

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологически активных веществ Российской академии наук и
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-
исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
Российской академии медицинских наук

На правах рукописи

Лыткина Ольга Александровна

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

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Член-корреспондент РАН,
доктор химических наук,
профессор
Бачурин С.О.

Доктор медицинских наук
Нинкина Н.Н.

Москва – 2014

Оглавление

Введение.....	6
Глава 1 Обзор литературы.....	10
1.1 Семейство белков синуклеинов.....	10
1.1.1 Альфа-синуклеин.....	15
1.1.2 Гамма-синуклеин.....	18
1.2 SNARE белки.....	21
1.2.1 Синтаксин-1.....	23
1.2.2 SNAP-25.....	24
1.2.3 Синаптобrevин-2/VAMP2.....	25
1.2.4 Нейрональный SNARE-комплекс.....	26
1.3 Роль альфа-синуклеина в регуляции формирования SNARE- комплекса.....	29
1.4 Недостаточность альфа-синуклеина, как фактор развития синаптической дисфункции.....	30
1.5 Моделирование синаптической дисфункции в CSP-а нокаутных мышцах.....	34
Глава 2. Материалы и методы.....	36
2.1 Экспериментальные животные.....	36
2.2 Биохимические методы анализа.....	37
2.2.1 Генотипирование нокаутных животных.....	37
2.2.2 ПЦР в реальном времени.....	39
2.2.3 Получение синаптических везикул.....	40
2.2.4 Денатурирующий электрофорез в ПААГ.....	42
2.2.5 Иммуноблоттинг.....	42

2.2.6 Получение рекомбинантных синуклеинов	44
2.2.6.1 Клонирование	44
2.2.6.2 Продукция рекомбинантных синуклеинов в бактериальных системах	44
2.2.6.3 Очистка рекомбинантных синуклеинов из бактериального штамма-производителя.....	47
2.2.7 Клеточные культуры.....	48
2.2.7.1 Приготовление культуральных сред.....	48
2.2.7.2 Ведение клеточных культур	48
2.2.7.3 Дифференцировка клеточной культуры SH-SY5Y	49
Глава 3. Результаты и их обсуждение.....	50
3.1 Получение линии бессинуклеиновых мышей.....	50
3.1.1 Получение линии двойного нокаута по генам альфа- и гамма- синуклеинов.....	50
3.1.2 Получение линии бессинуклеиновых животных – тройного нокаута по генам альфа-, бета- и гамма-синуклеинов	54
3.1.3 Подтверждение отсутствия всех трех белков синуклеинов в тканях мышей полученной линии abg-KO	59
3.2 Анализ связывания рекомбинантного гамма-синуклеина с синаптическими везикулами.....	60
3.2.1 Получение рекомбинантных синуклеинов.....	63
3.2.2 Связывание рекомбинантных синуклеинов с синаптическими везикулами.....	65
3.3 Анализ связывания рекомбинантного гамма-синуклеина с белками SNARE-комплекса.....	66

3.3.1 Получение рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов.....	67
3.3.2 Анализ связывания рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов с белками SNARE-комплекса	72
3.3.2.1 Связывание синуклеинов с синаптобrevином-2/VAMP2	75
3.3.2.2 Связывание синуклеинов с синтаксином-1.....	77
3.3.2.3 Связывание синуклеинов с SNAP-25.....	78
3.3.2.4 Роль С-концевого домена альфа-синуклеина в связывании с белками SNARE-комплекса	81
3.4 Исследование эффекта повышенной продукции гамма-синуклеина на дегенерацию синапсов, вызванную нарушением функции CSP-а.....	82
3.4.1 Получение повышенной экспрессии гамма-синуклеина в нервной системе CSP-а нокаутных мышей.....	84
3.4.2 Повышенная экспрессия экзогенного гамма-синуклеина в нервной системе CSP-а нокаутных мышей не влияет на прогрессию нейродегенеративного процесса.....	87
3.4.3 Анализ уровня гамма-синуклеина в синаптических везикулах CSP-а ^{-/-} / Thy1m ^{tg} мышей	91
3.5 Гамма-синуклеин в дифференцированной по нейрональному типу культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y.....	93
Выводы.....	97
Список литературы	98
Список работ, опубликованных по теме диссертации.....	119

Список сокращений

БА – болезнь Альцгеймера

БП – болезнь Паркинсона

кД – килоДальтон

П. н. – пары нуклеотидов

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ДСН (SDS) – додецил сульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

CSP-α – cysteine-string protein alpha

GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GST – glutathione S-transferase (глутатион-S-трансфераза)

КО – knock out

SNAP-25 – synaptosomal-associated protein, 25-кД

SNARE – soluble NSF attachment protein receptor proteins

VAMP2 – vesicle associated membrane protein

WT – wild type

Введение

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 [81]. Среди нейродегенеративных болезней, при которых отмечается патологическое накопление в клеточных депозитах абнормальных форм альфа-синуклеина: второе по распространенности нейродегенеративное заболевание – болезнь Паркинсона (БП), деменции с тельцами Леви, мультисистемная атрофия и другие менее распространенные заболевания [5]. 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, направление 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 исследования:

Провести сравнительный анализ функции альфа- и гамма-синуклеинов в синаптических везикулах.

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

Научная новизна исследования

Несмотря на обширные исследования 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 белков 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. При этом 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 в регуляции работы синапсов. Различия в функциональных механизмах, в которые вовлечены белки альфа- и гамма-синуклеины были подтверждены в экспериментах с использованием новой созданной в данной работе линии трансгенных мышей с генетически инактивированным ко-

шаперонным белком CSP-а, 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 белками альфа- и гамма-синуклеинов.

Практическая значимость

Высокая практическая значимость работы определяется, прежде всего, темой исследования. Проведенный сравнительный анализ пре-синаптических белков альфа- и гамма-синуклеинов в синаптических везикулах полосатого тела, в котором располагаются синапсы нейронов черной субстанции, позволил получить новые знания, которые необходимы для установления роли этих белков в патогенетических процессах, ассоциированных, прежде всего, с БП и другими, менее распространенными, но так же не излечимыми в настоящее время нейродегенеративными заболеваниями. Определение молекулярных мишеней позволяет наметить эффективную стратегию для создания эффективных болезнь-модифицирующих препаратов для лечения 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

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи и 7 сообщений в сборниках докладов научных конференций.

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.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 Семейство белков синуклеинов

Белки семейства синуклеинов – это небольшие растворимые высоко гомологичные белки, гены которых в норме экспрессируются преимущественно в нервной ткани и описаны только у позвоночных. Семейство синуклеинов включает три известные белка: альфа-синуклеин, бета-синуклеин и гамма-синуклеин [2; 14; 52; 134]. Характерной структурной особенностью всех трех синуклеинов является повторяющийся аминокислотный мотив KTKEGV на протяжении первых 87 аминокислотных остатков и негомологичный среди членов семейства кислый С-концевой участок (Рис. 1). Альфа- и гамма-синуклеины имеют гидрофобный, склонный к агрегации NAC-домен, которого лишен бета-синуклеин. Все члены семейства синуклеинов в нативном состоянии не имеют устойчивой третичной структуры и слабо гидрофобны с большим содержанием заряженных аминокислот [134].

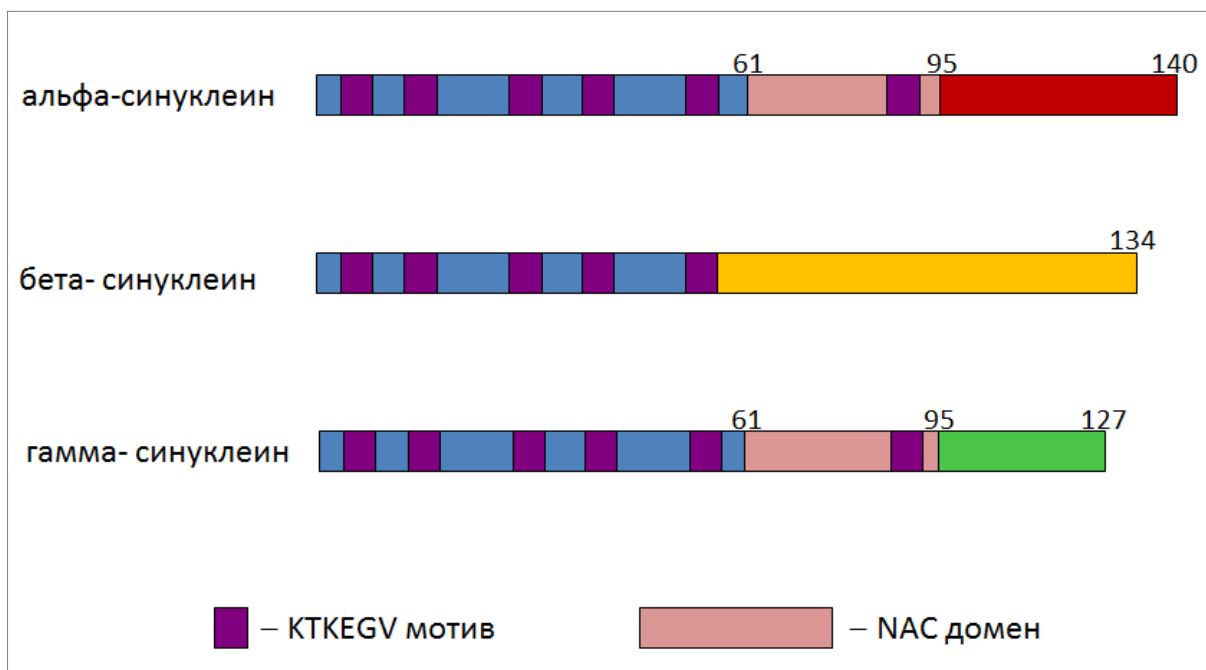


Рисунок 1 – Схема доменной структуры белков синуклеинов. Высокоомологичные участки молекул синуклеинов обозначены голубым цветом, неомологичные С-концевые области обозначены другим цветом.

За последние 25 лет изучения синуклеинов в различных организмах и модельных системах были получены противоречивые данные и сформулировано несколько гипотез их возможной функции. Изучение синуклеинов делят условно на три периода: первый период и начало исследования синуклеинов определены работами Maroteaux с коллегами, в которых сообщалось о субстративном клонировании и идентификации первого белка семейства синуклеинов из гигантских нейронов электрического ската [89]. Задачей исследования являлось выделение нейроспецифических белков с преимущественной локализацией в синапсах. Этим объяснялось название нового семейства: syn – синапс, nuclein – ядро [54]. Однако, первый период истории исследования синуклеинов носил описательный характер и не принес принципиально

значимых новых знаний в нормальной и патологической физиологии синапсов.

Второй всплеск интереса к семейству синуклеинов обозначен работами по изучению состава белков сенильных бляшек из аутопсийного материала больных с болезнью Альцгеймера (БА) [142]. В 1997 году Ueda с коллегами проводили выделение амилоидных включений и идентификацию белков, образующих нерастворимые комплексы с A β -амилоидными пептидами. Ими был выделен новый компонент сенильных бляшек – небольшой гидрофобный пептид размером 34 аминокислотных остатка, который оказался внутренней частью белка альфа-синуклеина и был обозначен, как неамилоидный компонент (non-amyloid component или NAC peptide). Это определило интерес исследователей к нему при изучении деменций различного типа [63; 132].

Однако далеко не при всех формах БА удавалось выявить NAC пептид в составе сенильных бляшек. Наиболее принятым объяснением присутствия его в амилоидных бляшках считалось «со-очищение» NAC-пептида из телец Леви, которые присутствовали в пораженном мозге при сочетанных формах БА/деменция с диффузными тельцами Леви [35]. Таким образом, NAC-пептид не мог рассматриваться в качестве потенциального патогенетического фактора БА, и интерес к нему быстро угас.

Третий период активного изучения синуклеинов наметился после публикации в 1997 году Polymeropoulos с соавторами данных, которые показали, что мутация в гене альфа-синуклеина ассоциирована с наследственной формой БП [6]. Это была мутация, приводящая к замене аланина на треонин в положении 53 молекулы α -синуклеина (A53T), обнаружена в семьях с итальянскими и греческими корнями [6]. Две другие точечные мутации в том же гене (A30P и E46K) оказались ассоциированы с БП в немецкой и испанской семьях [78; 150].

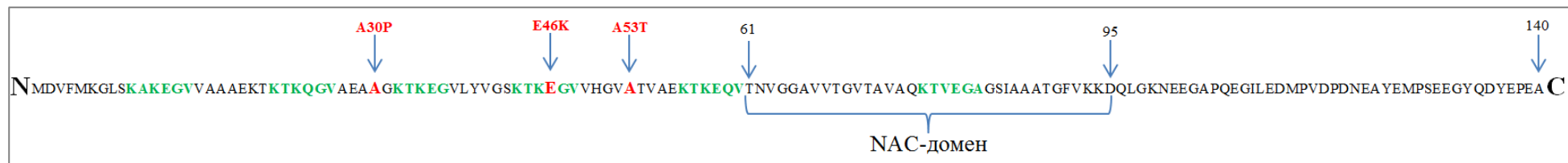


Рисунок 2 – Аминокислотная последовательность белка альфа-синуклеина человека с указанием точечных замен (красным), ассоциированных с наследственными формами БП [67]. Зеленым обозначены КТК-повторы.

При мутациях в гене, кодирующем альфа-синуклеин, заболевание наследовалось по аутосомно-доминантному типу, а симптомы болезни проявлялись в относительно раннем возрасте. Несколько позже были выявлены случаи наследственных форм БП, ассоциированных с иным типом мутаций – с дупликациями или трипликациями геномного локуса, в состав которого входит ген *SNCA*, что приводило к изменению дозы гена, повышению уровня его экспрессии и к накоплению альфа-синуклеина в телах нейронов [29; 42; 126]. К настоящему времени охарактеризовано уже значительное число мутаций, приводящих к развитию наследственных форм БП [51; 73; 125; 127; 138].

Spillantinni с коллегами было установлено, что белок альфа-синуклеин является одним из основных компонентов патогистологических включений – телец Леви, которые характерны для БП. Более того, в случае спорадических форм БП в составе телец Леви также обнаруживается агрегированный альфа-синуклеин, что говорит о том, что патология метаболизма немутированного альфа-синуклеина также может являться причиной развития нейродегенеративного процесса [132]. Эти работы определили устойчивый интерес к изучению функций синуклеинов, прежде всего, в патологии.

В настоящее время продолжают активные исследования белков данного семейства и заметно активизировались работы, направленные на выявление нормальной функции синуклеинов. Однако, до сих пор функции синуклеинов остаются неизвестными и работы, посвященные изучению синуклеинов, указывают на несколько возможных функций и процессы, в которых могут участвовать синуклеины. Наиболее важной функцией является участие регуляции работы синапсов, в частности, в синаптической пластичности, регулировании биосинтеза и гомеостаза дофамина.

1.1.2 Альфа-синуклеин

Альфа-синуклеин – пресинаптический белок, размером 140 аминокислотных остатков, идентифицируемый в денатурирующем ПААГ как белок с массой 14 кДа, характеризуется амфипатическим лизин-богатым N-концом, который играет ключевую роль при взаимодействии с мембраной, и неупорядоченным кислым C-концом, который участвует в регуляции ядерной локализации, взаимодействует с металлами и другими белками [32; 35-36; 52; 82; 143] (Рис. 3).

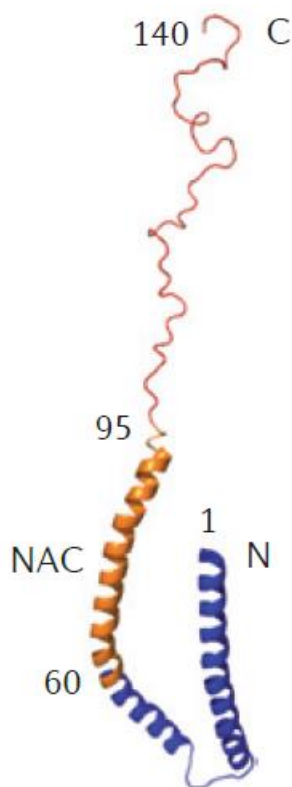


Рисунок 3 – Схематическое изображение структуры белковой молекулы альфа-синуклеина [81]

Центральная область альфа-синуклеина – NAC-пептид была впервые очищена из амилоидных бляшек пациентов с БА [91; 142]. Было установлено, что NAC-домен является необходимой частью для альфа-синуклеиновой агрегации, так как удаление крупных сегментов NAC-области значительно уменьшало олигомеризацию альфа-синуклеина в

растворах и образование фибрилл *in vitro* [40; 53] и в клеточных культурах [86].

Хорошо известно, что альфа-синуклеин приобретает альфа-спиральную конформацию при взаимодействии с синтетическими или биологическими мембранами *in vitro* [41]. Однако мало известно о конформационных состояниях альфа-синуклеина в различных компартментах клетки и при этом нет прямых доказательств функциональной роли нативных альфа-синуклеиновых олигомеров в биологических мембранах. Вероятно, нативный альфа-синуклеин находится в равновесии между различными его конформационными переходами и/или олигомерным состоянием. Было показано, что различные факторы такие, как окислительный стресс [62], посттрансляционная модификация [9; 103], протеолиз [38; 84], изменение концентрации жирных кислот [70; 109; 124], фосфолипиды и металлы [62; 101], которые индуцируют или модулируют структуру и олигомеризацию альфа-синуклеина *in vitro*, могут оказывать влияние на альфа-синуклеин и сдвигать равновесие между его мономерным и олигомерным состоянием *in vivo*. Эти же факторы, возможно, могут сдвигать равновесие между мономерным и олигомерным состоянием альфа-синуклеина *in vivo*. В многочисленных исследованиях было показано, что альфа-синуклеин находится преимущественно в виде мономера, но не исключено, что он способен образовывать стабильную мультимерную или иную структуру под влиянием каких-либо факторов, ассоциированных со стрессом, взаимодействием с другими белками, липидами и мембранами. Понимание молекулярных детерминант, регулирующих конформационное и олигомерное состояние нативного альфа-синуклеина, и структурных особенностей, ведущих к развитию патологии, имеют решающее значение для создания новых моделей и гипотез относительно функций альфа-синуклеина в норме и при патологии. Получение таких знаний приведет к

развитию терапевтических стратегий, мишенью которых будет альфа-синуклеин [81].

Нормальная физиологическая функция белка альфа-синуклеина остается до конца не изученной, однако, исключительно важными представляются результаты работ, в которых показано, что локализуется он в пресинаптических окончаниях [65; 67; 148] и связан с пулом синаптических везикул [69; 83; 152]. У модельных животных, нокаутных или трансгенных по гену синуклеина *SNCA*, наблюдались нарушения в процессах синаптической передачи, что позволило предположить важную синаптическую функцию альфа-синуклеина в регуляции выброса нейромедиаторов [81]. Действительно, у трансгенных мышей со сверхэкспрессией в нервной системе белка альфа-синуклеина человека отмечались нарушения в синаптическом экзоцитозе и подавление выброса нейротрансмиттера [3; 95; 149]. Такой же эффект наблюдали у грызунов, моделирующих БП со сверхэкспрессией альфа-синуклеина [80; 87]. При сверхэкспрессии альфа-синуклеина уменьшалось количество везикул, готовых к слиянию с мембраной и выбросу трансммиттера, и нарушался их рециклинг после эндоцитоза и, как следствие, уменьшался пул синаптических везикул в пресинаптическом окончании [95]. Более того, избыток альфа-синуклеина вызывал нарушение обратного захвата дофамина в окончаниях дофаминергических нейронов [87] и ингибировал транспорт везикул в пресинаптических окончаниях, что приводила к уменьшению пула везикул [120].

Однако, данные большого числа исследований, проведенных на разных моделях и в различных экспериментальных условиях, указывали на то, что роль альфа-синуклеина в поддержании везикулярного гомеостаза не связана с его прямым взаимодействием с синаптическими везикулами. При этом было показано взаимодействие альфа-синуклеина с фосфолипазой D2 [107] и белками семейства RAB [33]. Недавние исследования позволили установить, что альфа-синуклеин может

функционировать как шаперонный белок, взаимодействуя с белками SNARE-комплекса, контролируя его сборку и деградацию, напрямую влияя на выброс нейромедиаторов, в том числе дофамина [22].

Тот факт, что нокаутные животные, у которых инактивирован один из генов синуклеинов (альфа-, бета-, гамма-нокауты) жизнеспособны и не имеют выраженного фенотипа, предполагает, что синуклеины не являются абсолютно необходимыми компонентами в выбросе нейромедиатора. Были выдвинуты гипотезы, что синуклеины способствуют долгосрочному регулированию, оптимизации и поддержанию стабильной функции нервного окончания [7; 27]. Нейропротекторный эффект альфа-синуклеина, предотвращающий развитие нейродегенерации у мышей с дефицитом шаперонного белка CSP-а (cysteine-string protein-alpha), известного еще как DNAJC5 [28], убедительно свидетельствует в пользу того, что функция альфа-синуклеина становится более заметной и жизненно важной в условиях стресса. Нейропротекторный эффект альфа-синуклеина в таких моделях был объяснен его способностью связываться с мембраной и везикулами, после чего белок мог осуществлять свою корректирующую функцию. Аберрантный же альфа-синуклеин с мутацией A30P, выявляемой при наследственных формах БП, лишен способности связываться с мембраной и не обладает функцией, компенсирующей молекулярные процессы, приводящие к нейродегенерации, в CSP-а-нокаутных мышах.

1.1.3 Гамма-синуклеин

Гамма-синуклеин – член семейства, который был описан последним в группе после альфа и бета синуклеинов. Продукт гена гамма-синуклеина в норме обнаруживается главным образом в периферических отделах центральной нервной системы. В большом количестве гамма-синуклеин был детектирован в нервных окончаниях первичных сенсорных

и двигательных нейронов, в их телах, в нейронах симпатической нервной системы, в обонятельном эпителии и тканях сетчатки глаза [18; 135]. К настоящему времени гамма-синуклеин изучен гораздо меньше, чем альфа-синуклеин, а его нормальные функции в клетке до сих пор не установлены. Нокаутные по гамма-синуклеину мыши, как уже отмечалось выше, жизнеспособны, и не имеют выраженной патологии. Только при старении ближе к концу жизни у таких животных отмечаются возраст-зависимые нейрональные нарушения, связанные с синаптической дисфункцией [59; 97].

Гамма-синуклеин до сих пор не был обнаружен в составе известных патогистологических включений, характерных для наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, например, в тельцах Леви. Не обнаружено мутаций в гене, кодирующем гамма-синуклеин, ассоциированных с наследственными нейродегенеративными заболеваниями у человека. Однако, агрегированный гамма-синуклеин был обнаружен в качестве одного из компонентов в составе атипических включений в дегенерирующих нейронах в аутопсийном материале головного мозга больных с нейродегенеративными расстройствами: БП, деменции с тельцами Леви и болезнью Галлервордена-Шпатца [48; 50], а также при глаукоме у человека и в мышинных моделях глаукомы [133]. Наиболее интересным фактом участия гамма-синуклеина в формировании патогистологических клеточных депозитов является, безусловно, его детекция в составе белковых включений у больных с боковым амиотрофическим склерозом [1]. При этом ни конкретные механизмы формирования гамма-синуклеин реактивных включений, ни их непосредственная роль в развитии нейродегенеративного процесса не изучены.

Интересно, что для трансгенных модельных животных со сверхэкспрессией гамма-синуклеина в нейронах свойственна повышенная гибель двигательных нейронов, что приводит к развитию фенотипа,

который по клиническим проявлениям и набору неврологической симптоматики воспроизводит картину болезни двигательного нейрона у человека [98].

