показано, что альфа-синуклеин способствует более эффективному формированию и сборке белковых SNARE-комплексов, обеспечивающих стыковку синаптических везикул с

пресинаптической мембраной и, таким образом, в регуляции процесса слияния мембран для высвобождения нейромедиатора из везикул. Именно SNARE-комплексы являются мишенями для многих нейротоксинов, что делает их исключительно важными молекулярными мишенями при разработке новых соединений для коррекции патологий нейротрансмиссии. Альфа-синуклеин эффективно связывается с рядом белков SNARE-комплекса и тем самым стимулирует его сборку. Роль гамма-синуклеина в формировании SNARE-комплекса ранее не исследовалась. Нами был проведен сравнительный анализ взаимодействия гамма- и альфа-синуклеинов с принципиально важными в формировании нейрональных SNARE-комплексов белками: VAMP2 (синаптобревином 2), SNAP-25 и синтаксином-1, с использованием рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов. Для их получения были сконструированы экспрессионные плазмиды на основе pGEX4T-1 вектора. Синтезированные в бактериальной системе GST-конъюгированные синуклеины были аффинно очищены (Рис. 4). Помимо конъюгированных альфа- или гамма-синуклеинов человека были получены два их химерных варианта: ag-синуклеин кодировал аминокислотные последовательности альфа-синуклеина с 1 по 95, включая NAC-домен, за которыми следовал С-конец гамма-синуклеина человека; ga-синуклеин кодировал аминокислотные последовательности гамма-синуклеина с 1 по 95, включая NAC-домен, за которыми следовал С-конец альфа-синуклеина человека (Рис. 4).

Для инкубации с везикулами в грубой синаптосомальной фракции использовали рекомбинантные GST-конъюгированные синуклеины, аффинно ассоциированные с частицами глутатион-сефарозы. После инкубации отмывали частицы от не связавшихся белков и анализировали белковые комплексы, которые связались с GST-конъюгированными рекомбинантными синуклеинами. Анализ белков в pulldown фракции проводили методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител против VAMP2, SNAP-25 и синтаксина-1.

	ga	+	+	+	+
	ag	-	-	-	+
	a	+	+	+	+
	g	-	-	-	+

Рисунок 4 – Связывание синуклеинов с белками SNARE-комплексов синаптических везикул из лизатов ткани полосатого тела мозга бессинуклеиновых мышей.

Слева показана доменная структура рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов: красным цветом обозначены последовательности альфа-синуклеина, зеленым – гамма-синуклеина. Справа в таблице приведены результаты их связывания с белками SNARE-комплекса и синаптическими везикулами.

Ранее было показано, что альфа-синуклеин способен эффективно связываться с VAMP2. В нашей системе альфа-синуклеин также связывался с VAMP2, в то время как гамма-синуклеин оказался к этому неспособен. Причем связывание альфа-синуклеина осуществлялось за счет С-концевой части молекулы (аминокислоты с 95 по 140), поскольку химерный синуклеин, содержащий большую часть молекулы гамма-синуклеина и лишь С-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (ga-синуклеин), был способен связываться с везикулами (Рис. 4). При этом ag-синуклеин, содержащий большую часть альфа-синуклеина, включая NAC-домен, но С-концевую часть гамма-синуклеина, не связывался с VAMP2. Два других белка SNARE-комплекса – SNAP-25 и синтаксин-1, также связывались только с альфа-синуклеином и химерным синуклеином, содержащим С-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (Рис. 4).

Таким образом, мы показали, что белок гамма-синуклеин не связывается с белками SNARE-комплекса, а связывание альфа-синуклеина с данными белками происходит за счет С-концевого домена альфа-синуклеина. Эти результаты указывают на то, что функция гамма-синуклеина в синапсах отлична от функции в них альфа-синуклеина, при том, что гамма-синуклеин способен взаимодействовать с синаптическими везикулами.