Вторичная структура белковой молекулы гамма-синуклеина схожа со вторичной структурой молекулы альфа-синуклеина (Рис. 4).

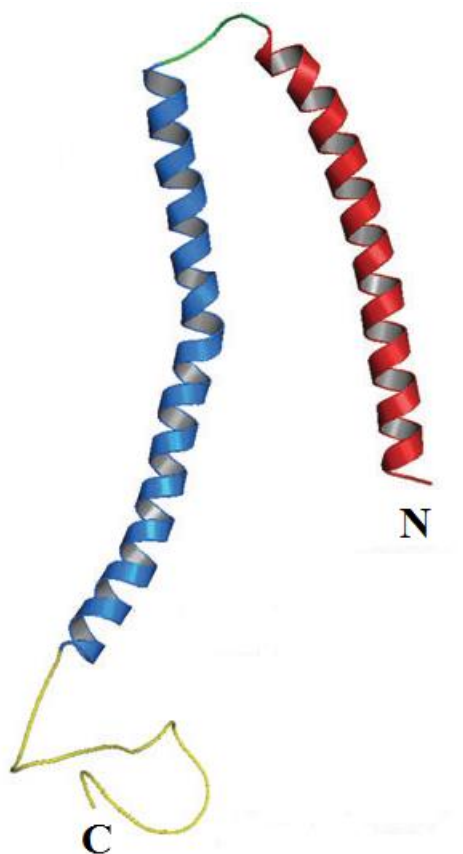


Рисунок 4 – Схематическое изображение структуры белковой молекулы гамма-синуклеина [105].

Гамма-синуклеин не имеет третичной структуры, как и альфа-синуклеин, и, так же как и альфа-синуклеин, содержит гидрофобный NAC пептид, что существенно повышает его агрегационные свойства и делает его потенциально амилоидогенным белком. Действительно, было показано, что гамма-синуклеин способен агрегировать *in vitro*, а в тканях нервной системы трансгенных мышей при повышенной экспрессии он формирует нерастворимые фибриллярные структуры *in vivo* [98].

Недостаточность функции гамма-синуклеина, которая не компенсирована функционально альфа-синуклеином, например, в двойных нокаутных животных с одновременной инактивацией двух этих генов [8], приводит к развитию синаптической дисфункции во второй половине жизни животных, что указывает на важную роль синуклеинов в поддержании долговременной работы синапсов.

1.2 SNARE белки

Аббревиатура SNARE образована от англ. **SNAP** (Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) Attachment Protein) **RE**ceptor. SNARE – суперсемейство белков, которые участвуют на всех этапах слияния внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной или органеллой-мишенью, в том числе, с лизосомой. Это небольшие белки, которые различаются по структуре и размеру, но все они имеют эволюционно консервативный из 60-70 аминокислот, содержащих восемь гептоповторов. Такая последовательность аминокислот в SNARE белках обозначается как SNARE-мотив [16]. Количество различных SNARE белков различно для каждого организма, например, их 25 у дрожжей и 36 у всех млекопитающих, включая человека, а у растений свыше 50.

Для каждого этапа слияния мембран требуется набор из четырех SNARE-мотивов трех или четырех разных SNARE белков, при этом, хотя бы один из этих белков должен обязательно быть заякорен на мембране. Мембранный транспорт обычно состоит из последовательных этапов, обеспечивающих отпочкование и транспорт везикулы, ее заякорение на мембране и слияние с синаптической мембраной. SNARE белки участвуют на поздних этапах данной цепочки событий [66]. Транс-SNARE-комплекс образуется путем взаимодействия SNARE-мотивов белков противоположных мембран, что постепенно подтягивает N-концы молекул к С-концам, заякоренным на мембране, таким образом, смыкая две

мембраны вместе. Энергия, которая высвобождается в процессе сборки SNARE-комплекса, вероятно, используется для слияния. В процессе слияния SNARE-комплекс реорганизуется из транс-комплекса в цис-комплекс. Цис-SNARE-комплекс довольно устойчивый и для его разборки требуется AAA-АТФ-аза и АТФ. SNARE белки претерпевают конформационные изменения, которые являются ключевыми в процессе слияния мембран. Такой цикл контролируется регуляторными факторами, которые еще не донца изучены.

SNARE белки, вовлеченные в процесс слияния синаптических везикул и секреторных гранул с мембраной нейроэндокринных клеток, обозначаются, как нейрональные SNARE белки, в настоящее время интенсивно изучаются и являются моделью для всех SNARE белков. Данная группа белков включает в себя синтаксин-1 и SNAP-25, которые локализованы на пресинаптической мембране, и синаптобrevин-2 (также известный как vesicle-associated membrane protein или VAMP2), локализованный на мембране везикулы. Действие на эти белки нейротоксинов ботулизма и столбняка, которые расщепляют нейрональные SNARE-комплексы, приводит к полному блокированию синаптической нейротрансмиссии, что подтверждает исключительно важную роль SNARE белков в функционировании синапсов [116]. Данные, полученные на модельных генетически модифицированных животных, также показали, что генетическая инактивация нейрональных SNARE белков приводит к драматическим изменениям в нейротрансмиссии и экспериментально подтвердили их непосредственное участие в последних этапах высвобождения нейротрансмиттера. Интересно, что анализ хромаффинных клеток нокаутных по генам синаптобrevина или SNAP-25 мышей показал, что эти белки могут быть заменены SNAP-23 и целлубревином (cellubrevin/VAMP3), соответственно [12; 128]. Таким образом, при исключительно важной роли основных SNARE белков, в клетке существуют защитные корректирующие системы, которые позволяют в

определенных патологических условиях поддержать жизнедеятельность нейронов какое-то время, даже если затронута функция SNARE-комплексов. Одним из таких корректирующих агентов является альфа-синуклеин [22].

1.2.1 Синтаксин-1

Синтаксин-1 – трансмембранный белок, состоящий из 288 аминокислот, экспрессируется только в нейронах и нейроэндокринных клетках. Характеризуется высоким содержанием в тканях нервной системы – составляет примерно 1% от всех белков мозга. Структура Синтаксина-1 типична для большинства SNARE белков: SNARE-мотив, окруженный с одной стороны N-концевым регуляторным доменом (H_{abc}) и C-концевым трансмембранным доменом с другой стороны (Рис. 5).

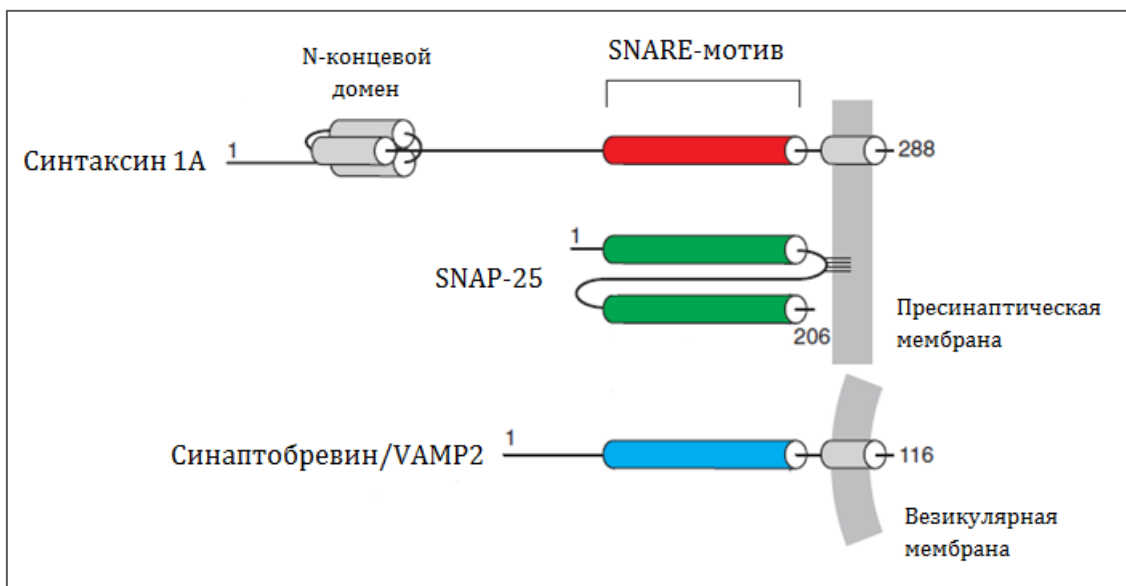


Рисунок 5 – Схема строения нейрональных SNARE белков.

N-концевой домен синтаксина состоит из двух участков: короткого N-концевого пептида (N-пептид), который связывается с белком Munc18-1 [39; 111] и более крупный регуляторный N-концевой домен – H_{abc} -домен,

который состоит из трех альфа-спиральных антипараллельных участков – Ha, Hb и Hc, образующий винтовой пучок [10; 13; 45]. В «закрытой» конформации синтаксина этот домен закрывает SNARE домен и блокирует его взаимодействие с одноименными доменами других белков SNARE комплекса. Такая «закрытая» конформация синтаксина поддерживается также белком Munc18-1. В «открытой» конформации синтаксин способен образовать SNARE-комплекс [154]. Было показано, что взаимодействие N-конца синтаксина-1 с белком Munc18-1 не обязательно, чтобы произошло слияние мембран, при этом роль связывания белка Munc18-1 с синтаксином-1 до конца не исследована [92]. Связывание синтаксина с кальциевым сенсором – белком синаптотагмином (участвует в выбросе нейромедиаторов) является кальций-зависимым [79].

1.2.3 SNAP-25

SNAP-25 (от англ. **Sy**Naptosomal-**A**ssociated **P**rotein, 25-кД) – белок, состоящий из 208 аминокислот. Так же, как и синтаксин 1, локализован на пресинаптических мембранах. Его особенностью является то, что в отличие от типичной структуры, характерной для остальных белков SNARE-комплекса, SNAP-25 имеет два SNARE-мотива, соединенных между собой гибким линкерным регионом, при этом трансмембранный домен у данного белка отсутствует (Рис. 5). Линкер, который соединяет два SNARE-мотива, имеет кластер из четырех пальмитоильных остатков цистеина, с помощью которых белок заякорен на мембране. SNAP-25 может быть фосфорилирован АМФ-зависимой протеин киназой (PKA) и протеин киназой C (PKC) в позициях Thr138 и Ser187, соответственно.

SNAP-25 относится к небольшой подгруппе SNARE белков со схожей структурой, которая включает в себя белки SNAP-23, SNAP-29 и SNAP-47. В отличие от нейрональной экспрессии белка SNAP-25, остальные белки данной подгруппы экспрессируются в большинстве других тканей [79].

Нарушение функции SNAP-25 приводит к тяжелой патологии: мыши, нокаутные по гену, кодирующему белок SNAP-25, погибают при рождении. Причем патологические изменения при дефиците белка SNAP-25 наблюдаются уже в эмбриональном развитии: у гомозиготных особей, находящихся на стадии 18 дня эмбриогенеза, отмечается характерная подвернутая форма, существенное отставание в росте, эмбрионы неподвижны и не проявляют сенсомоторных рефлексов в ответ на механические стимулы [146].

1.2.2 Синаптобrevин-2/VAMP2

Синаптобrevин-2 – небольшой везикулярный белок размером 118 аминокислот, который в денатурирующем ПААГ движется как 18 кДа. Синаптобrevин-2 экспрессируется на высоком уровне в нейронах и нейроэндокринных клетках, а, кроме того, также встречается во многих не нейрональных тканях, но в значительно меньших количествах. Он относится к семейству везикуло-ассоциированных мембранных белков (англ. **V**esicle **A**ssociated **M**embrane **P**rotein, VAMP) и содержит SNARE-мотив с короткой N-концевой областью, богатой пролином. Как и синтаксин 1, синаптобrevин-2 обладает C-концевым трансмембранным доменом, который соединяется со SNARE-мотивом через короткий линкер (Рис. 5).

Синаптобrevин-2 имеет пальмитоильные ацильные цепи на остатках цистеина в непосредственной близости от трансмембранного домена. Во многих нейробиологических исследованиях синаптобrevин-2 используется в качестве маркерного белка для нормализации синаптических белков и для характеристики состояния синапсов в исследуемой ткани. Таким образом, белок синаптобrevин-2 является жизненно важным, что подтверждено данными, полученными на генетически модифицированных животных: гомозиготные нокаутные по гену VAMP2 мыши погибают

непосредственно после рождения. Новорожденные гетерозиготные варианты таких нокаутных мышей обладают измененной закругленной формой тела с плечевым горбом, который, вероятно, вызывается избытком бурого жира в верхней части спины. Так как синаптобrevин-2 функционирует в эндокринных и жировых клетках, измененная форма тела может быть связана с нарушением регулируемого экзоцитоза в этих клетках [118].

1.2.4 Нейрональный SNARE-комплекс

Белки синтаксин-1, SNAP-25 и синаптобrevин-2 претерпевают структурные изменения, когда они взаимодействуют при слиянии мембран. Данные рентгено-структурного анализа показали, что сердцевина нейронального SNARE-комплекса (соединение SNARE-мотивов) имеет единое строение для всех SNARE-комплексов. Все SNARE-мотивы приобретают альфа-спиральную структуру и выстраиваются в параллельные ряды, формируя перекрученные спирали (Рис. 6) [137]. Вдоль продольной оси в центре пучка были идентифицированы 16 взаимодействующих слоев боковых цепей. Каждый слой формировался аминокислотами от разных SNARE-мотивов. Слои большей частью гидрофобны за исключением центрального ионного слоя, который состоит из трех глутаминов и одного аргинина, при этом все слои высоко консервативны [43]. Для обозначения слоев принято использовать порядковую нумерацию. Отчет ведется от центрального слоя, который называется «0-слой». Слои от N-концевого региона SNARE-мотивов к 0-слою называются от -7 до -1 слои, а от 0-слоя до С-конца называются от +1 до +8 слои. В соответствии с общепринятой рабочей теорией считается, что SNARE-мотивы напоминают молекулярную молнию, и они собираются от N-концевого домена к С-концевому. Согласно данной теории слои взаимодействуют последовательно друг за другом, притягивая при этом противоположные мембраны ступенчато. При формировании

последнего слоя мембраны находятся настолько близко друг к другу, что сливаются.



Рисунок 6 – Топологическая организация SNARE-комплекса.

Остов SNARE-мотива, который образован тремя нейрональными SNARE белками, вовлеченными в процесс слияния синаптических везикул. Синтаксин-1А (красный) и SNAP-25 (зеленый, Sn1 и Sn2), содержащий два SNARE-мотива, связаны с пресинаптической мембраной; синаптобrevин-2 (голубой) связан с мембраной везикул [137].

Таким образом, SNARE белки постоянно претерпевают цикл сборки и разборки, который называется конформационный цикл SNARE белков. Сборка SNARE-комплекса сопровождается высвобождением большого количества энергии. Несвязанные SNARE белки существуют недолго, так как они могут образовывать комплексы между собой, включая гомофильную олигомеризацию. Так называемая нуклеация (начало образования) SNARE-комплекса строго контролируется клеточными факторами. Ключевая роль в подготовке SNARE белков и, возможно, контроле нуклеации принадлежит SM белкам, включая munc18-1. До сих пор остается неясным, регулируется ли сборка транс-комплекса после нуклеации или же сама нуклеация является стимулом к последующему слиянию мембран. В экспериментах *in vitro* показано, что сборка завершается сразу после нуклеации [110]. Chen с соавторами показали, что

комплексин – небольшой (15 кДа) растворимый нейрональный белок, прочно связывается со SNARE-комплексом, формируя альфа-спираль, которая в свою очередь упаковывается в антипараллельной ориентации в бороздку между спиралями синаптобревина и синтаксина, чем стабилизирует комплекс [31]. На основании работ, проведенных лабораторией Т. Sudhof, им было выдвинуто предположение, что присоединение комплексина приводит SNARE-комплекс в метастабильное состояние, после чего к синаптотагмину 1 присоединяется кальций, что ведет к быстрому экзоцитозу и вытеснению комплексина (Рис. 7) [139]. Делеция гена комплексина в модельных мышах приводит к снижению чувствительности нейронального экзоцитоза к кальцию, как это описано у нокаутных мышей по гену синаптостагмина [31].

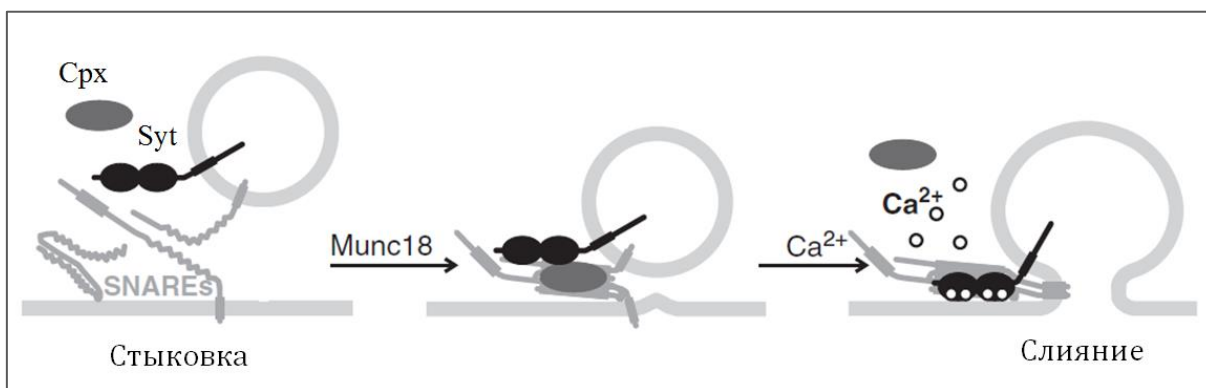


Рисунок 7 – Стадии экзоцитоза синаптических везикул.

Предполагаемые этапы молекулярного взаимодействия при слиянии синаптических везикул с мембраной клетки. Срх – синтаксин; Syt – синаптотагмин [79].

И хотя в изучении механизма нейротрансмиссии достигнут существенный прогресс, многие его стадии остаются не до конца понятными, особенно много открытых вопросов остается в описании финальных стадий слияния мембран, непосредственно предшествующих выбросу нейромедиатора.

1.3 Роль альфа-синуклеина в регуляции формирования SNARE-комплекса

В пресинаптических окончаниях для выброса нейромедиатора требуется скоординированное слияние мембран и в данном процессе участвуют SNARE белки. Нейромедиаторы высвобождаются из пресинаптического окончания более тысячи раз в минуту. Многие факты указывают на то, что пресинаптические окончания могут выступать сайтом инициации нейродегенерации [58; 77; 115]. У мышей, нокаутных по одному лишь пресинаптическому белку CSP-а, обладающему кошачьей активностью, вскоре после рождения развиваются быстротекущие нейродегенеративные изменения, заканчивающиеся гибелью животных [44].

Известно, что альфа-синуклеин также вовлечен в развитие нейродегенеративных процессов и может определенным образом влиять на процесс выброса нейромедиатора [85; 95]. Интересно, что сверхэкспрессия альфа-синуклеина в трансгенных животных, нокаутных по CSP-а, приводит к восстановлению нормального фенотипа данных животных, в то время как делеция альфа-синуклеина в таких мышцах напротив ускоряет процесс нейродегенерации [28]. При этом, у мышей, нокаутных по CSP-а, наблюдается низкий уровень белка SNAP-25, вследствие чего нарушается сборка SNARE-комплекса. Набор этих данных указывает на связь между образованием SNARE комплекса и нейродегенеративным процессом. Было показано, что альфа-синуклеин способен стимулировать сборку SNARE комплекса в таких мышцах, но уровень белка SNAP-25 при этом оставался низким [28]. Данные исследования указывают на то, что альфа-синуклеин способен оптимизировать функцию SNARE белков и таким образом компенсировать делецию белка CSP-а. Причем была показана, линейная зависимость стимулирования сборки SNARE-комплекса от уровня экспрессии альфа-синуклеина в клеточной культуре HEK293 [22]. В той же работе было показано, что форма альфа-синуклеина с укороченным C-

концом не приводит к сборке SNARE-комплекса, так как стимулирование сборки происходит именно благодаря взаимодействию альфа-синуклеина своим С-концом с синаптобревином-2, при этом альфа-синуклеин своим N-кольцом взаимодействует с фосфолипидами.

1.4 Недостаточность альфа-синуклеина, как фактор развития синаптической дисфункции

В патогенезе целого ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как БП, деменция с тельцами Леви, множественная системная атрофия, болезнь Галлервордена-Шпатца, нейроаксональная дистрофия и других альфа-синуклеину отводится важная роль [49; 55; 90; 114; 131].

Для наиболее распространенных среди перечисленных заболеваний – болезни Паркинсона – характерно специфическое поражение дофаминергических нейронов нигростриатной системы и нарушение гомеостаза дофамина. Многими исследователями показано, что альфа-синуклеин вовлечен в регуляцию метаболизма дофамина в синаптических окончаниях и принимает непосредственное участие в оптимизации процессов нейротрансмиссии в дофаминергических нейронах. Модификации его структуры, экспрессии и внутринейронной компартментализации приводят к патогенной агрегации и формированию характерных для БП патогистологических включений – телец Леви. Исследования нокаутных животных показали, что удаление альфа-синуклеина функционально компенсируется в нигростриатной системе другими членами этого семейства за счет высокой пластичности развивающегося мозга. В патогенезе БП важная роль отводится накоплению и патогенной агрегации альфа-синуклеина. Быстрая агрегация существенных количеств синтезируемого белка и депонирование его агрегированных форм в цитоплазматических и аксональных включениях, а также аксонального транспорта может приводить к понижению

концентрации мономерного альфа-синуклеина в пресинаптических окончаниях, в функционировании которых данному белку отводится важная роль. Логично предположить, что в тех нейронах, которые наиболее эффективно нейтрализуют высоко токсичные растворимые продукты агрегации альфа-синуклеина, ускоряя их перевод в менее токсичные фибриллярные формы, с последующим образованием характерных включений, недостаточность функционального альфа-синуклеина в пресинаптических окончаниях должна быть наиболее выраженной. Соответственно, и гибель популяции дофаминергических нейронов черной субстанции, и нарушение синаптической функции выживших нейронов могут быть связаны, прямо или опосредованно, с агрегацией альфа-синуклеина и могут вносить существенный вклад в прогрессирующее нарушение функции нигростриатной системы при БП. Недавние исследования показали, что альфа-синуклеин принимает непосредственное участие в оптимизации процессов нейротрансмиссии в дофаминергических нейронах [22; 59; 95]. Однако, удаление альфа-синуклеина методом генетического нокаута у мышей не приводит к развитию существенных патологических изменений нигростриатной системы. Отсутствие альфа-синуклеина функционально компенсируется в развивающейся нервной системе другими членами этого семейства за счет высокой онтогенетической пластичности [27; 112]. Подавление же экспрессии альфа-синуклеина у взрослых животных лентивирусными конструкциями iРНК ведет к развитию выраженных патологических изменений в нигростриатной системе [56]. У взрослых мышей, нокаутных по альфа-синуклеину, выявлена повышенная устойчивость дофаминергических нейронов к 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридину (МФТП) при том, что чувствительность к МФТП эмбриональных дофаминергических нейронов, полученных из области среднего мозга нокаутных животных этой линии такая же, как и у мышей дикого типа [4; 34; 37; 46; 74; 112; 117]. Эти данные также

интерпретируются как результат онтогенетической селекции нейронов и компенсации за счет функциональной пластичности развивающейся нервной системы. Такое объяснение подтверждается данными по токсичности МФТП, полученными на нокаутных по всем трем синуклеинам мышах (бессинуклеиновым), у которых чувствительность дофаминергических нейронов к данному токсину не отличается от таковой у контрольных животных дикого типа [11]. Можно предположить, что при идиопатических формах БП также может иметь место дефицит функционального альфа-синуклеина в синапсах вследствие активного формирования цитоплазматических включений в определенных популяциях нейронов. Особенно уязвимыми в таком случае окажутся взрослые нейроны и еще более уязвимыми – нейроны стареющего мозга, поскольку их способность к компенсации структурных и функциональных повреждений снижена по сравнению с таковыми в развивающейся нервной системе. Потеря синаптической функции альфа-синуклеина будет приводить к нарушениям дофаминергической нейротрансмиссии и препятствовать эффективной компенсации работы нигростриатной системы у пациентов с БП, способствуя переходу заболевания из досимптоматической в симптоматическую стадию.

Модификации структуры, экспрессии и внутринейрональной компарментализации альфа-синуклеина, которые вызывают его патогенную агрегацию, играют важную роль в патогенезе БП. Как было отмечено выше, известны три точечные мутации в кодирующей части гена альфа-синуклеина, а также дупликации и трипликации SNCA локуса, ассоциированные с наследственными формами БП, характеризующимися ранним развитием заболевания [6; 29; 64; 78; 126; 150]. Более того, агрегированный и фибриллированный альфа-синуклеин является основным компонентом телец Леви и так называемых нейритов Леви – характерных для БП патогистологических структур, выявляемых не только при наследственных, но и при идиопатических формах [130; 132]. В

недавно закончившихся масштабных полногеномных исследованиях факторов риска развития БП альфа-синуклеин был выявлен в качестве важного этиологического фактора развития наследственных и идиопатических форм БП [71; 94; 104; 119; 136]. И хотя частота мутаций SNCA гена у пациентов с наследственными формами БП оказалась ниже, чем частота мутаций в некоторых других, ассоциированных с БП аутосомно-доминантных (например, LRRK2) или аутосомно-рецессивных (например, parkin, PINK1) генах, определенный полиморфизм в SNCA гене является критическим общим фактором риска для развития идиопатических форм. Данный вывод, сделанный на основе результатов проведенного генетического скрининга, позволяет предположить, что изменения метаболизма белка альфа-синуклеина, вызываемые патологическими мутациями или амплификациями гена, ведут к развитию агрессивных ранних форм заболевания, в то время как менее кардинальные модификации, ассоциированные с определенным полиморфизмом, могут быть скомпенсированы в течение длительного периода. Показано, что альфа-синуклеин активно экспрессируется во взрослой нигростриатной системе, белок транспортируется в пресинаптические окончания дофаминергических нейронов, где принимает участие в процессах нейротрансмиссии, в частности, регулируя синтез дофамина, его высвобождение и обратный захват [7; 24]. Исследования, проведенные на животных моделях, позволили получить убедительные доказательства важной роли альфа-синуклеина в поддержании нормального структурного и функционального состояния нейронов позвоночных и в особенности для их синапсов [22-23; 28; 47; 95; 141]. При этом до настоящего времени остается неясным молекулярный механизм процессов, которые вследствие изменения метаболизма альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах приводят к развитию патологии, характерной для БП. Гипотеза снижения функциональных концентраций белка альфа-синуклеина в пресинаптических окончаниях при альфа-синуклеинопатиях [20] позволяет

объяснить данные по развитию возрастных дисфункций дофаминергических синапсов nigrostriatной системы у нокаутных по синуклеинам животных [11; 27; 112].

1.5 Моделирование синаптической дисфункции в CSP-а нокаутных мышцах

CSP-а (англ. Cysteine String Protein) – везикулярный белок синапсов центральной и периферической нервной системы, обладающий ко-шаперонной активностью, связывается белками SNARE-комплекса, образование которого является ключевым в нейротрансмиссии [21; 25]. CSP-а состоит из N-концевого J домена и C-конца, богатого остатками цистеина [60; 145; 156]. До недавнего времени существовало три гипотезы, описывающие функции CSP-а белка. Первая гипотеза предполагала, что CSP-а белок играет важную роль в сборке, активации и регуляции кальциевых каналов [30; 88; 93; 144]. Вторая гипотеза гласила о том, что белок CSP-а вовлечен в регулирование экзоцитоза, за счет взаимодействия с синтаксином и синаптотаксмином [96; 155]. Интересно, что в ряде работ было показано, что сверхэкспрессия белка CSP-а в нейроэндокринных клетках влияла на экзоцитоз, но не оказывала влияния на активность кальциевых каналов [15; 26; 57; 151]. Третья гипотеза о функционировании CSP базировалась на наблюдениях, связанных с его DNA-J доменом. DNA-J домены характерны для ко-шаперонов семейства Hsp40 и они также способны взаимодействовать с DNA-K доменами белков семейства Hsp70 [61; 72]. Третья гипотеза была подтверждена экспериментально в целом ряде работ на различных системах и на сегодняшний день является наиболее принятой [44; 122; 140]. DNAJ-домен белка CSP-а образует активный шаперонный комплекс с DNAK-доменом белка Hsc70 и белком SGT [140]. У нокаутных по CSP-а мышей существенно нарушается

эффективность нейротрансмиссии, вследствие чего развиваются серьезные нейродегенеративные изменения, и животные погибают практически все к двухмесячному возрасту [44]. Эксперименты, проведенные на синапсах чашечек Хелда, позволяющие изучать пресинаптические функции в высоком разрешении, благодаря крупным размерам данных синапсов, показали, что к одиннадцатому дню постнатального развития у мышей, нокаутные по CSP-а, не было выявлено нарушений в работе синапсов. Однако, уже к двадцатому дню жизни фиксировались значительные ухудшения в нейротрансмиссии и были выявлены выраженные признаки нейродегенерации [44]. Известно, что мутации в домене DNAJ5 белка CSP-а у человека приводят к нейронному восковидному липофусцинозу – нейродегенеративному расстройству, характеризующемуся деменцией, судорогами, аккумуляцией белков с неправильной конформацией в лизосомах [99].

Биохимический анализ лизатов мозга мышей, нокаутных по CSP-а, показал, что количество белка SNAP-25 уменьшается примерно на 40% и на 50% уменьшается сборка SNARE комплексов [28; 123]. Снижение уровня белка SNAP-25 в нокаутных по CSP-а мышцах происходит на фоне активации убиквитинизации SNAP-25 и его ускоренной деградации [123]. Показано, что простое снижение экспрессии белка SNAP-25 в нокаутных мышцах, которое имеет место при гетерозиготном состоянии, не приводит к развитию нейродегенерации. В нокаутных же по CSP-а мышцах нарушается сборка SNARE комплекса и развивается серьезная нейродегенерация. Шаперонный комплекс CSP-а/Hsc70/SGT предотвращает мисфолдинг белка SNAP-25 *in vitro*, что является основным доказывом шаперонной активности белка CSP-а по отношению к SNAP-25 [123].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Экспериментальные животные

В работе использовали чистые линии животных (не менее 6 возвратных скрещиваний) на генетическом фоне линии C57Bl6J (Charles River Laboratories, США).

Мыши с делецией гена альфа-синуклеина (α-KO) были получены из лаборатории A. Rosenthal (Genentech, США) [7]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory – B6.129X1-Snca^{tm1Rosl}/J и 003692, соответственно.

Мыши с делецией гена бета-синуклеина (β-KO) были получены из лаборатории T. Sudhof (Genentech, США) [27]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory – B6.129-Sncb^{tm1Sud}/J и 008133, соответственно.

Мыши с делецией гена гамма-синуклеина (γ-KO) были получены из лаборатории V. Buchman [97]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory – B6.129P2-Sncg^{tm1Vlb}/J и 008843, соответственно.

Мыши с делецией гена, кодирующего белок CSP-а были получены из лаборатории T. Sudhof (Genentech, США) [44]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory – B6;129S6-Dnajc5^{tm1Sud}/J и 006392, соответственно. Далее они были переведены на C57Bl6J генетический фон обратным скрещиванием в 8 поколениях.

Линия трансгенных мышей Thy1mγSN была получена из лаборатории V. Buchman [98]. Название и номер в каталоге The Jackson Laboratory – C57BL/6J-Tg(Thy1-Sncg)HvP36Putt/J и 012769, соответственно.

Работы с животными проводили в соответствии с "Правилами лабораторной практики в Российской Федерации" от 2003 г.

2.2 Биохимические методы анализа

2.2.1 Генотипирование нокаутных животных

Выделение геномной ДНК. Геномную ДНК выделяли из биопсий уха или хвоста животных с помощью набора DiatomTM DNA Prep 200 (ООО "Лаборатория ИзоГен", Россия). Перед выделением ДНК проводили протеолиз ткани по инструкции производителя.

Полимеразная цепная реакция. Детекцию мутированных аллелей проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью набора GenePak® PCR Core (ООО "Лаборатория ИзоГен", Россия) по инструкции производителя.

Использовали следующие праймеры:

альфа-синуклеин-генотипирование:

Праймер	Последовательность
aSupS	5' CAGCTCAAGTTCAGCCACGA
AKoC2	5' AAGGAAAGCCGAGTGATGTAC
NeoA	5' ATGGAAGGATTGGAGCTACG

бета-синуклеин-генотипирование:

Праймер	Последовательность
bynKo	5' TGCCCCTGAAATGCTGCGCC
bynWT	5' GACGCACGTCCGCACGTCCACCC
byn_up	5' AGGACACCACTGGCCCCGAGTCC

гамма-синуклеин-генотипирование:

Праймер	Последовательность
NeoB	5' CTGAAGAACGAGATCAGCAGCCT
SAUP	5' AGTCCTGGCACCTCTAAGCA
GDN	5' GGGCTGATGTGTGGCTATCT

Для всех генотипирований использовали одну программу амплификации, так как праймеры были подобраны с близкой температурой отжига (60°C):

Этап 1	94°C 2 минуты
--------	---------------

Этап 2	94°C 15 секунд
Этап 3	60°C 30 секунд
Этап 4	72°C 40 секунд
40 циклов со 2 по 4 этапы	

CSP-а генотипирование

Праймер	Последовательность
D	5' AAAGTCCTATCGGTAAGCAGC
E	5' CTGCTGGCATACTAATTGCAG
C	5' GAGCGCGCGCGGCGGAGTTGTTGAC

Для генотипирования всех синуклеин-нокаутных животных использовали единую программу амплификации:

Этап 1	94°C 2 минуты
Этап 2	94°C 15 секунд
Этап 3	60°C 30 секунд
Этап 4	72°C 40 секунд
40 циклов со 2 по 4 этапы	

Электрофорез ДНК в агарозном геле. Продукты амплифицированных фрагментов ДНК разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле (Sigma-Aldrich, США) содержащем 0.5 мг/мл этидия бромид. Электрофорез проводили в трис-ацетатном буфере.

Расчетные размеры фрагментов ДНК для соответствующих генотипов:

a-синуклеин	KO	450 п. н.
	WT	520 п. н.
b-синуклеин	KO	300 п. н.
	WT	320 п. н.
g-синуклеин	KO	397 п. н.
	WT	490 п. н.
CSP-a	KO	400 п. н.
	WT	600 п. н.

В качестве стандарта для определения молекулярных весов анализируемых фрагментов использовали GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, (Fermentas, США).

Документирование результатов осуществляли с помощью системы Biospectrum AC Chemi ("Uplan", США).

2.2.2 ПЦР в реальном времени

Для генотипирования потомства от скрещивания мышей трансгенной линии ThylmySN с нокаутными мышами линии CSP-a^{-/-} проводили идентификацию гомозиготных и гемизиготных по трансгенной кассете особей с использованием ПЦР в реальном времени.

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на установке StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes, Финляндия) и ROX в качестве референсного красителя. В реакцию брали по 1-5 мкг геномной ДНК на каждый образец. Реакции проводили в тонкостенных 48-луночных ПЦР-планшетах (Bioplastics, Нидерланды) в трипликах. В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*). Программа для амплификации включала «горячий старт» (10 мин при 95°C) затем 40 циклов: 15 сек при 95°C и 60 сек при 60°C; определение кривой плавления производилось с шагом 0,3°C. Программное обеспечение StepOne v2.0 (Applied Biosystems, США).

Для анализа соответствующих последовательностей генов использовали праймеры:

Для гамма-синуклеина:

Psn_up	CCATGGACGTCTTCAAGAAAGG
Gsex2_rev	CGTTCTCCTTGGTTTTGGTG

Для GAPDH

GAPDH for	CACTGAGCATCTCCCTCACA
GAPDH rev	GTGGGTGCAGCGAACTTTAT

2.2.3 Получение синаптических везикул

Синаптические везикулы выделяли из полосатого тела мозга трансгенных бессинуклеиновых мышей (схема выделения представлена на рисунке 8). Из мозга бессинуклеиновых мышей препарировали полосатое тело, так как в данной анатомической области находятся синапсы дофаминергических нейронов черной субстанции, подверженной патологическим изменениям при БП. Далее ткани полосатого тела гомогенизировали на льду в 10 объемах буфера, содержащего 0,32 М сахарозы, 5 mM HEPES (pH 7.4) и ингибитор протеаз (Complete mini EDTA-free protease inhibitors, Roche Applied Science). Затем клеточный дебрис и ядра отделяли низкоскоростным центрифугированием при $1000\times g$, 10 минут, $2^{\circ}C$. Полученный супернатант центрифугировали при ускорении $20000\times g$ 20 минут при $2^{\circ}C$ для осаждения синаптосомальной фракции. Осадок ресуспендировали на вортексе в 0,32 М сахарозе, переносили в стеклянный (glass-Teflon) гомогенизатор, добавляли 4 объема холодной дистиллированной 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 mM, соответственно, и центрифугировали синаптосомальный лизат в течение 20 минут при $20000\times g$ при $2^{\circ}C$ для осаждения вскрытых синаптосом. Супернатант, содержащий синаптосомальные везикулы, центрифугировали 40 минут при $120000\times g$ при $2^{\circ}C$ для осаждения везикул. Полученный осадок, содержащий синаптические везикулы, ресуспендировали в двукратном Лэммли буфере, содержащем ДСН, и кипятили 5 минут, после чего замораживали и использовали для анализа белков в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).

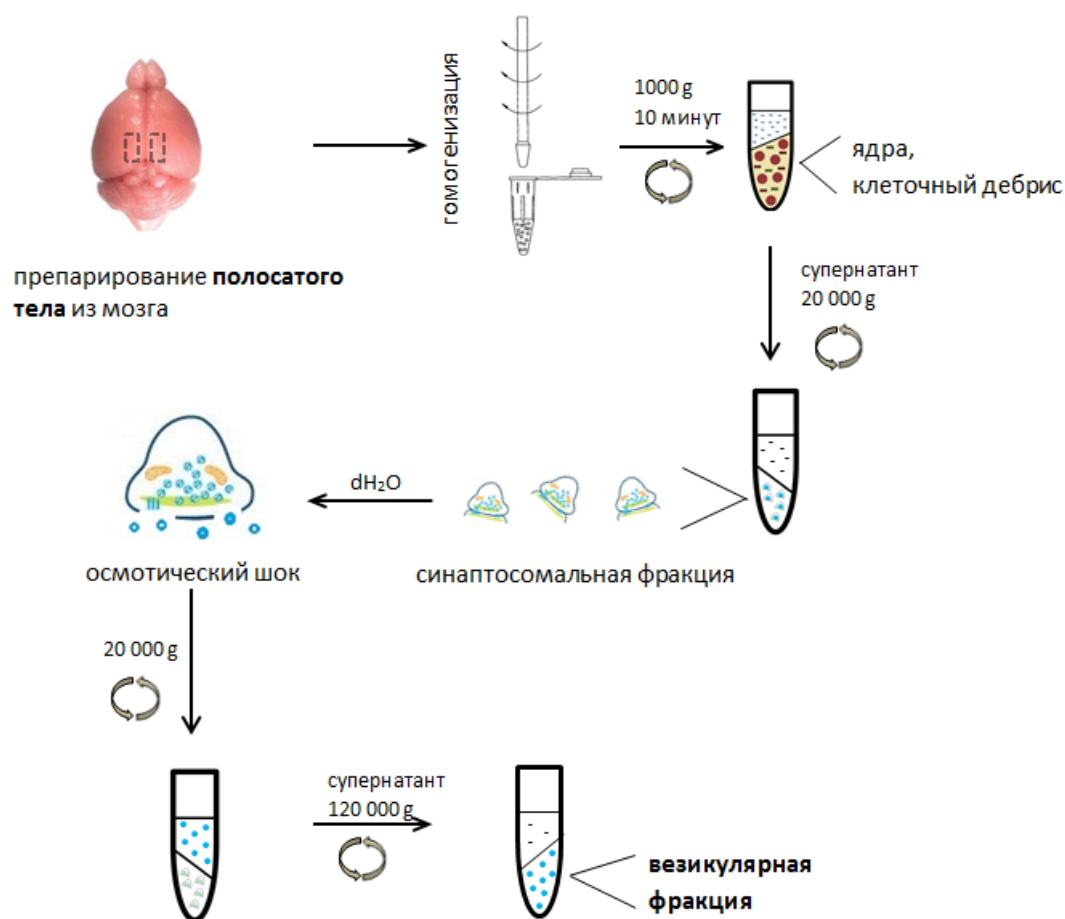


Рисунок 8 – Схема выделения синаптических везикул.

Связывание рекомбинантных синуклеинов с синаптическими везикулами

После получения фракции синаптических везикул конечный супернатант разделяли на 4 части, добавляли к каждой из четырех аликвот рекомбинантный альфа-синуклеин, или гамма-синуклеин, или их химерный вариант – ga-синуклеин из расчета 10 мкг рекомбинантного белка на 1 мл лизата; в контрольную аликвоту добавляли соответствующий объем буфера. Лизаты инкубировали 30 минут при 30°C и осаждали везикулы высокоскоростным центрифугированием при 120000×g в течение 40 минут (2°C). Осадки везикулярной фракции

промывали и анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против альфа- или гамма-синуклеинов.

2.2.4 Денатурирующий электрофорез в ПААГ

Анализируемые образцы разделяли в ПААГ, содержащем от 10 до 16% акриламида/бисакриламида 1:30 (Sigma, США) в зависимости от размера анализируемых белков. Электрофорез проводили в системе BioRad при постоянном напряжении 200V в буфере, содержащем 25 мМ Трис-HCl, 192 мМ глицина, 0,1% ДСН.

После разделения в геле белки окрашивали Кумасси или использовали для последующего иммуноблоттинга.

Окраска ПААГ Кумаси G-250 и GelCode

После электрофореза ДСН-ПААГ отмывали 5 минут в воде. Далее переносили гель в красящий раствор (0,05% Coomassie G-250, 2% трихлоруксусная кислота, 20% метанол) и инкубировали при покачивании 15-20 минут, далее промывали водой.

Для окраски ПААГ после переноса белков на мембрану использовали Pierce GelCode Blue Stain Reagent (Thermo Scientific, США), гель окрашивали 10 минут при комнатной температуре, отмывали водой.

2.2.5 Иммуноблоттинг

Перед переносом поливинилиденфтоидную мембрану Hybond-P (Amersham, Великобритания) споласкивали в 100% метаноле, затем промывали бидистиллированной водой и оставляли в буфере для переноса (25 мМ Трис pH 7,2; 0,15 мМ глицин; 20% метанол). Перенос с геля осуществляли с помощью аппарата для полусухого блоттинга (TechWare, Sigma, США) в течение 90 мин при силе тока 32 мА. После

электроблоттинга мембрану споласкивали в Трис-боратном буфере (0,5М Трис; 1,38М NaCl; 0,027М KCl, pH 8.0), содержащем 0,1% Tween-20 (TBS/T) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в блокирующем растворе 4%-ого обезжиренного молока, приготовленного на TBS/T. Для детекции исследуемых белков мембрану инкубировали с соответствующими антителами, разведенными в том же блокирующем растворе, в течение ночи при +4°C. Использовали следующие антитела: к гамма-синуклеину – кроличьи поликлональные, клон SK23 [18], разведение 1:500; к альфа-синуклеину – мышинные моноклональные, клон Syn211, Santa Cruz Biotechnology, разведение 1:500; к синаптофизину – мышинные моноклональные, клон 2, BD Transduction Laboratories, разведение 1:5000; к SNAP-25 – мышинные моноклональные, клон 20, BD Transduction Laboratories, разведение 1:1000; к синаптобrevину-2/VAMP2 – мышинные моноклональные, клон 69.1, Synaptic Systems, разведение 1:3000; к синтаксину-1 – мышинные моноклональные, клон 78.2, Synaptic Systems, разведение 1:2000; к CSP-а – кроличьи поликлональные, Santa Cruz Biotechnology, разведение 1:1000.

После трех 10-минутных промывок в TBS/T мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа с антителами против иммуноглобулинов кролика или мыши (в соответствии с тем, какие антитела использовали на предыдущем этапе), конъюгированными с пероксидазой хрена (GE Healthcare, United Kingdom), разведенными в блокирующем растворе.

Иммунные комплексы визуализировали с помощью хемилюминесценции (реагент ECL+, Amersham, Великобритания). Интенсивность свечения полос оценивали с помощью программного пакета AlphaImager 2200 (AlphaInnotech Corporation, США).

2.2.6 Получение рекомбинантных синуклеинов

2.2.6.1 Клонирование

Кодирующие области альфа- и гамма-синуклеинов человека и их химерный вариант – ga-синуклеин были встроены в экспрессионные векторные плазмиды pCS19 или pGEX4T-1 (GE Healthcare, Великобритания). Для этого вырезали из уже имевшихся плазмидных конструкций кодирующие последовательности альфа- или гамма-синуклеинов человека по сайтам рестрикционных эндонуклеаз BamHI и XhoI, лигировали в соответствующие векторные ДНК и проводили трансформацию компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* BL21(DE3). Так же были получены и химерные синуклеины (Рис 16).

Корректность первичных последовательностей эукариотических вставок экспрессионных плазмид подтверждали секвенированием.

2.2.6.2 Продукция рекомбинантных синуклеинов в бактериальных системах

Бактерии *E.coli* BL21(DE3), содержащие плазмидные конструкции для экспрессии рекомбинантных синуклеинов, высевали из замороженных стоков на чашку с LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина, инкубировали ночь при 37°C и отбирали единичную колонию для инокуляции в 5мл литической среды (lysogeny broth), содержащей 50 мкг/мл ампициллина. Бактериальную суспензию инкубировали при интенсивном встряхивании в течение ночи при 37°C. Полученными свежими ночными культурами инокулировали 250 мл подогретой литической средой, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировали при интенсивном встряхивании при 37°C, регулярно регистрируя оптическую плотность бактериальных культур при 600 нм (OD₆₀₀). По достижении OD₆₀₀ значения 0.3, что соответствует логарифмической фазе

роста бактерий, проводили индукцию синтеза белка в бактериях добавлением к культурам изопропил бета-D-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 100 мкМ и продолжали инкубацию при интенсивном встряхивании при 22°C. Через различные промежутки времени после индукции синтеза проводили отбор аликвот (1 мл) бактериальной суспензии, осаждали низкоскоростным центрифугированием, промывали холодным PBS, снова осаждали и ресуспендировали бактериальную массу в 100 мкл буфера для нанесения белка на ДСН-ПААГ. Последнюю аликвоту отбирали на анализ после ночной инкубации индуцированных бактериальных культур при 22°C. Проверяли в ДСН-ПААГ появление после индукции белковых полос, соответствующих по молекулярному весу ожидаемым синуклеинам (Рис. 9) и в случае наличия в образцах выраженной полосы заданного размера выделяли из бактериальной массы рекомбинантный белок.