Исследование эффекта повышенной продукции гамма-синуклеина на прогрессию нейродегенеративного процесса, вызванного нарушением функции CSP-а. Ранее было установлено, что альфа-синуклеин в высоких концентрациях способен модулировать функцию ко-шаперонного пресинаптического белка CSP-а (cysteine string protein alpha), который связывается со SNARE-комплексом. Эти данные были получены на линии мышей, у которых генетически инактивирован пресинаптический белок CSP-а. CSP-а нокаутные животные погибали в раннем постнатальном периоде на фоне выраженной неврологической симптоматики. Инактивация белка CSP-а приводила к нарушению эффективного формирования SNARE-комплексов и существенному снижению содержания белка SNAP-25. Считается, что именно снижение уровня SNAP-25 является основной причиной синаптической дисфункции с последующей гибелью синапсов и развитием прогрессивного нейродегенеративного процесса в данной модели. Введение в геном CSP-а нокаутных мышей трансгенной кассеты, содержащей альфа-синуклеин, обеспечивающее его повышенную экспрессию в нервной системе модельных животных, эффективно предотвращало развитие нейродегенеративного процесса, вызванного нарушением функции CSP-а, и приводило к существенному увеличению продолжительности жизни этих животных.

Для того чтобы выяснить, способен ли гамма-синуклеин так же, как и альфа-синуклеин, модулировать недостаточность функции CSP-а, нами была получена линия мышей, у которых в геноме отсутствовал ген белка CSP-а и одновременно экспрессировался на высоком уровне гамма-синуклеин. В серии

скрещиваний CSP-а нокаутных мышей с трансгенными по гамма-синуклеину мышами были отобраны особи, в геноме которых трансгенная кассета для экспрессии гамма-синуклеина содержалась в гомозиготном состоянии. При этом использованный Thy1 промотор позволял получать экспрессию гамма-синуклеина специфически в нервной системе. В группах экспериментальных животных с генотипами $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$, $CSP-a^{+/+}/Thy1m\gamma^{tg}$ и в контрольной группе WT C57Bl6J регистрировали вес, начиная с раннего постнатального периода, и продолжительность жизни (Рис. 5).