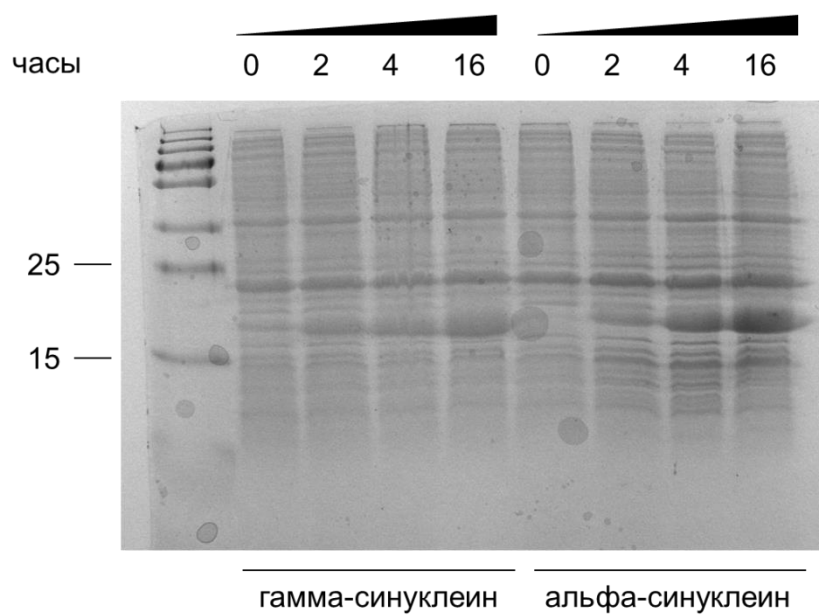


Рисунок 9 – Детекция индукции синтеза рекомбинантных синуклеинов в клетках *E.coli* KU98 через различное время после добавления IPTG.

2.2.6.3 Очистка рекомбинантных синуклеинов из бактериального штамма-производителя

Очистку рекомбинантных синуклеинов проводили по протоколу для выделения термостабильных белков [67] с модификациями.

Бактериальные суспензии центрифугировали при 5000xg в течение 20 минут при 4°C в бакет-роторе; промывали биомассу холодным PBS, центрифугировали при 5000xg в течение 20 минут при 4°C в бакет-роторе и замораживали осадки при -80°C. Добавляли к замороженным осадкам 2,5 мл буфера, содержащего 25 mM Трис-HCl pH 8.0 и 150 mM NaCl, ресуспендировали до абсолютно гомогенного состояния и переносили в 15 мл пробирку типа Falcon. Обработывали ультразвуком 5 раз по 30 секунд на максимальной частоте с охлаждением на льду в перерывах между пульсами и центрифугировали в пробирках типа Eppendorf при максимальной скорости в настольной центрифуге 15 минут при 4°C. Аккуратно отбирали супернатант, переносили в 15 мл пробирку типа Falcon и прогревали на кипящей водяной бане в течение 20 минут после чего немедленно помещали пробирку в лед на 5 минут. Центрифугировали в пробирках типа Eppendorf при 12000xg при максимальной скорости в настольной центрифуге 15 минут при 4°C для освобождения от денатурированных кипячением белков и отбирали супернатант, содержащий термостабильные белки. Центрифугировали еще раз в таких же условиях, отбирали супернатант и разделяли на аликвоты, которые замораживали и хранили при -80°C.

В случае GST (Glutathione S-transferase)-конъюгированных синуклеинов кипячение не проводили. После ультразвуковой обработки к полученному супернатанту добавляли 1/6 объема глутатион-сефарозы 4B (GE Healthcare, United Kindom), инкубировали при 4°C в течение 2 часов при медленном вращении, несколько раз отмывали частицы сефарозы холодным PBS, центрифугировали при 1000xg 1 минуту и использовали в экспериментах GST pull-down.

2.2.7 Клеточные культуры

Адгезивная перевиваемая клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y была получена из Европейской коллекции клеточных культур (European Collection of Cell Cultures - ECACC), каталожный No 94030304. Культуру вели на матрасах (Corning Flask, 25см²) в CO₂-инкубаторе (GalaxyR) при 37°C, 5% CO₂, относительной влажности воздуха 80%. Пассаж проводили каждые 4-5 дней. Для экспериментов использовали клеточные культуры, прошедшие не более 20 пассажей.

2.2.7.1 Приготовление культуральных сред

В качестве основной среды для культивирования клеток SH-SY5Y использовали 1:1 смесь минимальной среды Дульбекко (Dulbecco's Minimum Essential Medium) и F12 с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной сыворотки телят (FBS), 1% незаменимых аминокислот (MEM Non-essential amino acids), L-глутамина (2 мМ) и смеси антибиотиков пенициллина-стрептомицина (20 единиц/мл). Готовую среду хранили при +4°C не дольше 15 дней.

2.2.7.2 Ведение клеточных культур

Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (GalaxyR) при 37°C, 5% CO₂, относительной влажности воздуха 80% и пересевали культуры в состоянии суб-монослоя, когда они занимали 80-90% поверхности культуральной посуды. К промытым фосфатно-солевым буфером клеткам добавляли раствор 0,25% трипсина с 0,5 мМ ЭДТА по 1 мл на матрас или 2 мл на чашку Петри Ø 10 см и помещали в CO₂-инкубатор на 5 минут. Трипсин инактивировали добавлением среды с сывороткой, тщательно пипетировали, переносили в пробирку, центрифугировали при 1000xg 5 минут, осадок ресуспендировали и проводили подсчет в камере Hawksley.

Рассевали клетки по 2×10^5 КОЕ на матрас или 5×10^5 КОЕ на чашку Петри Ø 10 см.

2.2.7.3 Дифференцировка клеточной культуры SH-SY5Y

Недифференцированные клеточные культуры рассевали на Ø 10 мм стекла из расчета 5×10^3 клеток на лунку. На следующий день меняли среду на свежую с добавлением ретиноевой кислоты до конечной концентрации 10 мкМ (All-trans retinoic acid, Sigma, США). Среду с ретиноевой кислотой меняли каждые 2 дня.

Статистическая обработка.

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

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Получение линии бессинуклеиновых мышей

Для того чтобы в экспериментах *in vitro* использовать рекомбинантные синуклеины и получить адекватные результаты, необходимо было получить модельных животных, не содержащих собственных эндогенных синуклеинов. Для этого нами были проведены работы по получению линии бессинуклеиновых мышей.

3.1.1 Получение линии двойного нокаута по генам альфа- и гамма-синуклеинов

На первом этапе была получена линия мышей с одновременной генетической инактивацией альфа- и гамма-синуклеинов. Для этого проводили скрещивание между мышами нокаутных линий а-КО и g-КО, которыми располагала лаборатория. 8 самок а-КО были скрещены с двумя самцами g-КО и 8 самок g-КО были скрещены с двумя самцами а-КО. Все полученные в первом поколении 98 особей, как и ожидалось, были гетерозиготными по мутированным локусам альфа- и гамма- синуклеинов, что было подтверждено выборочным анализом ДНК потомков первого поколения (F1). Пример результатов генотипирования приведен на рисунке 10.

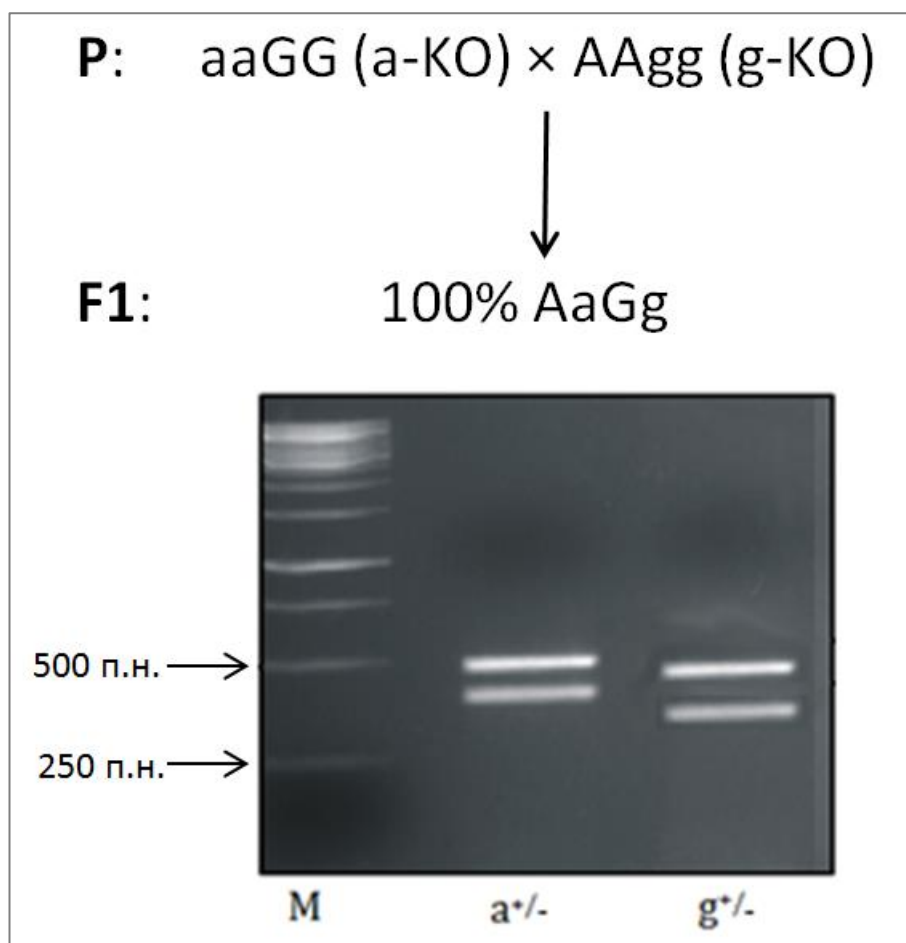


Рисунок 10 – Генетический анализ ДНК мышей методом ПЦР на присутствие модификаций в локусах альфа- и гамма-синуклеинов. Прописными буквами А и G обозначены немутированные локусы альфа- и гамма-синуклеинов, соответственно; строчными буквами а, g обозначены мутированные локусы альфа- и гамма-синуклеинов, соответственно. Нативным немутированным локусам соответствуют фрагменты 520 п. н. и 490 п. н. для альфа- и гамма-синуклеинов; мутированным локусам соответствуют фрагменты 450 п. н. и 397 п. н.

Всех полученных в первом поколении самок ($n=40$) скрещивали с самцами первого поколения ($n=10$). Результатом такого скрещивания являлось формирование девяти возможных генотипов, которые были определены анализом ДНК из биопсий уха всех потомков методом ПЦР (Рис. 11). В результате такого скрещивания в соответствии с менделевским типом наследования у животных второго поколения следовало ожидать девять вариантов генотипов, которые и были идентифицированы нами после генотипирования всех потомков: AAGG – 21 особь; AAGg – 39 особей; AaGG – 43 особи; AaGg – 84 особи; AAagg – 18 особей; Aagg – 35 особей; aaGG – 27 особей; aaGg – 51 особь; aagg – 19 особей (Рис. 11).

При менделевском типе наследования вероятность появления особей, имеющих aagg генотип, то есть двойных нокаутных животных по альфа- и гамма-синуклеинам, составляет $1/16$ (6,25%). В результате проведенных скрещиваний нами было получено 19 особей с генотипом aagg, что составляет 5,6% от общего числа ($n=337$) прогенотипированных доживших до половозрелого возраста потомков, и, таким образом, соответствует расчетному количеству.

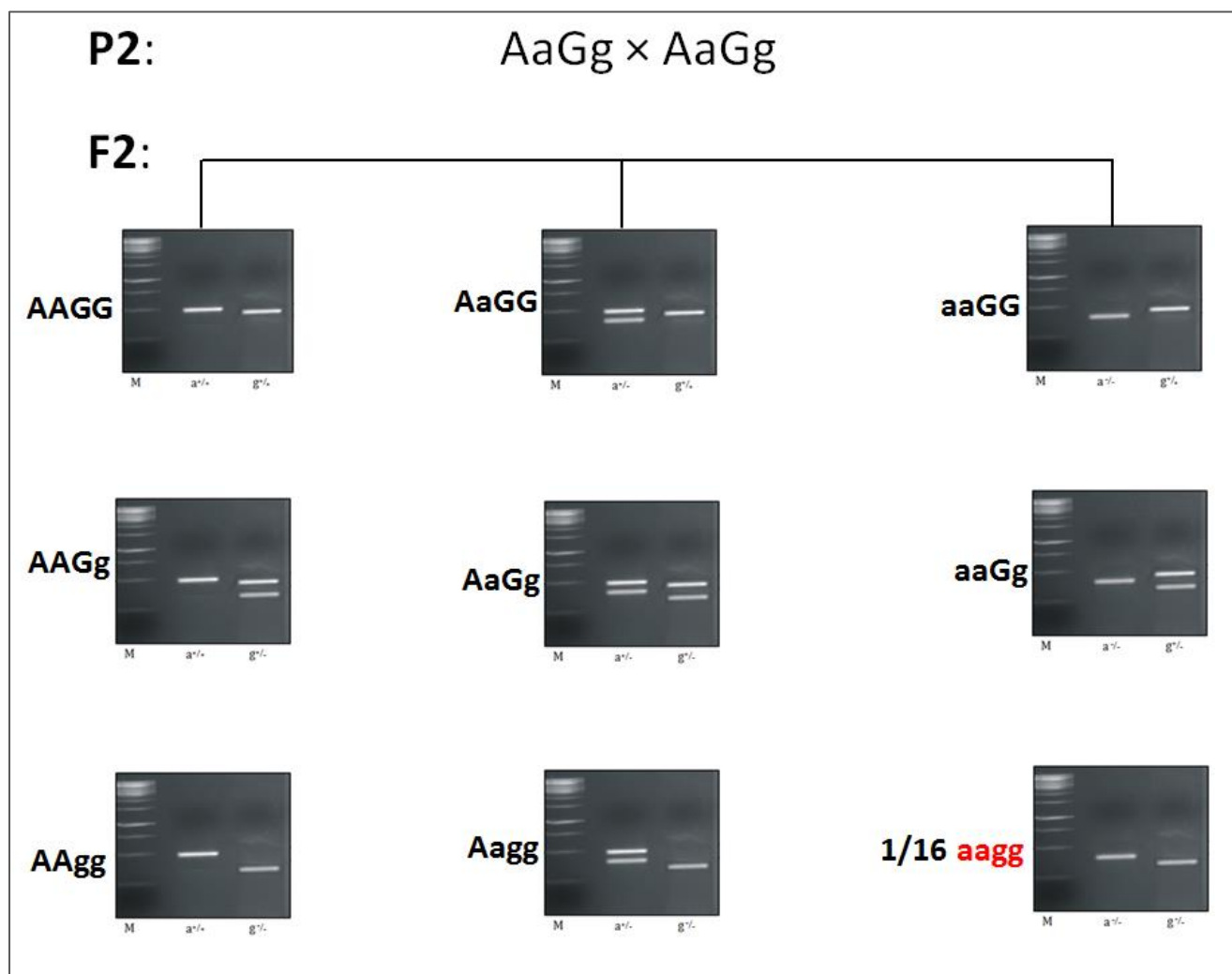


Рисунок 11 – Варианты генотипов, полученные у животных второго поколения, по локусам альфа- и гамма-синуклеинов. ПЦР-анализ геномной ДНК. Прописными буквами А и G обозначены немутированные локусы для альфа- и гамма-синуклеинов; строчными буквами а и g обозначены мутированные локусы для альфа- и гамма-синуклеинов.

3.1.2 Получение линии бессинуклеиновых животных – тройного нокаута по генам альфа-, бета- и гамма-синуклеинов

Мышей полученной линии двойного ag-нокаута использовали для скрещивания с нокаутными по бета-синуклеину мышами линии b-KO (Рис. 12). Для первого раунда скрещиваний было отобрано 15 самок ag-KO, которых скрещивали с самцами b-KO, и 15 самок b-KO, которых скрещивали с самцами ag-KO. В первом поколении все полученные потомки должны иметь одинаковый генотип, соответствующий гетерозиготному состоянию по всем трем мутированным аллелям синуклеинов – AaBbGg, поскольку все три гена, кодирующие синуклеины, как у мыши, так и у человека, находятся на разных хромосомах. Действительно, все потомки первого поколения оказались гетерозиготными по всем трем мутированным аллелям синуклеинов, что было подтверждено выборочным генотипированием F1 потомков (Рис. 12).

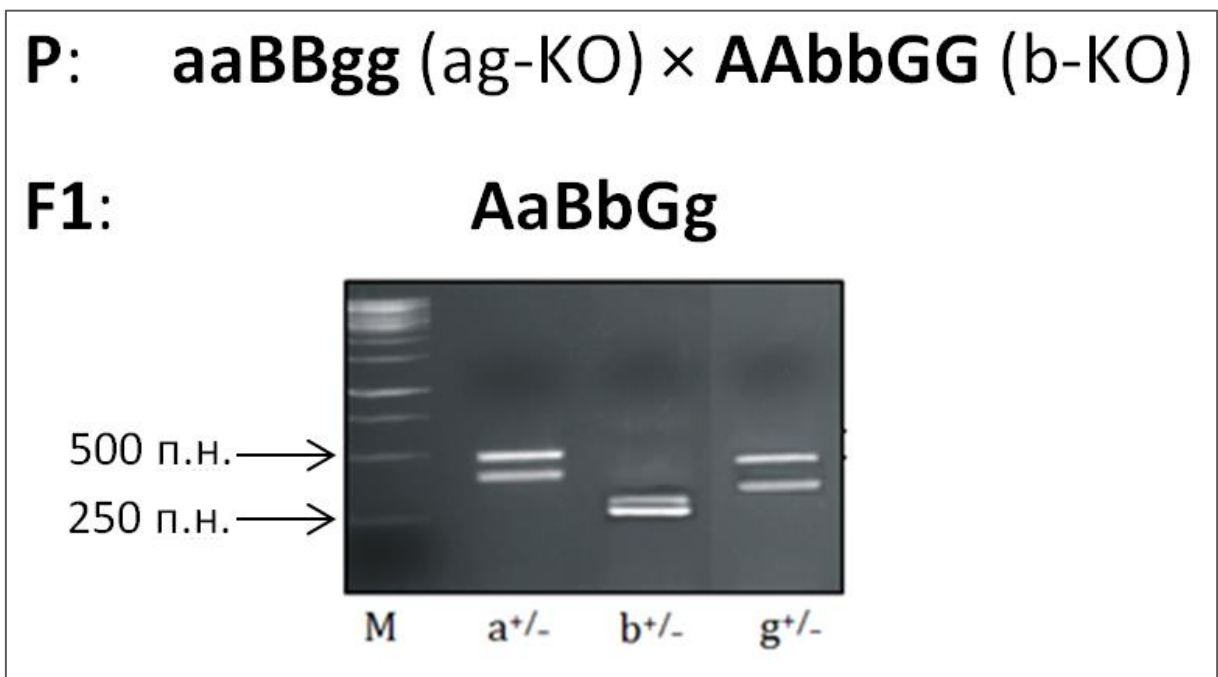


Рисунок 12 – Генетический анализ ДНК на присутствие модификаций в локусах альфа-, бета- и гамма- синуклеинов у потомков первого поколения методом ПЦР. Буквами А, В и G обозначены немутированные локусы альфа-, бета- и гамма-синуклеинов; буквами а, b и g обозначены мутированные локусы альфа-, бета и гамма-синуклеинов. Нативным немутированным локусам соответствуют фрагменты 520 п. н., 320 п. н. и 490 п. н. для альфа-, бета-и гамма-синуклеинов; мутированным локусам соответствуют фрагменты 450 п. н., 300 п. н. и 397 п. н., соответственно. Слева указаны размеры маркерных полос.

Поскольку при скрещивании между собой животных, гетерозиготных по мутированным локусам всех трех синуклеинов, при менделевском типе расщепления ожидается 27 вариантов генотипов (Таблица 1), а вероятность получения варианта с мутированными синуклеинами в гомозиготном состоянии для всех трех генов составляет 1/64, на следующем этапе было использовано, соответственно, большее число самок для скрещивания. Всего в F2 было получено половозрелое потомство от 80 самок, гетерозиготных по всем трем синуклеинам, скрещенных с самцами такого же генотипа (AaBbGg). Результаты генотипирования всех животных, полученных во втором поколении, представлены в Таблице 1. Среди 581 полученных и прогенотипированных взрослых животных в F2 было выявлено 9 особей (5 самок и 4 самца) с генотипом aabbgg, то есть нокаутных по трем синуклеинам – альфа, бета и гамма.

Далее колония бессинуклеиновых мышей $a^{-/-}b^{-/-}g^{-/-}$ была размножена и велась как отдельная линия, что не требовало постоянного генотипирования. Однако проверочный анализ ДНК проводился периодически для основных производителей.

В процессе данной работы были получены также три колонии двойных нокаутов, которые содержали лишь один из трех генов синуклеинов: bg-КО (в геноме таких мышей имеется лишь один функциональный синуклеин – альфа), ag-КО (в геноме этих мышей имеется лишь один функциональный синуклеин – бета) и ab-КО (в геноме имеется лишь один функциональный синуклеин – гамма) (Таблица 1).

Животные всех полученных линий были фертильны и по показателям роста и другим внешним основным признакам не отличались от контрольных животных дикого типа. Это позволило размножить полученных нокаутных мышей и вывести в отдельные линии, которые дальше поддерживались без генотипирования с периодическими выборочными проверками основных производителей.

В тех экспериментах, где требовались контрольные животные с немодифицированным геномом, использовали группу AABBG (WT), которая так же была выведена в отдельную сублинию (Таблица 1).

Таблица 1 – Количество потомков с различными генотипами, полученных при скрещивании мышей, гетерозиготных по трем мутантным локусам синуклеинов (AaBbGg)

F2:

Генотип*	Количество особей
AABBGG (WT)	7
AABBGg	22
AABbGg	33
AaBbGg	72
AaBBGG	22
AaBBGg	41
AABbGG	15
AABBgg (g-KO)	8
AABbgg	16
AaBbgg	34
AaBBgg	21
AAbbgbg (bg-KO)	11
Aabbgg	17
AAbbGg	18
AabbGg	45
aaBbGg	40
aaBbgg	19
aabbGg	16
aaBBGG (a-KO)	12
aaBBGg	20
AaBbGG	26
aaBbGG	19
aaBBgg (ag-KO)	10
AAbbGG (b-KO)	13
AabbGG	8
aabbGG (ab-KO)	7
aabbgg (abg-KO)	9

* – Генотипы всего потомства, полученного от 80 самок

3.1.3 Подтверждение отсутствия всех трех белков синуклеинов в тканях мышей линии abg-KO

Для того чтобы подтвердить, что в созданной нами линии мышей действительно отсутствовали белки всех трех синуклеинов, был проведен анализ содержания синуклеинов в препаратах тотального белка, полученных из тканей нервной системы. Из головного и спинного мозга взрослых самцов бессинуклеиновой линии мышей abg-KO и из контрольной линии дикого типа (WT) был выделен тотальный белок и проанализирован методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител против альфа-, бета- и гамма-синуклеинов мыши. На рисунке 13 представлены результаты, которые показывают, что в линии abg-KO действительно полностью отсутствуют все три белка семейства в тех тканях, где в норме они обнаруживаются в наибольшем количестве – в тканях головного и спинного мозга.

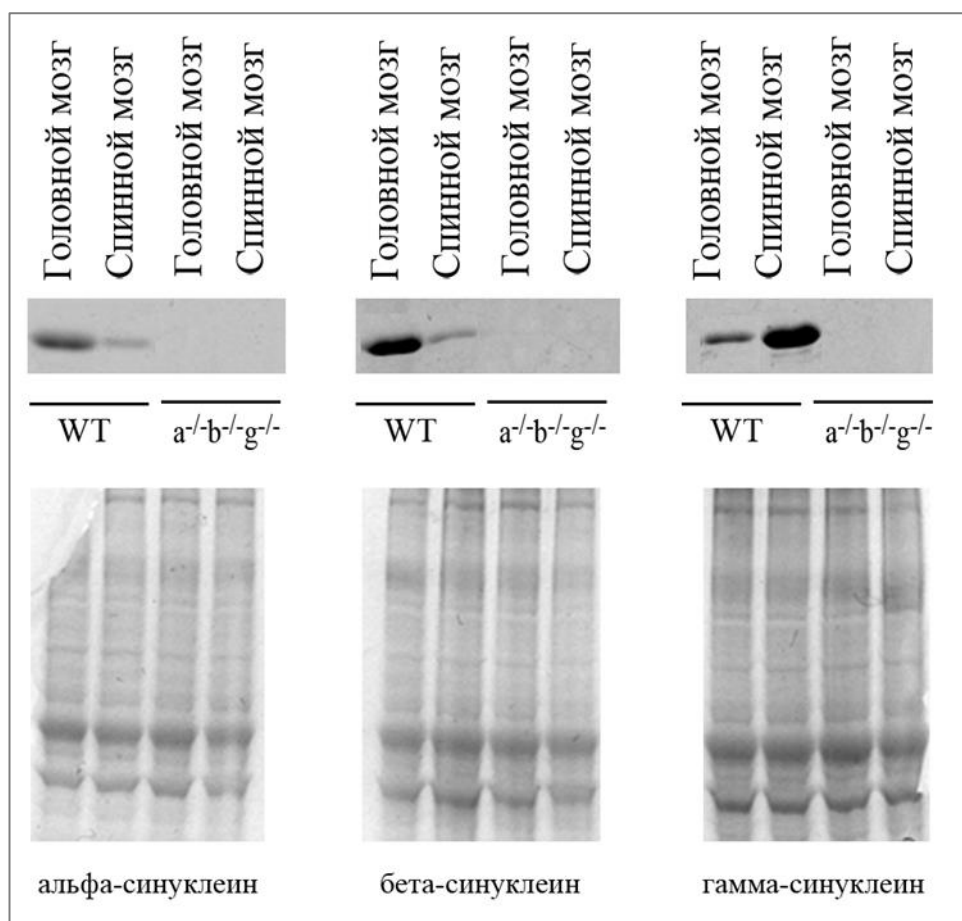


Рисунок 13 – Анализ синуклеинов в тканях головного и спинного мозга нокаутных и контрольных животных методом иммуноблоттинга. Детекция антителами против альфа-, бета- и гамма-синуклеинов мыши. На нижней панели окраска остаточного белка в геле после переноса на мембрану реагентом GelCode.

3.2 Анализ связывания рекомбинантного гамма-синуклеина с синаптическими везикулами

Нормальные функции синуклеинов остаются неизвестными, несмотря на многочисленные данные об участии этих белков в различных клеточных процессах. Генетическая инактивация синуклеинов у модельных мышей приводит к постепенному развитию синаптической дисфункции [8; 11]. Недавно полученные данные говорят о прямом

взаимодействии альфа-синуклеина с везикулярными структурами, обеспечивающими нейротрансмиссию. Более того, было показано прямое взаимодействие альфа-синуклеина с белками SNARE-комплексов, которые играют ключевую роль в сложной последовательности строго регулируемых событий процесса слияния везикул, содержащих нейромедиаторы, с пресинаптической мембраной в нейрональных синапсах [22].

Структурное сходство альфа- и гамма-синуклеинов, их преимущественно нейрональная экспрессия [19] 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 нигростриатной системы, дофаминового обмена и формировании поведенческих реакций [8; 11; 59; 75-76; 121; 147], исследование непосредственного механизма действия этого пресинаптического белка в нейротрансмиссии ранее не проводилось. Так, в работах Wersinger C. и Sidhu A. было показано, что гамма-синуклеин способен регулировать активность серотонинового транспортера, что предполагает новую роль данного белка в физиологической регуляции и поддержании серотонинового гомеостаза и выведения из синаптической щели. Следовательно, гамма-синуклеин может быть вовлечен в формирование аффективных расстройств и депрессии [147]. В работах Anwar S. [11] показано, что совместно с другими членами семейства синуклеинов гамма-синуклеин принимает участие в регуляции дофаминергической нейротрансмиссии и, таким образом, также может вносить определенный вклад в развитие патологических состояний нервной системы, приводящих к депрессии.

Исследования Senior S.L. с соавторами показали, что совместное удаление альфа- и гамма-синуклеинов может приводить к повышенному выбросу дофамина, возможно, путем изменения способности тонко

регулировать процессы слияния синаптических везикул с клеточной мембраной в ответ на стимул. При этом удаление либо альфа-, либо гамма-синуклеина может быть функционально компенсировано остальными членами семейства синуклеинов [121].

Becket Greten-Harrisona с группой исследователей обнаружили, что у бессинуклеиновых мышей развивается выраженная возраст-зависимая нейрональная дисфункция и уменьшается продолжительность жизни. Патологические изменения детектируются у стареющих бессинуклеиновых мышей в гиппокампе и сетчатке глаза. Делеция генов синуклеинов в модельных мышах оказывала негативный эффект на структуру синапсов, в первую очередь на терминали, в которых отмечались выраженные дегенеративные изменения и их постепенная редукция [59].

Кохан В.С. с соавторами показали, что отсутствие гамма-синуклеина в геноме модельных мышей повышает ориентировочно-исследовательскую активность в новой обстановке и снижает уровень ситуативной тревожности животных. Вероятной причиной таких изменений поведения мутантных мышей может являться нарушение молекулярного механизма синаптической передачи в определенных популяциях нейронов, лишенных гамма-синуклеина [75].

Несмотря на обширные исследования семейства синуклеинов, данные, полученные по гамма-синуклеину, оказались недостаточными, чтобы даже на уровне гипотез была сформулирована концепция роли гамма-синуклеина в каскадных путях нейротрансмиссии. В данной работе нами было проведено сравнительное исследование взаимодействия альфа- и гамма-синуклеинов с синаптическими везикулами, выделенными из тканей полосатого тела головного мозга бессинуклеиновых мышей. Для того, чтобы исключить влияние каждого из членов семейства синуклеинов на исследуемые взаимодействия с везикулами, содержащими нейромедиатор, в работе были использованы генетически модифицированные мыши с

удаленными альфа-, бета- и гамма-синуклеинами (тройной нокаут) [11], получение которого описано выше. Нами были сконструированы и наработаны в достаточных количествах рекомбинантные синуклеины, что при отсутствии эндогенных белков в лизатах позволяло изучать связывание *in vitro*.

3.2.1 Получение рекомбинантных синуклеинов

Для получения рекомбинантных альфа- и гамма-синуклеинов человека кодирующие их последовательности были амплифицированы из плазмидных конструкций [106] с помощью ПЦР и клонированы в экспрессионный вектор pRK172, который позволяет нарабатывать эукариотические белки в бактериальной системе *E. coli* BL21 (DE3) с высоким выходом.

Корректность конечных продуктов клонирования была подтверждена секвенированием полученных плазмид.

Для создания химерного га-синуклеина участок кДНК g-синуклеина с 285 по 381 нуклеотид был заменен в плазмидной конструкции на участок с 285 по 420 нуклеотид из плазмидной конструкции а-синуклеина (Рис. 14).

Таким образом была сконструирована плазида, которая кодировала химерный га-синуклеин, содержащий N-конец гамма-синуклеина, включая NAC-домен (аминокислоты с 1 по 95), и C-конец альфа-синуклеина (аминокислоты с 96 по 140).

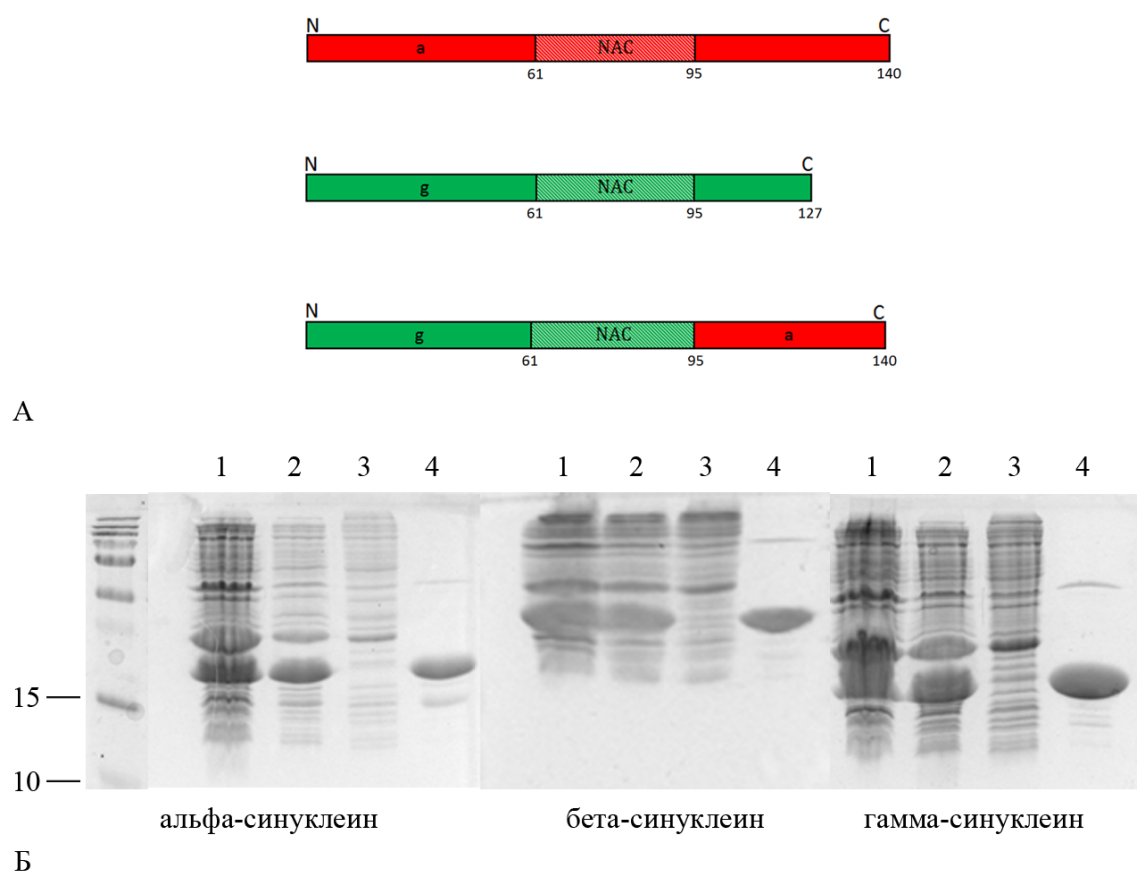


Рисунок 14 – Рекомбинантные синуклеины, полученные на основе экспрессионного вектора pRK172. (А) Доменная структура. (Б) Анализ рекомбинантных белков в 16% ПААГ. 1 – бактериальный лизат после озвучивания; 2 – осветленный супернатант после осаждения клеточного дебриса; 3 – термочувствительная фракция (осадок); 4 – термоустойчивая фракция (супернатант). Окрасивание Кумасси.

Белки, наработанные в *E. coli* BL21 (DE3), очищали из термоустойчивой фракции, как описано в разделе «материалы и методы», и использовали для связывания со свежеприготовленными синаптическими везикулами.

3.2.2 Связывание рекомбинантных синуклеинов с синаптическими везикулами

Препараты очищенных везикул синаптической фракции были выделены из тканей полосатого тела головного мозга генетически модифицированных мышей с инактивированными генами альфа-, бета- и гамма-синуклеинов (тройной нокаут).

На рисунке 3.2.2 представлены результаты связывания синаптических везикул с рекомбинантным альфа-синуклеином (А) и гамма-синуклеином (Б), из которых следует, что гамма-синуклеин способен связываться с везикулярными структурами. Чтобы сравнить эффективность связывания гамма-синуклеина с эффективностью связывания альфа-синуклеина был использован химерный рекомбинантный белок га-синуклеин, содержащий большую часть молекулы гамма-синуклеина, включая NAC-область (аминокислоты с 1 по 95), и С-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (аминокислоты с 95 по 140). га-Синуклеин содержит эпитопы, которые распознаются антителами, использованными для детекции альфа-синуклеина, а также антителами против гамма-синуклеина, что позволяет сравнивать количественно содержание этих белков в исследуемых препаратах везикул (Рис. 15).

При уравненных интенсивностях сигнала на рентгеновской пленке для га-синуклеина, связавшегося с везикулами, интенсивность сигнала для альфа-синуклеина и гамма-синуклеина были одинаковы. Таким образом, мы показали, что гамма-синуклеин способен взаимодействовать с

синаптическими везикулами с такой же эффективностью, как и альфа-синуклеин.

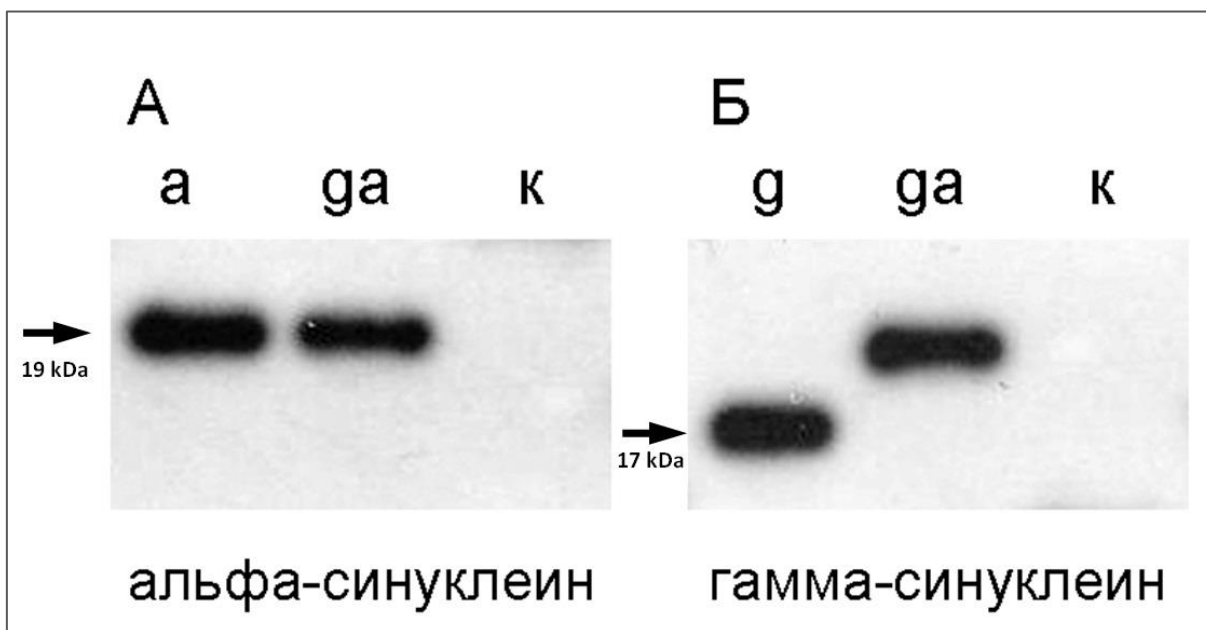


Рисунок 15 – Анализ связавшихся рекомбинантных синуклеинов с очищенной фракцией синаптических везикул лизатов мозга $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}\gamma^{-/-}$ мышей методом иммуноблоттинга. Детекция антителами против альфа-синуклеина (А) и гамма-синуклеина (Б). Препараты везикул после инкубации с альфа- (а), гамма- (g) или химерным (ga)-синуклеином, а также везикул, инкубированных без добавления синуклеинов (К).

3.3 Анализ связывания рекомбинантного гамма-синуклеина с белками SNARE-комплекса

В работах Sudhof T. с соавторами [22] было показано, что альфа-синуклеин способствует более эффективному формированию и сборке белковых комплексов (SNARE), обеспечивающих стыковку синаптических везикул с пресинаптической мембраной, и таким образом участвует в регуляции слияния мембран для высвобождения нейромедиатора из

везикул. Именно SNARE-комплексы являются мишенями для нейротоксинов, в том числе для бактериальных токсинов ботулизма и столбняка [17; 108], что делает эти комплексы исключительно важными молекулярными мишенями при разработке новых соединений для коррекции патологий нейротрансмиссии. В образовании SNARE-комплексов у человека принимают участие около 36 белков [66] и состав их может отличаться в зависимости от типа SNARE-комплекса. Однако принципиально важными в формировании везикулярных SNARE-комплексов пресинапсов являются три белка: синтаксин 1 и SNAP-25, которые локализованы на клеточной мембране, а так же пристыкованный к мембране везикул синаптобrevин 2.

В работах Sudhof T. было показано, что альфа-синуклеин эффективно связывается с белками SNARE-комплекса и тем самым стимулирует его сборку [22]. Роль гамма-синуклеина в формировании SNARE-комплекса ранее не исследовалась. Нами было изучено взаимодействие гамма-синуклеина с синаптобrevином-2/VAMP2, SNAP-25 и синтаксином-1 в лизатах синаптической фракции из полосатого тела мыши и проведено сравнение его по этим свойствам с альфа-синуклеином. Для этого были использованы GST-конъюгированные рекомбинантные синуклеины.

3.3.1 Получение рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов

Для получения рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов использовали экспрессионный вектор pGEX4T-1, в который переклонировали из уже имевшихся плазмидных конструкций кодирующие последовательности альфа- или гамма-синуклеинов человека по сайтам рестрикционных эндонуклеаз BamHI и XhoI (Рис. 16). Так же были переклонированы химерные синуклеины. Использование pGEX вектора обеспечивает получение в бактериальной системе

эукариотических белков, конъюгированных с глутатион-S-трансферазой, что позволяет легко проводить высоко эффективную аффинную очистку получаемых рекомбинантных белков на глутатион-сефарозе. Однако, при встраивании кДНК синуклеинов в этот вектор требовалось соблюдение корректности первичной последовательности и обеспечение совпадения рамки считывания, имеющейся в векторе последовательности узнавания тромбином непосредственно за глутатион-S-трансферазой. Это позволяло удалять из рекомбинантного синуклеина конъюгированную глутатион-S-трансферазу, что и было сделано для ряда экспериментов.

Все плазмидные конструкции были проверены прямым секвенированием, в котором были подтверждены и открытые рамки считывания, и наличие тромбинового сайта.

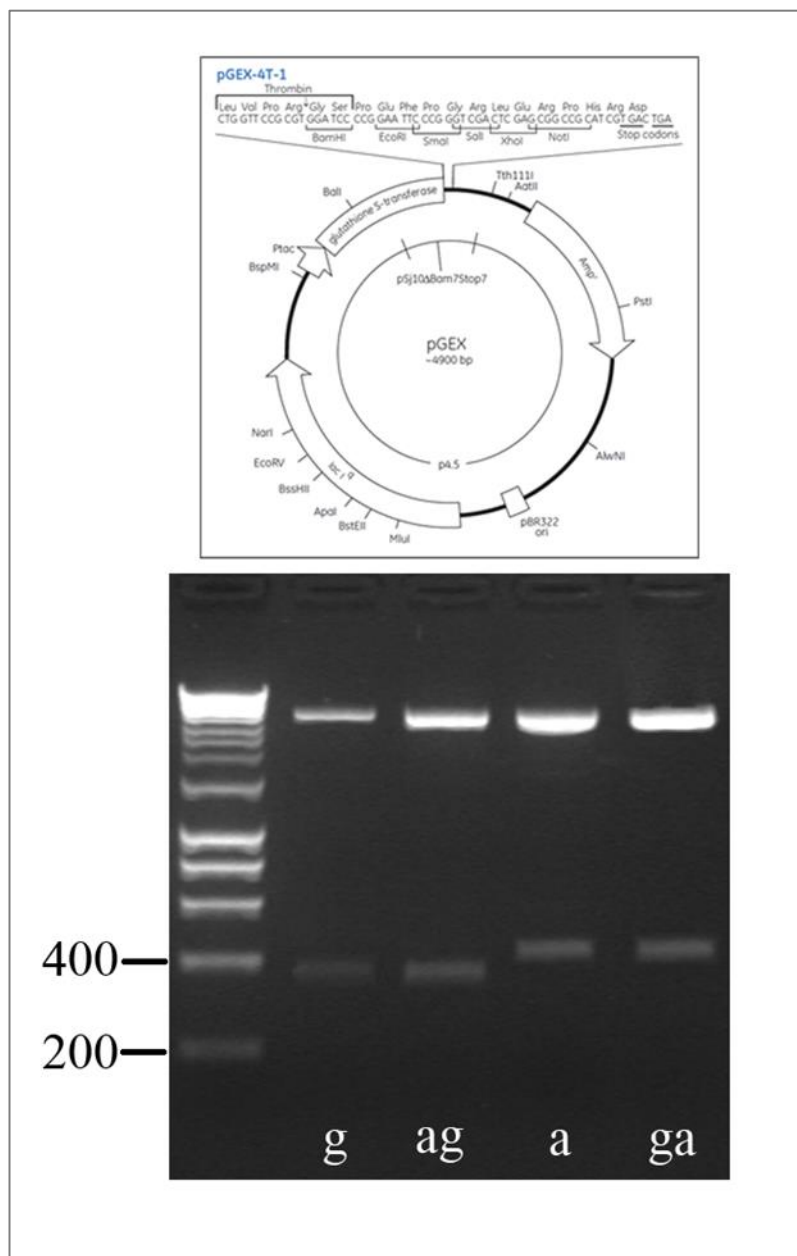


Рисунок 16 – Клонирование синуклеинов в векторе pGEX4T-1.

(А) Схема строения экспрессионного вектора pGEX4T-1 (GE Healthcare).

(Б) Анализ вставок в плазмидных конструкциях в 1% агарозном геле.

Рестрикция эндонуклеазами BamHI и XhoI.

Помимо конъюгированных альфа- или гамма-синуклеинов человека были получены еще два химерных варианта синуклеинов. Конструкт ag-синуклеин кодировал аминокислотную последовательность альфа-синуклеина с 1 по 95, включая NAC-домен, за которыми следовал С-конец гамма-синуклеина человека. Конструкт ga-синуклеин кодировал аминокислотную последовательность гамма-синуклеина с 1 по 95, включая NAC-домен, за которыми следовал С-конец альфа-синуклеина человека. На Рис. 17 представлен анализ плазмидных конструкций всех четырех синуклеинов, использованных в исследовании. При переваривании рестрикционными эндонуклеазами BamHI и XhoI выщеплялись фрагменты размером 381 п. н. для гамма-синуклеина и ag-синуклеинов, и 420 п. н. для альфа-синуклеина и ga-синуклеинов.