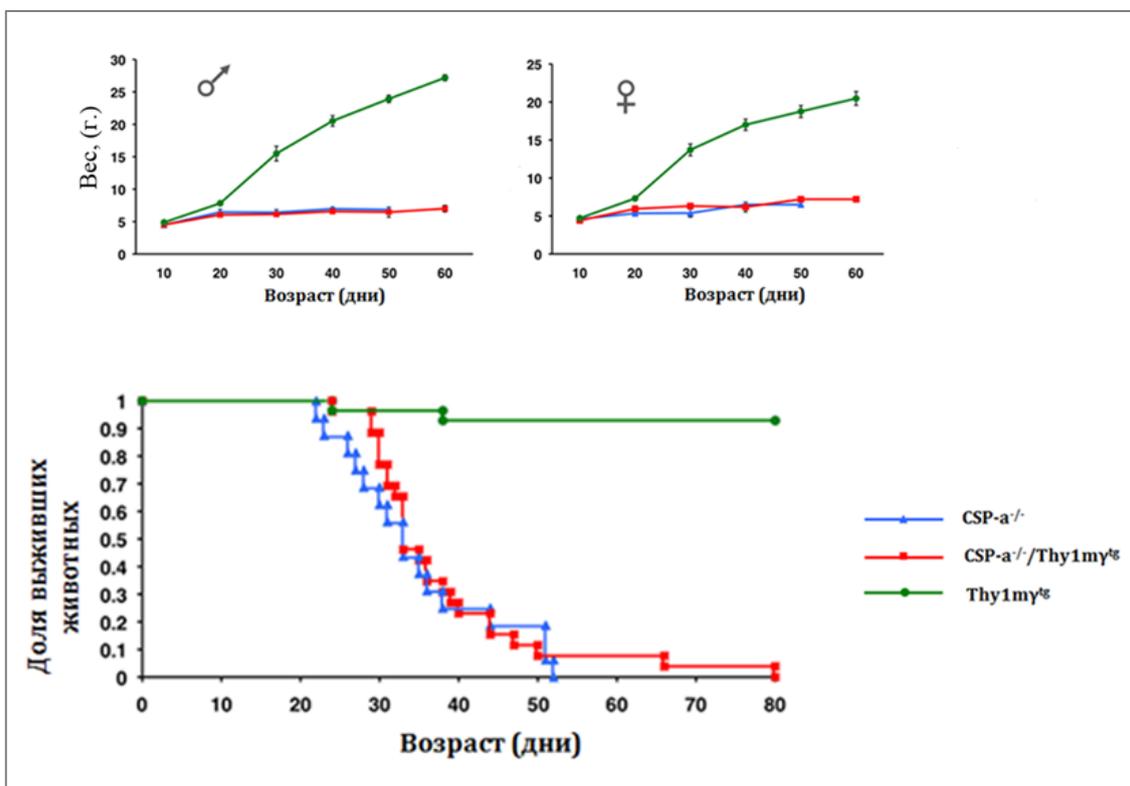


Рисунок 5 – Анализ прироста массы тела и выживаемости мышей линий $Thy1m\gamma^{tg}$, $CSP-a^{-/-}$ и $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$)

Животные в группе $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$ прекращали набирать вес после двенадцатого дня постнатального развития и погибали, не достигая пубертатного возраста, аналогично тому, как это было ранее описано для линии CSP-а нокаутных мышей. 50% животных в группе $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$ погибали к 34-му постнатальному дню, и лишь менее 10% доживали до 80-го дня. Причем

это было показано как для самцов, так и для самок. Таким образом, показатели динамики постнатального развития мышей $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$ не отличались от таковых для линии нокаутных по $CSP-a$ мышей с нормальной экспрессией гамма-синуклеина (Рис. 5). Эти данные позволили сделать вывод, что повышенная экспрессия экзогенного гамма-синуклеина в нервной системе $CSP-a$ нокаутных мышей не влияет на прогрессию нейродегенеративного процесса и, таким образом, гамма-синуклеин имеет отличный от альфа-синуклеина механизм модуляции процессов, ассоциированных с функционированием кошаперонного белка $CSP-a$, связывающегося со SNARE-комплексом.

Важным представлялся вопрос, достаточно ли высока концентрация эктопического гамма-синуклеина непосредственно в синапсах $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$ мышей. То, что уровень эктопического гамма-синуклеина высок в телах и в отростках нейронов, ранее было показано в ряде работ по анализу этой линии. Однако уровень содержания эктопического гамма-синуклеина в синапсах этих мышей по сравнению с нормальным физиологическим изучен не был. Проведенный методом иммуноблоттинга сравнительный анализ содержания гамма-синуклеина в синаптических везикулах полосатого тела мозга $CSP-a^{-/-}/Thy1m\gamma^{tg}$ мышей и мышей дикого типа показал, что уровень гамма-синуклеина в образцах, полученных от трансгенных животных, существенно превышал уровень этого белка в образцах контрольных животных при нормировании на содержание референтного синаптического белка синаптофизина (Рис. 6).

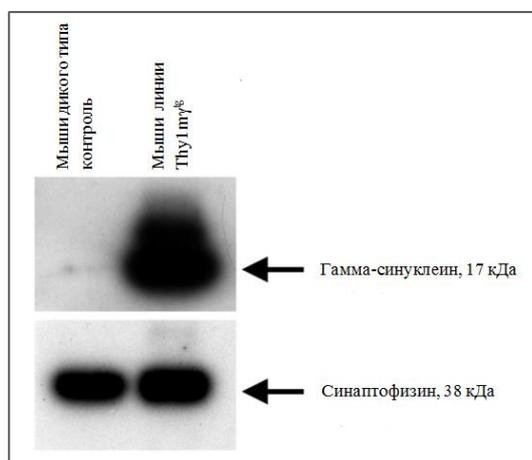


Рисунок 6 – Детекция гамма-синуклеина во фракции очищенных везикул из синаптосомальных фракций $Thy1m\gamma^{tg}$ и контрольных мышей.