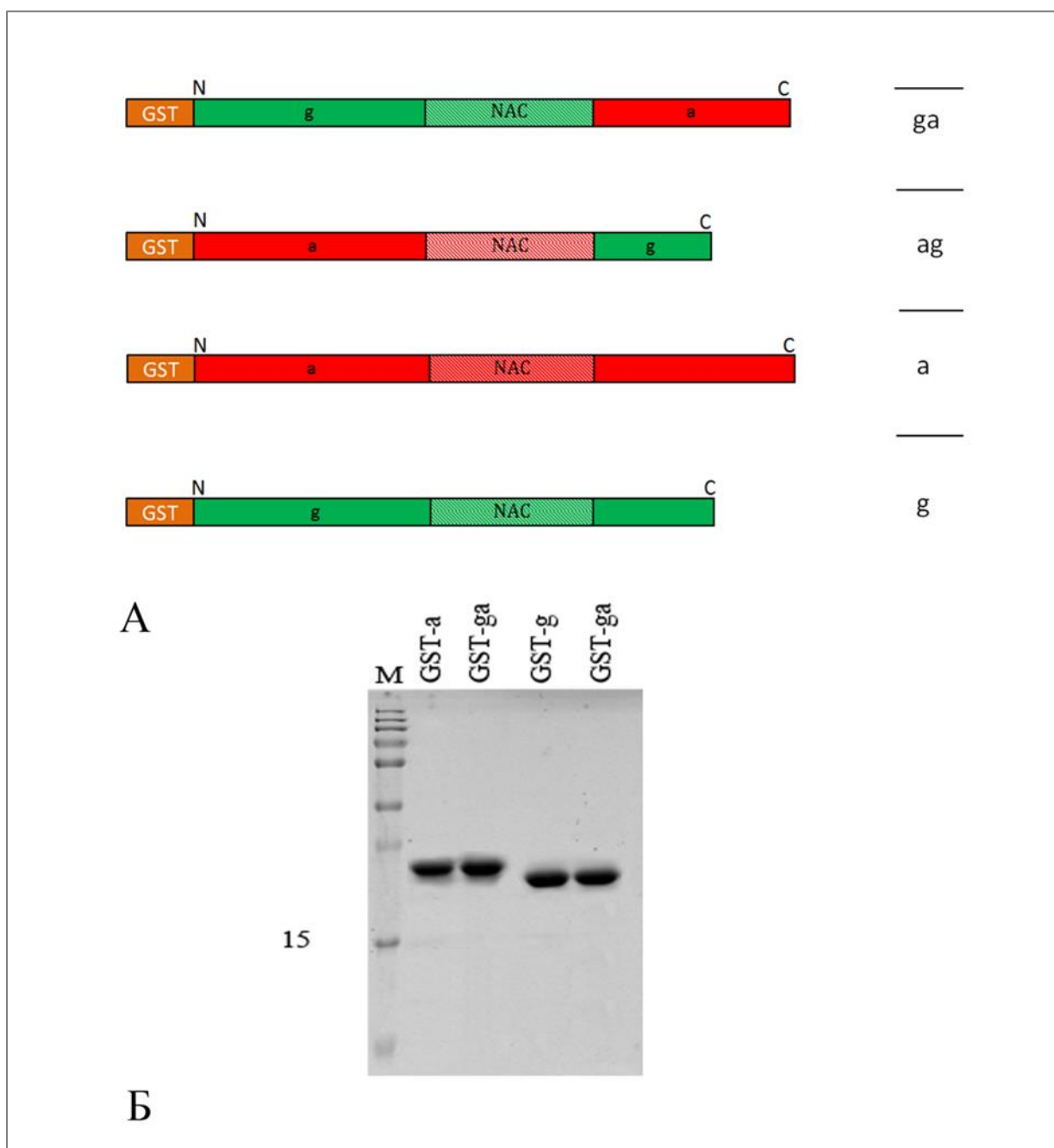


Рисунок 17 – Рекombинантные GST-конъюгированные синуклеины, полученные на основе экспрессионного вектора pGEX4T-1.

(А) Доменная структура рекombинантных синуклеинов. (Б) Анализ аффинно-очищенных GST-конъюгированных синуклеинов в 16% ПААГ. Окраска Кумасси G250.

Корректность конечных продуктов клонирования и правильность рамки считывания были подтверждены секвенированием полученных плазмидных конструкций. Полученными плазмидными конструкциями был трансформирован штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21(DE). После продукции рекомбинантных синуклеинов в бактериях биомассу озвучивали, а из осветленного супернатанта аффинно связывали GST-конъюгированные синуклеины с частицами глутатион-сефарозы 4В. Промытые частицы глутатион-сефарозы 4В с аффинно связанными GST-конъюгированными синуклеинами использовали для анализа взаимодействия синуклеинов с белками SNARE-комплекса.

3.3.2 Анализ связывания рекомбинантных GST-конъюгированных синуклеинов с белками SNARE-комплекса

Поскольку ранее было показано, что во фракции очищенных синапсомальных везикул не удастся получить связывание синуклеинов с белками SNARE-комплекса (неопубликованные данные), нами были использованы грубые синапсомальные фракции после осмотического вскрытия синапсом, полученных из тканей полосатого тела головного мозга генетически модифицированных мышей с инактивированными генами альфа-, бета- и гамма-синуклеинов (тройной нокаут) (Рис. 18). Полученную синапсомальную фракцию разделяли на 5 частей, добавляли к каждой из четырех аликвот рекомбинантный альфа-синуклеин или гамма-синуклеин или их химерные варианты ag-синуклеин или ga-синуклеин (Рис. 18), аффинно связанные с глутатион сефарозой на частицах; в контрольную аликвоту добавляли соответствующий объем буфера. Для лизиса везикулярных мембран добавляли равный объем ФСБ, содержащего 2% Triton X-100, и инкубировали 2 часа при 4°C, осторожно перемешивая. После инкубации частицы сефарозы отмывали от несвязавшихся белков 4 раза раствором PBS с 1% Triton X-100. Таким

образом, получали в составе белковых комплексов на частицах сефарозы извлеченные из синаптосомальных фракций белки, которые связались с GST-конъюгированными рекомбинантными синуклеинами, аффинно ассоциированными с глутатион-сефарозой. Элюцию белков с глутатион-сефарозы и диссоциацию белковых комплексов осуществляли кипячением образцов в буфере для ДСН-ПААГ электрофореза непосредственно перед нанесением на ПААГ. Анализ белков после ко-преципитации проводили методом иммуноблоттинга с использованием антител против синаптобревина-2/VAMP2, SNAP25 и синтаксина.

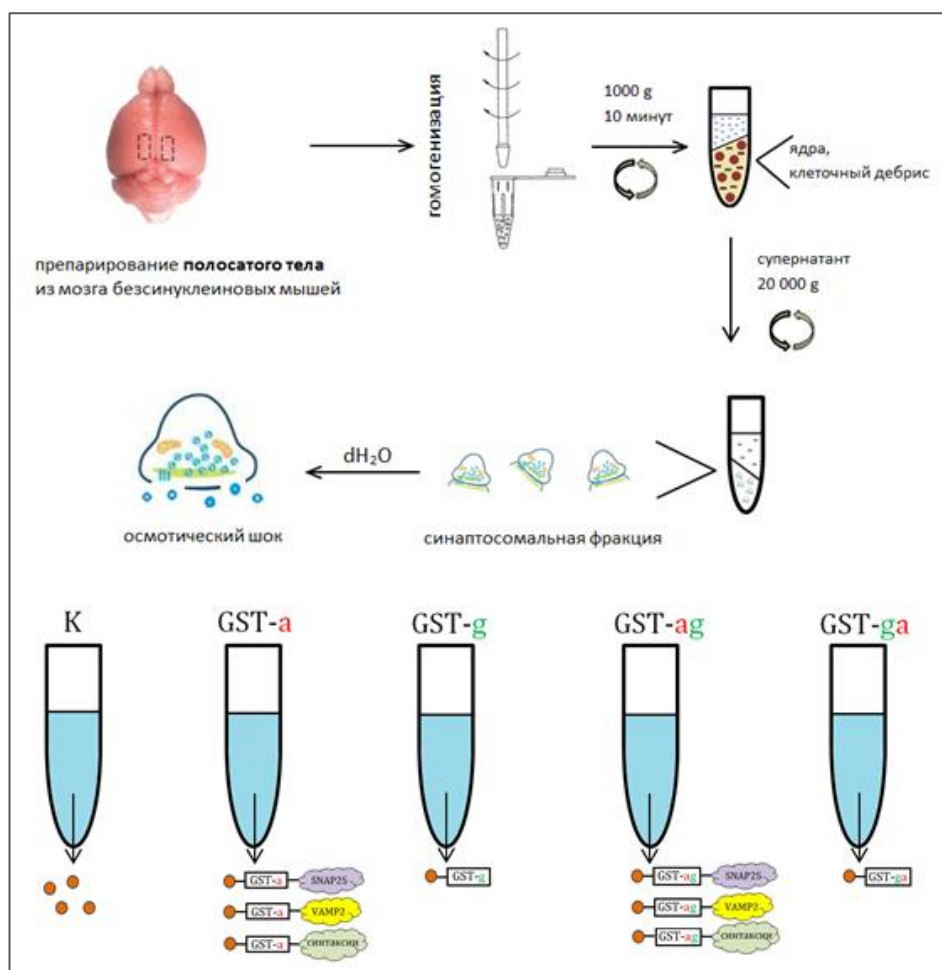


Рисунок 18 – Анализ связывания GST-конъюгированных рекомбинантных синуклеинов с белками SNARE-комплекса методом ко-преципитации.

Синаптобревин-2/VAMP2, синтаксин-1 и SNAP-25 – это три белка, участвующие в формировании SNARE-комплекса, образование которого является ключевым в выбросе нейромедиатора. Нарушение функции данных белков приводит к развитию синаптической дисфункции и, как следствие, к патологическим изменениям в нервной системе. Известно, что токсины ботулизма и столбняка гидролизуют SNARE-белки, что приводит к серьезным поражениям нервной системы [17].

Таким образом, патологическое изменение процессов формирования функциональных белковых комплексов с участием VAMP2, синтаксина-1 и SNAP-25 представляет непосредственный интерес при изучении функции синуклеинов, которые способны (или не способны) взаимодействовать с данными белками в норме и могут быть вовлечены в развитие патологических состояний в случае нарушения необходимой формы взаимодействия.

3.3.2.1 Связывание синуклеинов с синаптобревином-2/VAMP2

Синаптобревин-2 – небольшой везикулярный белок из 118 аминокислот, 18 кДа, высоко экспрессирующийся в нейронах и нейроэндокринных клетках. Синаптобревин-2 относится к семейству везикуло-ассоциированных мембранных белков. Синаптобревин-2 является основным компонентом SNARE-комплекса и участвует в стыковке синаптической везикулы с пресинаптической мембраной [79].

Синаптобревин-2 является жизненно важным белком, так как известно, что гомозиготные нокаутные по кодирующему его гену мыши погибают вскоре после рождения. Новорожденные гетерозиготные варианты таких нокаутных мышей обладают измененной закругленной формой тела с плечевым горбом, который, вероятно, вызывается избытком бурого жира в верхней части спины. Так как синаптобревин-2 функционирует в эндокринных и жировых клетках, измененная форма тела

может быть связана с нарушением регулируемого экзоцитоза в этих клетках [118].

Поскольку ранее было показано, что альфа-синуклеин способен эффективно связываться с VAMP2 [22], нами были исследованы ко-преципитированные фракции, полученные из синаптических лизатов полосатого тела мозга бессинуклеиновых мышей. Методом иммуноблоттинга нами было проанализировано присутствие VAMP2 в ко-преципитате после связывания с рекомбинантными альфа-, гамма-, ag- и ga-синуклеинами (Рис. 19). Для детекции синаптобrevина-2/VAMP2 использовали мышинные моноклональные антитела, клон 69.1, разведение 1:3000.

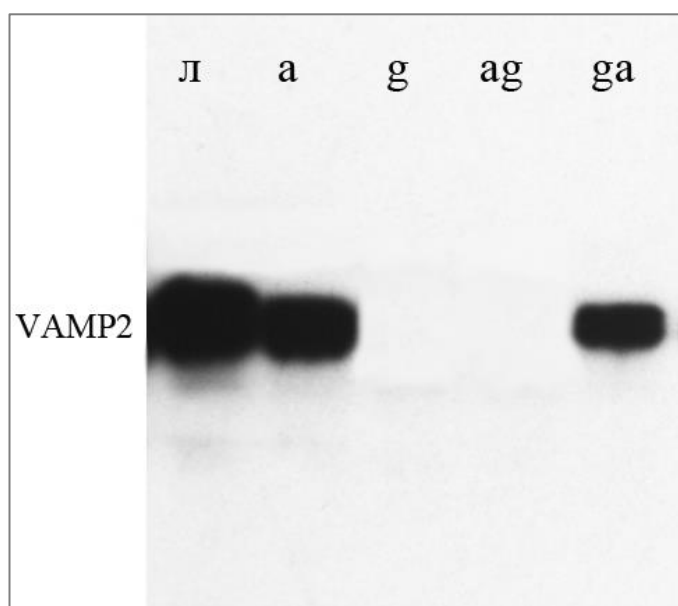


Рисунок 19 – Детекция связывания GST-конъюгированных синуклеинов с эндогенным синаптобrevином-2/VAMP2 *in vitro*. л – синаптосомальный лизат, а – GST-альфа-синуклеин, g – GST-гамма-синуклеин, GST-ag – химерный синуклеин, содержащий С-конец гамма-синуклеина, GST-ga – химерный синуклеин, содержащий С-конец альфа-синуклеина.

Только альфа-синуклеин и химерный синуклеин ga, содержащий C-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (аминокислоты с 95 по 140), эффективно связывались с VAMP2, что подтверждалось выявлением полосы, соответствующей по молекулярному весу VAMP2. Гамма-синуклеин и химерный синуклеин ag, содержащий большую часть молекулы альфа-синуклеина, включая NAC-область (аминокислоты с 1 по 95), были не способны связываться с VAMP2.

3.3.2.2 Связывание синуклеинов с синтаксином-1

Синтаксин-1 – трансмембранный белок, состоящий из 288 аминокислот, экспрессирующийся только в нейронах и нейроэндокринных клетках и составляющий примерно 1% от всех белков мозга. Его структура типична для большинства SNARE-белков и представляет собой SNARE-мотив, окруженный с одной стороны N-концевым регуляторным доменом (H_{abc}) и C-концевым трансмембранным доменом с другой [154].

Нами были исследованы ко-осажденные фракции, полученные из синаптических лизатов полосатого тела мозга бессинуклеиновых мышей. Методом иммуноблоттинга анализировали присутствие синтаксина-1 в ко-преципитатах после связывания с рекомбинантными альфа-, гамма-, ag- и ga-синуклеинами (Рис. 20). Для детекции использовали мышинные моноклональные антитела к синтаксину-1, клон 78.2, разведение 1:2000.

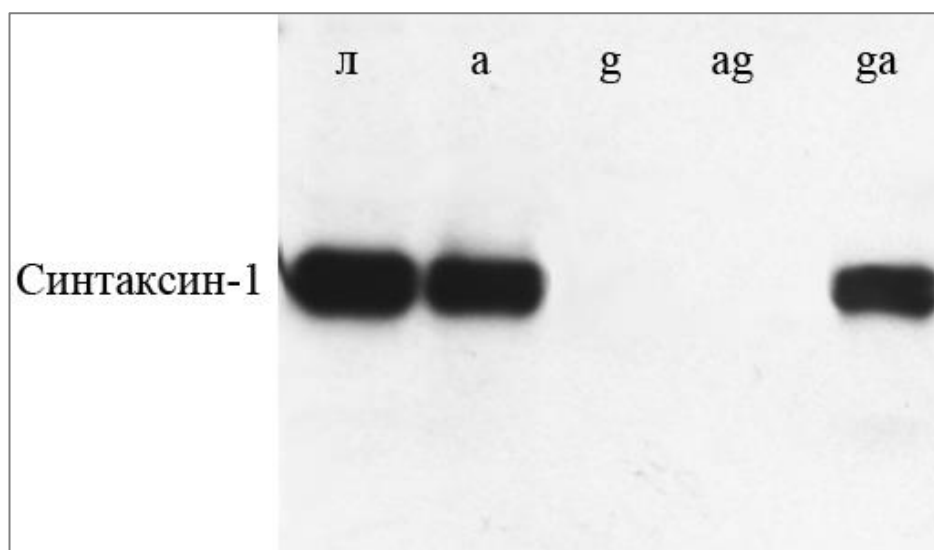


Рисунок 20 – Детекция связывания GST-конъюгированных синуклеинов с эндогенным синтаксином-1 *in vitro*. л – синаптосомальный лизат, а – GST-альфа-синуклеин, g – GST-гамма-синуклеин, GST-ag – химерный синуклеин, содержащий С-конец гамма-синуклеина, GST-ga – химерный синуклеин, содержащий С-конец альфа-синуклеина.

Только альфа-синуклеин и химерный синуклеин ga, содержащий С-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (аминокислоты с 95 по 140), эффективно связывались с синтаксином-1, что подтверждается выявлением полосы, соответствующей по молекулярному весу синтаксину-1. В то время как гамма-синуклеин и химерный синуклеин ag, содержащий большую часть молекулы альфа-синуклеина, включая NAC-область (аминокислоты с 1 по 95), были не способны связываться с синтаксином-1.

3.3.2.3 Связывание синуклеинов с SNAP-25

SNAP-25 – белок, состоящий из 208 аминокислот. Его особенностью является то, что в отличие от типичной структуры, характерной для остальных белков SNARE-комплекса, SNAP-25 имеет два SNARE-мотива,

соединенных между собой гибким линкерным участком, но трансмембранный домен у данного белка отсутствует. Линкер, который соединяет два SNARE-мотива, имеет кластер из четырех пальмитоильных остатков цистеина, с помощью которых белок заякорен на мембране.

SNAP-25 является представителем небольшой подгруппы SNARE-белков с похожей структурой, которая включает в себя белки SNAP-23, SNAP-29 и SNAP-47. В отличие от белка SNAP-25 с нейрональной экспрессией, остальные белки данной подгруппы экспрессируются во всех тканях.

Белок SNAP-25 вместе с синаптобrevином-2 и синтаксином-1 образуют SNARE-комплекс, благодаря чему осуществляется высоко регулируемый процесс слияния синаптических везикул с пресинаптической мембраной, обеспечивая выброс нейромедиатора в синаптическую щель.

Методом иммуноблоттинга анализировали присутствие SNAP-25 в ко-преципитированных фракциях, полученных из синаптических лизатов полосатого тела мозга бессинуклеиновых мышей, после связывания с рекомбинантными альфа-, гамма-, аг- и га-синуклеинами (Рис. 21). Для детекции SNAP-25 использовали мышинные моноклональные антитела, клон 20, BD Transduction Laboratories, разведение 1:1000.

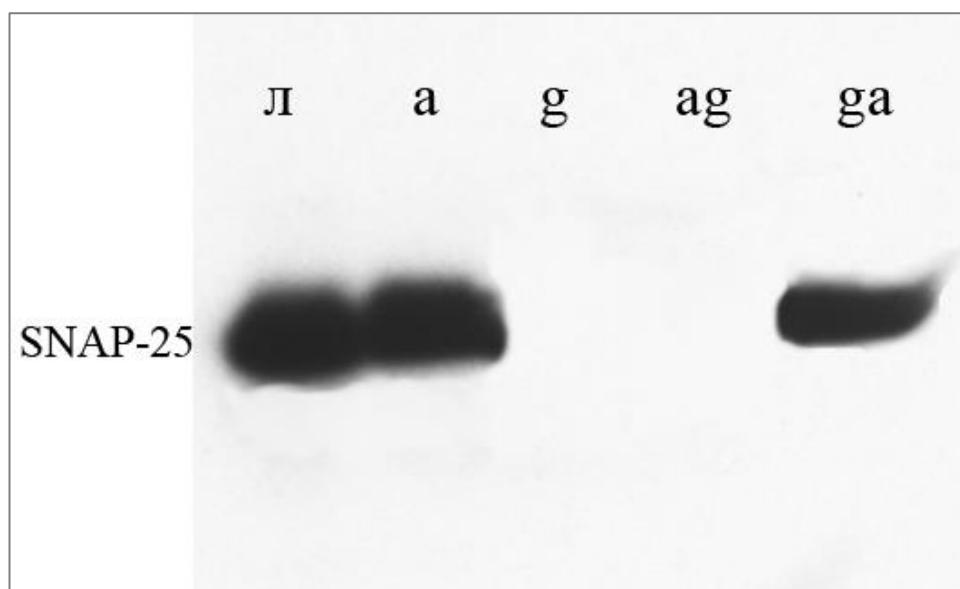


Рисунок 21 – Детекция связывания GST-конъюгированных синуклеинов с эндогенным SNAP-25 *in vitro*. л – синаптосомальный лизат, а – GST-альфа-синуклеин, g – GST-гамма-синуклеин, GST-ag – химерный синуклеин, содержащий С-конец гамма-синуклеина, GST-ga – химерный синуклеин, содержащий С-конец альфа-синуклеина.

Только альфа-синуклеин и химерный синуклеин ga, содержащий С-концевую часть молекулы альфа-синуклеина (аминокислоты с 95 по 140), эффективно связывались с SNAP-25, о чем свидетельствует детектирование полосы, соответствующей по молекулярному весу SNAP-25, в то время как гамма-синуклеин и химерный синуклеин ag, содержащий большую часть молекулы альфа-синуклеина, включая NAC-область (аминокислоты с 1 по 95), были неспособны связываться со SNAP-25.

Эти результаты указывают на отличную от альфа-синуклеина функцию гамма-синуклеина в синапсах, при том, что гамма-синуклеин способен взаимодействовать с синаптическими везикулами, как мы показали ранее.

3.3.2.4 Роль С-концевого домена альфа-синуклеина в связывании с белками SNARE-комплекса

Анализ белковых фракций, полученных методом ко-преципитации, показал, что, как и ожидалось [22], альфа-синуклеин связывался с белками SNARE-комплексов: синаптобревином-2/VAMP2, SNAP-25 и синтаксином-1. Однако гамма-синуклеин ни с одним из этих белков не связывался (Рис. 22), как не связывался и химерный ag-синуклеин, содержащий большую часть N-концевых последовательностей альфа-синуклеина и С-концевую часть гамма-синуклеина. Замена же С-концевой части белка гамма-синуклеина на аналогичную область альфа-синуклеина обеспечивала эффективное связывание химерного ga-синуклеина с белками SNARE-комплексов.

Таким образом, мы показали, что белок гамма-синуклеин не связывается с белками SNARE-комплекса, а связывание альфа-синуклеина с белками SNARE-комплекса происходит за счет его С-концевого домена.

	VAMP2	SNAP-25	Syntaxin	Синаптические везикулы
	+	+	+	+
	-	-	-	+
	+	+	+	+
	-	-	-	+

Рисунок 22 – Результаты связывания рекомбинантных синуклеинов с белками SNARE-комплексов и синаптическими везикулами.

3.4 Исследование эффекта повышенной продукции гамма-синуклеина на дегенерацию синапсов, вызванную нарушением функции CSP-а

В линии мышей, у которых генетически инактивирован пресинаптический белок CSP-а, развивается агрессивная форма нейродегенеративного процесса с неизбежным летальным исходом. CSP-а-нокаутные животные имеют выраженную неврологическую симптоматику и погибают в раннем постнатальном периоде [44].

CSP-а является шапероном и связывается со SNARE-комплексом. Нарушение его функции ассоциировано с нарушением эффективного формирования SNARE-комплексов и приводит к существенному снижению содержания белка SNAP-25 [28; 113; 123]. Ранее было показано, что именно снижение уровня SNAP-25 является основной причиной синаптической дисфункции с последующей гибелью синапсов и развитием прогрессивного нейродегенеративного процесса в данной модели [122].

Хотя CSP-а принимает активное участие в целом ряде процессов, связанных с функционированием синаптических везикул и оборотом нейромедиатора [113; 153], все же было выдвинуто предположение, что именно способность ко-шаперона CSP-а поддерживать правильную конформацию белка SNAP-25 в процессах синаптической активности обеспечивает протекторный эффект и предотвращает дегенерацию синапсов. В работах Tobaben с соавторами [140] было показано, что формирование активного шаперонного комплекса с белком теплового шока Hsp70, обладающим шаперонной активностью, и белком SGT (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein) задерживает деградацию SNAP-25 и стимулирует сборку SNARE-комплексов, предотвращая накопление токсичных, имеющих развернутую конформацию SNARE-белков [122-123].

Таким образом, стабилизация SNARE-комплексов и ингибирование процессов деградации белка SNAP-25 являются принципиально важными

механизмами защиты синапсов от дегенерации, а поиск факторов, способных стимулировать эти защитные механизмы, рассматривается как перспективное направление разработки патогенетической терапии нейродегенераций. Поэтому исключительно важными представляются данные исследований, проведенных в лаборатории Т. Sudhof [28], в которых было обнаружено, что повышенная экспрессия альфа-синуклеина предотвращает развитие нейродегенеративного процесса, вызванного нарушением функции белка CSP-а в модельных мышах. Более того, при выключении гена альфа-синуклеина в генетических нокаутах, отсутствие в нервной системе белка CSP-а приводит к еще более стремительному развитию нейродегенеративного процесса у таких двойных нокаутных животных [28].

Также было показано, что экспрессия мутантной формы альфа-синуклеина, ассоциированной с наследственными формами БП, при которых имеет место замена аланина в 30 положении белковой молекулы на фенилаланин (A30P), не способна предотвращать развитие нейродегенеративного процесса в CSP-а нокаутных мышах, поскольку такая мутантная форма белка альфа-синуклеина не способна эффективно связываться с биологическими мембранами. Таким образом, было установлено, что в нейрональных синапсах альфа-синуклеин и CSP-а вовлечены в общий каскадный механизм, при этом маловероятной считается их способность напрямую заменять функции друг друга. Эта гипотеза подтверждается данными Burre с соавторами [22], которые показали, что в мозге модельных животных с инактивацией функции всех трех (альфа-, бета- и гамма-) синуклеинов обнаруживается повышенный уровень белка CSP-а.

Как уже было отмечено ранее, альфа- и гамма-синуклеины имеют исключительно высокую степень гомологии [82], а в работах целого ряда авторов [11; 22; 28; 59; 112; 121] было независимо показано, что у модельных животных с нарушенной функцией всех трех синуклеинов с

возрастом развивается синаптическая дисфункция, которая не была отмечена ни у альфа-синуклеиновых нокаутов, ни у бета-синуклеиновых нокаутов, ни у гамма-синуклеиновых нокаутов, ни у двойных по каждому из этих генов нокаутных животных, что указывало на принципиальную возможность замещения функции одного синуклеина другим.

С другой стороны, альфа- и бета-синуклеины имеют отличную от гамма-синуклеина анатомическую картину экспрессии. Они обнаруживаются в других популяциях центральных и периферических нейронов, нежели гамма-синуклеин, и присутствуют не только в синапсах, но также в аксонах и околоядерной области цитоплазмы [19; 97; 129; 133].

Более того, обнаруженная нами неспособность гамма-синуклеина связываться с белками SNARE-комплексов позволяет предположить, что и в механизме стабилизации SNARE-комплексов, и в поддержании физиологического уровня белка SNAP-25 роль этого синуклеина может оказаться отличной от таковой, описанной в работах T. Sudhoff для альфа-синуклеина [22].

3.4.1 Получение повышенной экспрессии гамма-синуклеина в нервной системе CSP-а нокаутных мышей

CSP-а нокаутные мыши были скрещены с трансгенными мышами по гену гамма-синуклеина, чтобы создать линию мышей, у которых в геноме отсутствовал бы ген, кодирующий белок, CSP-а и в тоже время имел бы место на высокий уровень экспрессии гена, кодирующего белок гамма-синуклеин, в нейронах.

Первоначально линия нокаутных мышей по гену CSP-а мышей, полученная из лаборатории T. Sudhof [44], была переведена на новый генетический фон C57Bl/6J. Схема скрещиваний представлена на рисунке 23.

P: CSP $\alpha^{-/-}$ × C57Bl/6J

F1: 100% CSP $\alpha^{+/-}$

P2: CSP $\alpha^{+/-}$ × C57Bl/6J

F2: ½ WT; ½ CSP $\alpha^{+/-}$

...

F6: CSP $\alpha^{+/-}$ на чистом генетическом фоне C57Bl/6J

P7: CSP $\alpha^{+/-}$ × CSP $\alpha^{+/-}$

F7: CSP $\alpha^{-/-}$; CSP $\alpha^{+/-}$; CSP $\alpha^{+/+}$

Рисунок 23 – Схема получения CSP-а нокаутных мышей на новом генетическом фоне C57Bl/6J.

Далее во всех экспериментах использовали только CSP-а нокаутных животных на генетическом фоне C57Bl/6J.

Для получения линии мышей с повышенной экспрессией гамма-синуклеина в нервной системе CSP-а нокаутных мышей была проведена серия скрещиваний CSP-а нокаутных мышей с линией трансгенных по гамма-синуклеину мышей Thy1m $\gamma^{tg/tg}$ [98].

Схема скрещиваний представлена на рисунке 24. Всех, полученных в первом поколении самок (n=40) от скрещивания CSP-а нокаутных мышей с мышами, трансгенными по гамму-синуклеину, скрещивали с самцами первого поколения. Результатом такого скрещивания явилось формирование девяти возможных генотипов, которые были определены анализом ДНК из биопсий уха всех потомков с помощью конвенционной ПЦР для гена CSP-а и ПЦР в реальном времени для трансгенной кассеты гамма-синуклеина. В результате генотипирования животных (n=279),

полученных во втором поколении, были идентифицированы потомки со следующими генотипами:

CSP-a^{+/+} / Thy1mγ^{WT/WT} – 19 особей; CSP-a^{+/+} / Thy1mγ^{tg/WT} – 35 особей; CSP-a^{+/-} / Thy1mγ^{WT/WT} – 41 особь; CSP-a^{+/-} / Thy1mγ^{tg/WT} – 69 особей; CSP-a^{+/+} / Thy1mγ^{tg/tg} – 33 особи; CSP-a^{+/-} / Thy1mγ^{tg/tg} – 14 особей; CSP-a^{-/-} / Thy1mγ^{WT/WT} – 23 особи; CSP-a^{-/-} / Thy1mγ^{tg/WT} – 29 особей;

CSP-a^{-/-} / Thy1mγ^{tg/tg} – 16 особей (Рис. 24).

При менделевском типе наследования вероятность появления особей, имеющих CSP-a^{-/-} / Thy1mγ^{tg/tg} генотип составляет 1/16. В результате проведенных скрещиваний нами было получено 16 особей с генотипом CSP-a^{-/-} / Thy1mγ^{tg/tg}, что составило 5,7% от общего числа (n=279) прогенотипированных выживших до половозрелого возраста потомков и соответствовало ожидаемому количеству при менделевском типе наследования.

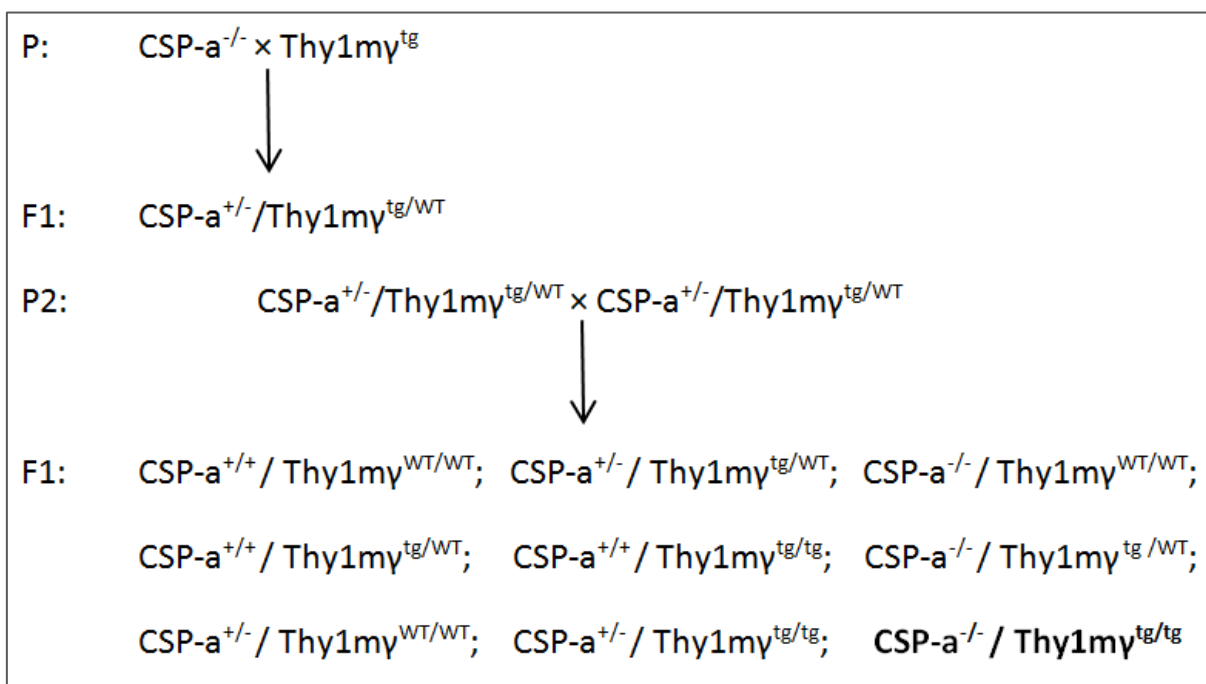


Рисунок 24 – Схема получения линии мышей с повышенной экспрессией экспрессией гамма-синуклеина и генетическим нокаутом CSP-a.

3.4.2 Повышенная экспрессия экзогенного гамма-синуклеина в нервной системе CSP-а нокаутных мышей не влияет на прогрессию нейродегенеративного процесса

Нокаутные по гену CSP-а мыши прекращали расти и набирать вес между 10 и 20 днями постнатального периода, в отличие от контрольных мышей дикого типа. С этого момента общее состояние нокаутных животных постепенно ухудшалось и, начиная с трехнедельного возраста, регистрировалась их гибель. Около половины всех нокаутных CSP-а мышей не выживали до 35-го постнатального дня, а к 52-му дню погибали практически все животные. Очень похожий фенотип был описан и для других сублиний CSP-а нокаутных мышей (2, 3), хотя использованный нами нокаут характеризовался несколько более агрессивным фенотипом (3, 6). Объяснением различной выраженности проявления фенотипа может быть использование в нашем случае генетического фона C57Bl/6J, на котором для многих из описанных в настоящее время генетических нокаутов отмечен более выраженный фенотип, чем на гибридных фонах первого поколения (F1).

Чтобы определить, будет ли сверхэкспрессия гамма-синуклеина в нокаутных мышцах по CSP-а избавлять от ранней смертности этих мышей, нами были созданы когорты животных дикого типа (WT) и нокаутных по гену CSP-а мышей, экспрессирующих высокий уровень гамма-синуклеина в нейронах, благодаря наличию трансгенного аллеля Thy1m γ SN в их геноме в гомозиготном состоянии. То есть были сформированы экспериментальные группы животных с генотипами: CSP-a^{-/-}/ Thy1m γ ^{tg} и CSP-a^{+/+}/ Thy1m γ ^{tg}.

Далее нами были исследовали фенотипы полученных линий мышей, проведена тщательная регистрация веса, прежде всего в раннем постнатальном периоде, и продолжительность жизни животных. Мыши с генотипом CSP-a^{+/+}/ Thy1m γ ^{tg} набирали вес и развивались нормально и не отличались от контрольных животных C57Bl/6J дикого типа в течение

первых двух месяцев постнатального развития. Потери этих животных в этом периоде были наравне с таковыми в контрольных группах животных дикого типа линии C57Bl/6J, которых содержали в абсолютно идентичных условиях. Мыши линии CSP-a^{-/-}/ Thy1mγ^{tg}, напротив, прекращали набирать вес, начиная с 10 дня постнатального периода так же, как мыши линии CSP-a^{-/-}, не несущие гамма-синуклеин трансгенную кассету. На этой стадии мыши обеих групп становились постепенно апатичными, хотя способны были реагировать в ответ на внешний раздражитель. Статистически значимых отличий в возрасте регистрации преждевременной смерти и выживания между животными групп CSP-a^{-/-}/ Thy1mγ^{tg} и CSP-a^{-/-} выявлено не было. Также как и в группе CSP-a^{-/-}, 50% мышей линии CSP-a^{-/-}/ Thy1mγ^{tg} погибали к 34 постнатальному дню, а к 50 дню погибало абсолютное большинство животных и лишь менее 10% доживали до 80 дня. Причем это было показано, как для самцов, так и самок. Таким образом, показатели динамики постнатального развития мышей CSP-a^{-/-}/ Thy1mγ^{tg}, которое было охарактеризовано регулярной регистрацией массы тела животных, не отличались от показателей для линии нокаутных по CSP-a мышей с нормальной экспрессией гамма-синуклеина (Рис. 25, 26).

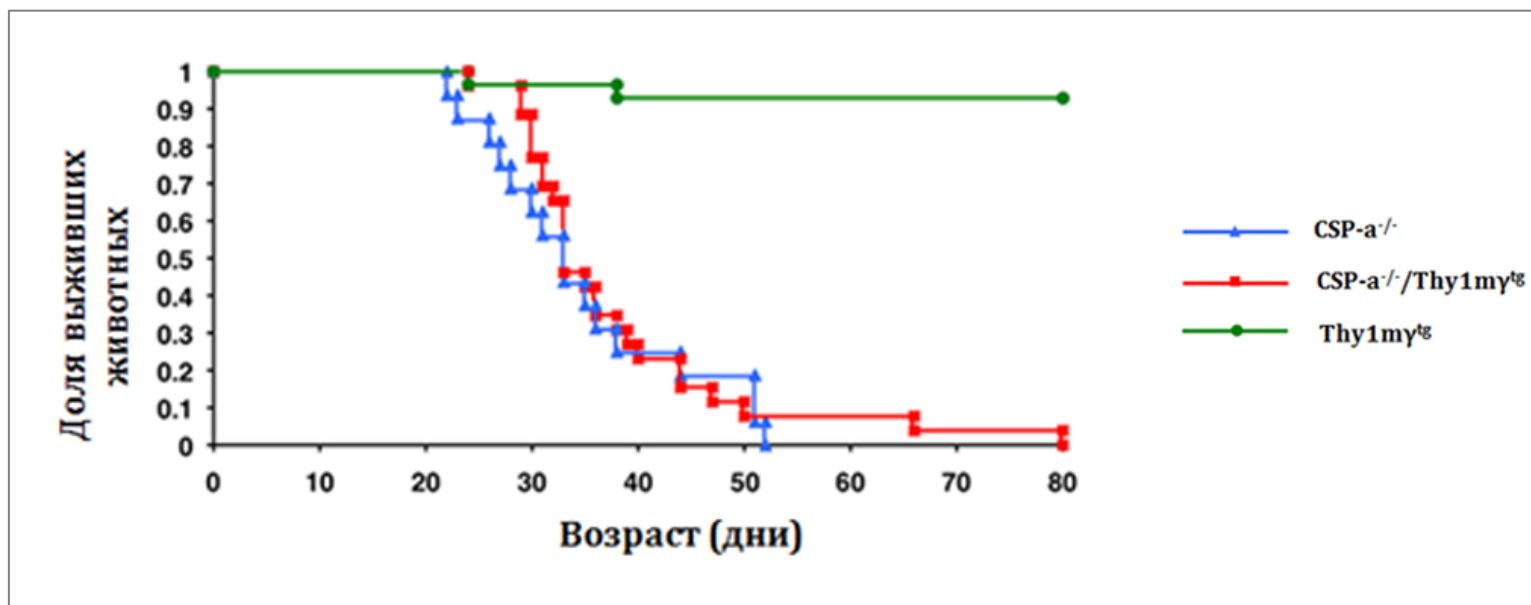


Рисунок 25 – Оценка функции выживания с помощью процедуры Каплана-Майера.

Кривая выживаемости мышей разных генотипов CSP-a^{-/-}, CSP-a^{-/-}/Thy1my^{tg} и Thy1my^{tg}.

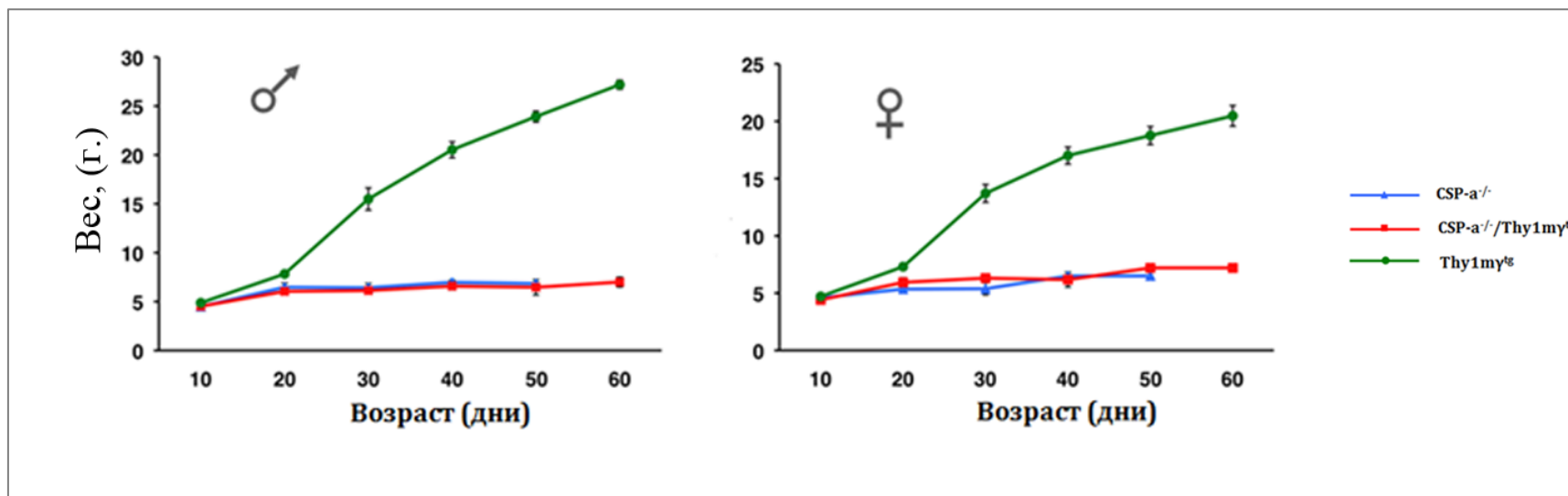


Рисунок 26 – Сравнительный анализ прироста массы тела мышей трех линий ($Thy1my^{tg}$, $CSPa^{-/-}$, $CSP-a^{-/-}/Thy1my^{tg}$).

3.4.3 Анализ уровня гамма-синуклеина в синаптических везикулах CSP- $\alpha^{-/-}$ /Thy1 μ ^{tg} мышей

Ранее было установлено, что увеличение внутриклеточной концентрации альфа-синуклеина, причем не только в синапсах, но и в цитоплазме нейронов, путем его эктопической экспрессии позволяет остановить нейродегенеративный процесс, вызванный недостаточностью функции белка CSP- α , участвующего в образовании SNARE-комплекса при нейротрансмиссии [28].

Для того чтобы оценить, влияет ли сверхэкспрессия гамма-синуклеина на синаптическую дисфункцию, причиной которой является отсутствие в геноме шаперонного белка CSP- α , исключительно важным представлялся вопрос, достаточно ли высокая концентрация эктопического гамма-синуклеина была в синапсах полученных нами мышей. То, что уровень эктопического гамма-синуклеина высок в телах и в отростках нейронов, ранее было показано в ряде работ, посвященных анализу этой линии мышей [98]. Однако, то, что уровень содержания эктопического гамма-синуклеина в синапсах (то, что он транспортируется в достаточно высоком количестве в синаптические окончания) показано не было.

Для того чтобы доказать, что гамма-синуклеин присутствует в синапсах в повышенном количестве у трансгенных мышей, мы выделяли везикулярную фракцию из полосатого тела мозга девятимесячных мышей дикого типа и трансгенных по гену гамма-синуклеина, как это описано в главе «материалы и методы», и с помощью иммуноблотинга показали, что гамма-синуклеин действительно присутствует в синапсах в больших количествах. В контрольных препаратах, полученных из материала мышей дикого типа, его количество было существенно ниже, оно соответствовало уровню эндогенного гамма-синуклеина (Рис. 27).

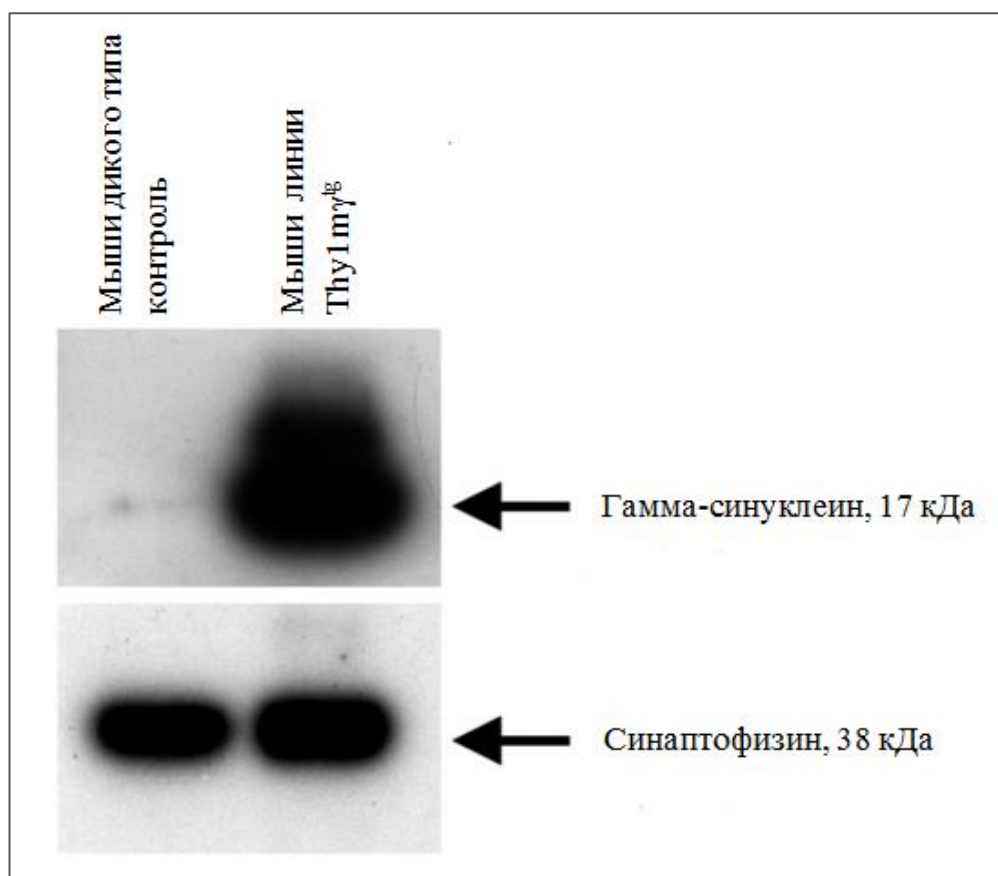


Рисунок 27 – Детекция гамма-синуклеина во фракции очищенных везикул из синаптосомальной фракции Thy1m γ^{tg} мышей.