Таким образом, мы показали, что высокие количества гамма-синуклеина в синапсах не обеспечивают реверсию фенотипа CSP-а нокаутных мышей. Несмотря на структурные сходства между альфа- и гамма-синуклеином, их функции в пресинаптических окончаниях разделены и не дублируются.

Гамма-синуклеин в дифференцированной по нейрональному типу культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Культура клеток стабильно перевиваемой нейробластомы человека SH-SY5Y является удобной системой для анализа молекулярных механизмов дифференцировки по нейрональному типу. В терминально дифференцированных культурах нейробластомы SH-SY5Y синтезируются белковые маркеры нейронов, начинается продукция дофамина и детектируется передача сигнала. Нами было исследовано участие альфа- и гамма-синуклеинов в формировании синапс-подобных структур в клетках нейробластомы SH-SY5Y при дифференцировке, индуцированной ретиноевой кислотой (Рис. 7). К очищенным везикулярным фракциям из дифференцированных и недифференцированных культур добавляли рекомбинантные белки альфа- или гамма-синуклеины, инкубировали на холоду, отмывали от не связавшихся белков и детектировали связавшиеся синуклеины методом иммуноблоттинга, как и в случае анализа везикул полосатого тела. Результаты этих экспериментов показали, что в дифференцированных культурах присутствует фракция, соответствующая синаптическим везикулам, на что указывает наличие в ней белка VAMP2. Более того, эти структуры способны связываться с рекомбинантными альфа- и гамма-синуклеинами, подобно везикулам, выделенным нами из тканей полосатого тела головного мозга мышей (Рис. 7).

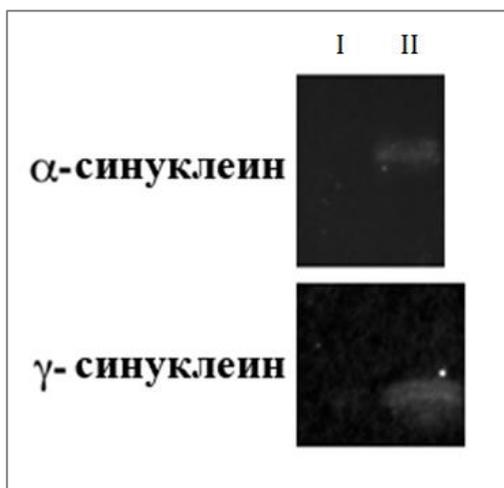


Рисунок 7 – Детекция альфа- и гамма-синуклеинов во фракции синаптических везикул, выделенных из культуры клеток нейробластомы.

I – недифференцированная клеточная культура SH-SY5Y;

II – дифференцированная клеточная культура SH-SY5Y.

Таким образом, мы показали, что при дифференцировке клеточных культур по нейрональному типу и формировании синапс-подобных структур активируется синтез альфа- и гамма-синуклеинов, которые компартментализованы в везикулах. Эти данные являются дополнительным подтверждением того, что синуклеины выполняют определенную функцию в везикулярных структурах синапсов.

Выводы

1. Получена линия бессинуклеиновых мышей, в геноме которых инактивированы альфа-, бета- и гамма-синуклеины (тройной нокаут), что позволяет исключить влияние эндогенных синуклеинов при исследовании взаимодействия этих белков со структурами и белками лизатов тканей животных.
2. С использованием рекомбинантных альфа- и гамма-синуклеинов, а также их химерных вариантов показано, что гамма-синуклеин способен связываться с синаптическими везикулами из тканей полосатого тела бессинуклеиновых мышей так же эффективно, как и альфа-синуклеин.
3. Связывание альфа-синуклеина с белками SNARE-комплекса осуществляется через С-концевой домен молекулы и не зависит от NAC-домена и N-концевых доменов.
4. Гамма-синуклеин, имеющий отличный от альфа-синуклеина С-концевой домен, не способен связываться с белками SNARE-комплекса.
5. Создана новая линия трансгенных мышей, в геноме которых инактивирован ко-шаперон CSP-а и при этом повышена экспрессия гамма-синуклеина в нервной системе, и показано, что повышенная экспрессия экзогенного гамма-синуклеина в нервной системе CSP-а нокаутных мышей не приводит к замедлению прогрессии нейродегенеративного процесса, вызванного нарушением функции этого ко-шаперонного белка.
6. При дифференцировке клеточных культур по нейрональному типу и формировании синапс-подобных структур активируется синтез альфа- и гамма-синуклеинов, которые компарментализованы в везикулах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Хританкова И.В., Кухарский М.С., **Лыткина О.А.**, Бачурин С.О., Шоринг Б.Ю. Активация компонентов аутофагосомной системы под действием димебона в культуре клеток нейробластомы человека // Доклады академии наук. – М., 2012. – Т. 446. – № 4. С. 471-473.
2. Ninkina N., Peters O.M., Connor-Robson N., **Lytkina O.**, Sharfeddin E., Buchman V.L. Contrasting effects of alpha-synuclein and gamma-synuclein on the phenotype of cysteine string protein alpha (CSPalpha) null mutant mice suggest distinct function of these proteins in neuronal synapses // J Biol Chem. – 2012. – V. 287. – № 53. – P. 44471-7.
3. Кухарский М.С., Хританкова И.В., **Лыткина О.А.**, Овчинников Р.К., Устюгов А.А., Шелковникова Т.А., Брновицкий Е.В., Кохан В.С., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Разработка клеточной модели TDP43-протеинопатии для поиска подходов к патогенетической терапии фронтотемпоральной лобарной дегенерации // Патогенез. – М., 2013. – Т.11. – №1. С. 53-60.
4. **Лыткина О. А.**, Тарасова Т. В., Хританкова И. В., Анохин П. К., Кухарский М. С., Устюгов А. А., Бачурин С. О. Связывание гамма-синуклеина с синаптическими везикулами происходит без взаимодействия с белками SNARE-комплекса // Доклады академии наук. – М., 2014. – Т. 456. – №5. С. 610-612.
5. Khritankova I.V., **Lytkina O.A.**, Kukharskiy M.S. Dimebon stimulates activation of autophagy-related events in cell culture.//Эффективные инструменты современной науки. Прага. Чехия. 27 апреля – 5 мая. 2012. С.17-20.
6. О.Д. Разинская, Т.В. Тарасова, **О.А. Лыткина**, М.С. Кухарский, А.П. Смирнов, Е.А. Ковражкина Анализ сыворотки крови пациентов с БАС на присутствие аутоантител к потенциально амилоидогенному белку гамма-

синуклеину.// Медицинские основы жизнедеятельности организма в норме, патологии и эксперименте. Омск. Россия. 5-6 сентября. 2012. С 97-98.

7. А.А. Устюгов, О.Д. Разинская, А.П. Смирнов, **О.А. Лыткина**, Е.А. Ковражкина – Анализ локуса C9orf72 у пациентов с БАС в московской популяции. //V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых Симбиоз-Россия. Тверь. Россия. 3-8 декабря. 2012. С. 262-263.
8. Н.Н. Нинкина, А.В. Дейкин, А.Б. Еляков, Т.Г. Ермолкевич, Т.В. Тарасова, **О.А. Лыткина**, О.Д. Разинская, Е.А. Ковражкина, С.О. Бачурин Создание модели бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека. //Конференция по Программе «Фундаментальные науки – медицине». Раздел «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы». Москва, Россия.1-2 ноября. 2012. С.43-44.
9. **О.А. Лыткина**, М.С. Кухарский, Т.В. Тарасова, Р.К. Овчинников, Т.А. Шелковникова Выявление аутоантител к склонным к агрегации рекомбинантным белкам в сыворотке крови больных БАС. //Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, Россия. 21-26 апреля. 2013. С. 278-279.
10. **О.А. Лыткина** Взаимодействие гамма-синуклеина с синаптическими везикулами и белками SNARE комплекса.//III Конференция молодых ученых ИФАВ РАН. Черноголовка. Россия 25 ноября. 2013. С. 14.