В данном эксперименте в качестве контроля был выбран синаптофизин – синаптический белок, который использовали для нормализации значений тотального синаптического белка в исследуемых образцах.

Таким образом, можно сделать вывод, что высокие количества гамма-синуклеина в синапсах не обеспечивают реверсию фенотипа CSP-а нокаутных мышей, и в этом его отличие от альфа-синуклеина. Несмотря на структурные сходства между альфа- и гамма-синуклеином, их функции в пресинаптических окончаниях разделены и не дублируются.

3.5 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 пре-нейрональных клеток в нейроны, поскольку в делящихся и недифференцированных клетках SH-SY5Y с помощью различных факторов может быть индуцирована дифференцировка по нейрональному типу [68]. При этом в дифференцирующихся культурах меняется морфология клеток, отмечается рост отростков, которые устанавливают межклеточные контакты с образованием синапс-подобных структур, а на поздних стадиях дифференцировки клетки выходят из митотического цикла и перестают делиться. В терминально дифференцированных культурах нейробластомы SH-SY5Y синтезируются белковые маркеры нейрональных клеток, начинается продукция ДА и даже детектируется передача сигнала. То есть, они обладают многими свойствами дофаминергических нейронов [68; 100; 102].

Для индукции дифференцировки нами была использована ретиноевая кислота, которую добавляли к культуральным средам до конечной концентрации 10 мкМ. Через 10 дней культивирования в присутствии дифференцирующего агента наблюдали рост отростков, которые разветвлялись и формировали контакты, а клетки приобретали морфологию зрелых нейронов (Рис. 28).

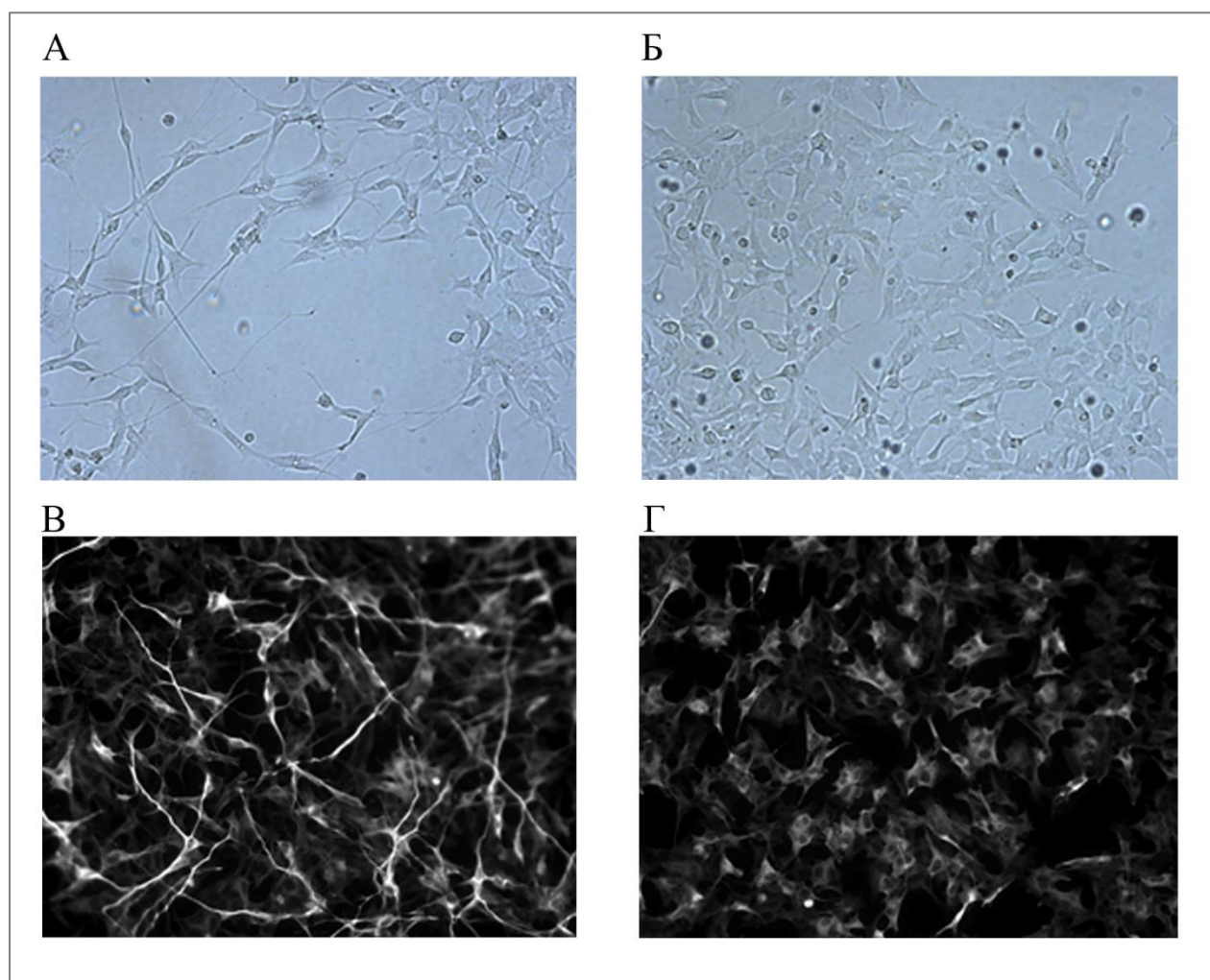


Рисунок 28 – Индукция дифференцировки нейробластомы человека SH-SY5Y ретиноевой кислотой.

Дифференцированные(А,В) и исходные (Б,Г) культуры SH-SY5Y. А,Б- фазовый контраст, В,Г - экспрессия bIII-тубулина, детектируемая в дифференцированных культурах методом иммуногистохимии

В таких терминально дифференцированных культурах нейробластомы человека SH-SY5Y нами было исследовано участие альфа- и гамма-синуклеинов в формировании синапс-подобных структур. Для этого получали клеточные фракции, в составе которых обычно выделяются синаптические везикулы, по тому же протоколу, что и везикулярные фракции из тканей полосатого тела головного мозга мышей (Рис. 8). К очищенным везикулярным фракциям добавляли рекомбинантные белки

альфа- или гамма-синуклеины, инкубировали на холоду, отмывали от несвязавшихся белков и детектировали связавшиеся синуклеины методом иммуноблотинга, как и в случае анализа везикул полосатого тела. В исходных недифференцированных клетках SH-SY5Y маркерный белок синаптических везикул – синаптобrevин-2 (VAMP2), не детектировался. При этом в препаратах, полученных из дифференцированных культур, через 10 дней после индукции дифференцировки ретиновой кислотой, нами был выявлен синаптобrevин-2 (VAMP2), что указывает на присутствие синаптических везикул, которые характерны для нервной ткани.

Более того, эти структуры способны связываться с рекомбинантными альфа- и гамма-синуклеинами, как и везикулы, выделенные нами из тканей полосатого тела головного мозга мышей (Рис. 29).

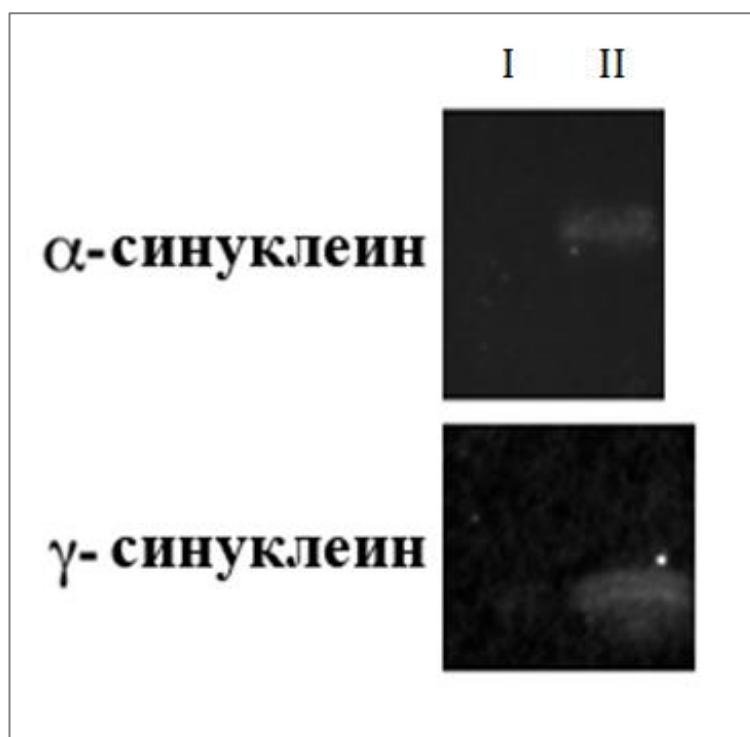


Рисунок 29 – Наличие альфа- и гамма-синуклеинов во фракции синаптических везикул дифференцированных по нейрональному типу клеточных культур.

I – недифференцированная клеточная структура SH-SY5Y

II – дифференцированные ретиноевой кислотой клеточная культура SH-SY5Y

Таким образом, мы заключили, что при дифференцировке клеточных культур по нейрональному типу, при формировании синапс-подобных структур, альфа- и гамма-синуклеины, обнаруживаемые в составе везикулярной фракции дифференцированных клеток, могут выполнять определенную функцию. Является ли эта функция для каждого из синуклеинов такой же, как и в случае исследованных нами функциональных синапсов полосатого тела мозга мышей, еще предстоит установить.

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 компартментализованы в везикулах.

Список литературы

1. Нинкина Н.Н. Молекулярно-клеточные механизмы патогенеза болезни двигательного нейрона: роль гамма-синуклеина. - дис. д-ра мед. наук. Институт физиологически активных веществ РАН, Институт молекулярной биологии РАН им В.А. Энгельгардта. - Москва 2012.
2. Нинкина Н.Н., Бухман В.Л. Синуклеины: иметь или не иметь? // Генетика. – 2000. – V. 36. – № 11. – P. 1487-1491.
3. Нинкина Н.Н., Устюгов А.А., Бухман В.Л. Моделирование синуклеинопатий в генетически модифицированных животных – успехи и неудачи // Молекуляр. биология. – 2008. – № 42. – P. 840–855.
4. Угрюмов М.В., Козина Е.А., Хаиндарова В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Наркевич В.Б., Бочаров Е.В., Крыжановский Г.Н., Раевский К.С. Моделирование паркинсонизма у мышей при помощи МФТП: от ранней досимптомной до поздней симптомной стадии // Технологии живых систем. – 2011. – № 8. – P. 3-13.
5. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков // Молекулярная биология. – 2012. – V. 46. – № 3. – P. 402-415.
6. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // Science. – 1997. – V. 276. – № 5321. – P. 2045-7.

7. Abeliovich A., Schmitz Y., Farinas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system // *Neuron*. – 2000. – V. 25. – № 1. – P. 239-52.
8. Al-Wandi A., Ninkina N., Millership S., Williamson S.J., Jones P.A., Buchman V.L. Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice // *Neurobiol Aging*. – 2010. – V. 31. – № 5. – P. 796-804.
9. Andringa G., Lam K.Y., Chegary M., Wang X., Chase T.N., Bennett M.C. Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease // *FASEB J*. – 2004. – V. 18. – № 7. – P. 932-4.
10. Antonin W., Dulubova I., Arac D., Pabst S., Plitzner J., Rizo J., Jahn R. The N-terminal domains of syntaxin 7 and vti1b form three-helix bundles that differ in their ability to regulate SNARE complex assembly // *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277. – № 39. – P. 36449-56.
11. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family // *J Neurosci*. – 2011. – V. 31. – № 20. – P. 7264-74.
12. Borisovska M., Zhao Y., Tsytsyura Y., Glyvuk N., Takamori S., Matti U., Rettig J., Sudhof T., Bruns D. v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion // *EMBO J*. – 2005. – V. 24. – № 12. – P. 2114-26.
13. Bracher A., Weissenhorn W. Crystal structure of the Habc domain of neuronal syntaxin from the squid *Loligo pealei* reveals conformational plasticity at its C-terminus // *BMC Struct Biol*. – 2004. – V. 4. – P. 6.
14. Brenz Verca M.S., Bahi A., Boyer F., Wagner G.C., Dreyer J.L. Distribution of alpha- and gamma-synucleins in the adult rat brain and

- their modification by high-dose cocaine treatment // *Eur J Neurosci.* – 2003. – V. 18. – № 7. – P. 1923-38.
15. Brown H., Larsson O., Branstrom R., Yang S.N., Leibiger B., Leibiger I., Fried G., Moede T., Deeney J.T., Brown G.R., Jacobsson G., Rhodes C.J., Braun J.E., Scheller R.H., Corkey B.E., Berggren P.O., Meister B. Cysteine string protein (CSP) is an insulin secretory granule-associated protein regulating beta-cell exocytosis // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – № 17. – P. 5048-58.
 16. Brunger A.T. Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins // *Q Rev Biophys.* – 2005. – V. 38. – № 1. – P. 1-47.
 17. Brunger A.T., Jin R., Breidenbach M.A. Highly specific interactions between botulinum neurotoxins and synaptic vesicle proteins // *Cell Mol Life Sci.* – 2008. – V. 65. – № 15. – P. 2296-306.
 18. Buchman V.L., Adu J., Pinon L.G., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity // *Nat Neurosci.* – 1998. – V. 1. – № 2. – P. 101-3.
 19. Buchman V.L., Hunter H.J., Pinon L.G., Thompson J., Privalova E.M., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system // *J Neurosci.* – 1998. – V. 18. – № 22. – P. 9335-41.
 20. Buchman V.L., Ninkina N. Modulation of alpha-synuclein expression in transgenic animals for modelling synucleinopathies--is the juice worth the squeeze? // *Neurotox Res.* – 2008. – V. 14. – № 4. – P. 329-41.
 21. Buchner E., Gundersen C.B. The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release // *Trends Neurosci.* – 1997. – V. 20. – № 5. – P. 223-7.
 22. Burre J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Sudhof T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro // *Science.* – 2010. – V. 329. – № 5999. – P. 1663-7.

23. Cabin D.E., Gispert-Sanchez S., Murphy D., Auburger G., Myers R.R., Nussbaum R.L. Exacerbated synucleinopathy in mice expressing A53T SNCA on a Snca null background // *Neurobiol Aging*. – 2005. – V. 26. – № 1. – P. 25-35.
24. Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., Cole N.B., Gottschalk W., McIlwain K.L., Orrison B., Chen A., Ellis C.E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R.L. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein // *J Neurosci*. – 2002. – V. 22. – № 20. – P. 8797-807.
25. Chamberlain L.H., Burgoyne R.D. Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse // *J Neurochem*. – 2000. – V. 74. – № 5. – P. 1781-9.
26. Chamberlain L.H., Burgoyne R.D. Cysteine string protein functions directly in regulated exocytosis // *Mol Biol Cell*. – 1998. – V. 9. – № 8. – P. 2259-67.
27. Chandra S., Fornai F., Kwon H.B., Yazdani U., Atasoy D., Liu X., Hammer R.E., Battaglia G., German D.C., Castillo P.E., Sudhof T.C. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – V. 101. – № 41. – P. 14966-71.
28. Chandra S., Gallardo G., Fernandez-Chacon R., Schluter O.M., Sudhof T.C. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration // *Cell*. – 2005. – V. 123. – № 3. – P. 383-96.
29. Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease // *Lancet*. – 2004. – V. 364. – № 9440. – P. 1167-9.
30. Chen S., Zheng X., Schulze K.L., Morris T., Bellen H., Stanley E.F. Enhancement of presynaptic calcium current by cysteine string protein // *J Physiol*. – 2002. – V. 538. – № Pt 2. – P. 383-9.

31. Chen X., Tomchick D.R., Kovrigin E., Arac D., Machius M., Sudhof T.C., Rizo J. Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex // *Neuron*. – 2002. – V. 33. – № 3. – P. 397-409.
32. Chiba-Falek O., Nussbaum R.L. Regulation of alpha-synuclein expression: implications for Parkinson's disease // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. – 2003. – V. 68. – P. 409-15.
33. Dalfo E., Ferrer I. Alpha-synuclein binding to rab3a in multiple system atrophy // *Neurosci Lett*. – 2005. – V. 380. – № 1-2. – P. 170-5.
34. Dauer W., Kholodilov N., Vila M., Trillat A.C., Goodchild R., Larsen K.E., Staal R., Tieu K., Schmitz Y., Yuan C.A., Rocha M., Jackson-Lewis V., Hersch S., Sulzer D., Przedborski S., Burke R., Hen R. Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. – V. 99. – № 22. – P. 14524-9.
35. Dev K.K., Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., van der Putten H. Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease // *Neuropharmacology*. – 2003. – V. 45. – № 1. – P. 14-44.
36. Dev K.K., van der Putten H., Sommer B., Rovelli G. Part I: parkin-associated proteins and Parkinson's disease // *Neuropharmacology*. – 2003. – V. 45. – № 1. – P. 1-13.
37. Drolet R.E., Behrouz B., Lookingland K.J., Goudreau J.L. Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration // *Neurotoxicology*. – 2004. – V. 25. – № 5. – P. 761-9.
38. Dufty B.M., Warner L.R., Hou S.T., Jiang S.X., Gomez-Isla T., Leenhouts K.M., Oxford J.T., Feany M.B., Masliah E., Rohn T.T. Calpain-cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation // *Am J Pathol*. – 2007. – V. 170. – № 5. – P. 1725-38.

39. Dulubova I., Khvotchev M., Liu S., Huryeva I., Sudhof T.C., Rizo J. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104. – № 8. – P. 2697-702.
40. El-Agnaf O.M., Jakes R., Curran M.D., Wallace A. Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of alpha-synuclein protein implicated in Parkinson's disease // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 440. – № 1-2. – P. 67-70.
41. Eliezer D., Kutluay E., Bussell R., Jr., Browne G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states // *J Mol Biol.* – 2001. – V. 307. – № 4. – P. 1061-73.
42. Farrer M., Kachergus J., Forno L., Lincoln S., Wang D.S., Hulihan M., Maraganore D., Gwinn-Hardy K., Wszolek Z., Dickson D., Langston J.W. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications // *Ann Neurol.* – 2004. – V. 55. – № 2. – P. 174-9.
43. Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger A.T., Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V. 95. – № 26. – P. 15781-6.
44. Fernandez-Chacon R., Wolfel M., Nishimune H., Tabares L., Schmitz F., Castellano-Munoz M., Rosenmund C., Montesinos M.L., Sanes J.R., Schneggenburger R., Sudhof T.C. The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration // *Neuron.* – 2004. – V. 42. – № 2. – P. 237-51.
45. Fernandez I., Ubach J., Dulubova I., Zhang X., Sudhof T.C., Rizo J. Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A // *Cell.* – 1998. – V. 94. – № 6. – P. 841-9.
46. Fornai F., Schluter O.M., Lenzi P., Gesi M., Ruffoli R., Ferrucci M., Lazzeri G., Busceti C.L., Pontarelli F., Battaglia G., Pellegrini A., Nicoletti F., Ruggieri S., Paparelli A., Sudhof T.C. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the

- ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – V. 102. – № 9. – P. 3413-8.
47. Gallardo G., Schluter O.M., Sudhof T.C. A molecular pathway of neurodegeneration linking alpha-synuclein to ApoE and Abeta peptides // Nat Neurosci. – 2008. – V. 11. – № 3. – P. 301-8.
 48. Galvin J.E., Giasson B., Hurtig H.I., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology // Am J Pathol. – 2000. – V. 157. – № 2. – P. 361-8.
 49. Galvin J.E., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Synucleinopathies: clinical and pathological implications // Arch Neurol. – 2001. – V. 58. – № 2. – P. 186-90.
 50. Galvin J.E., Uryu K., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – V. 96. – № 23. – P. 13450-5.
 51. Gasser T. Update on the genetics of Parkinson's disease // Mov Disord. – 2007. – V. 22 Suppl 17. – P. S343-50.
 52. George J.M. The synucleins // Genome Biol. – 2002. – V. 3. – № 1. – P. REVIEWS3002.
 53. Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly // J Biol Chem. – 2001. – V. 276. – № 4. – P. 2380-6.
 54. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases // Nat Rev Neurosci. – 2001. – V. 2. – № 7. – P. 492-501.
 55. Goedert M., Spillantini M.G. Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies // Mol Psychiatry. – 1998. – V. 3. – № 6. – P. 462-5.

56. Gorbatyuk O.S., Li S., Nash K., Gorbatyuk M., Lewin A.S., Sullivan L.F., Mandel R.J., Chen W., Meyers C., Manfredsson F.P., Muzyczka N. In vivo RNAi-mediated alpha-synuclein silencing induces nigrostriatal degeneration // *Mol Ther.* – 2010. – V. 18. – № 8. – P. 1450-7.
57. Graham M.E., Burgoyne R.D. Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant alpha-SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells // *J Neurosci.* – 2000. – V. 20. – № 4. – P. 1281-9.
58. Gray B.C., Siskova Z., Perry V.H., O'Connor V. Selective presynaptic degeneration in the synaptopathy associated with ME7-induced hippocampal pathology // *Neurobiol Dis.* – 2009. – V. 35. – № 1. – P. 63-74.
59. Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Makani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S. alphasynuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 45. – P. 19573-8.
60. Gundersen C.B., Umbach J.A. Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel // *Neuron.* – 1992. – V. 9. – № 3. – P. 527-37.
61. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // *Science.* – 2002. – V. 295. – № 5561. – P. 1852-8.
62. Hashimoto M., Hsu L.J., Xia Y., Takeda A., Sisk A., Sundsmo M., Masliah E. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro // *Neuroreport.* – 1999. – V. 10. – № 4. – P. 717-21.
63. Hashimoto M., Takenouchi T., Mallory M., Masliah E., Takeda A. The role of NAC in amyloidogenesis in Alzheimer's disease // *Am J Pathol.* – 2000. – V. 156. – № 2. – P. 734-6.

64. Ibanez P., Bonnet A.M., Debarges B., Lohmann E., Tison F., Pollak P., Agid Y., Durr A., Brice A. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease // *Lancet*. – 2004. – V. 364. – № 9440. – P. 1169-71.
65. Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H.A., Kittel A., Saitoh T. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system // *Neuron*. – 1995. – V. 14. – № 2. – P. 467-75.
66. Jahn R., Scheller R.H. SNAREs--engines for membrane fusion // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2006. – V. 7. – № 9. – P. 631-43.
67. Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain // *FEBS Lett*. – 1994. – V. 345. – № 1. – P. 27-32.
68. Jamsa A., Hasslund K., Cowburn R.F., Backstrom A., Vasange M. The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2004. – V. 319. – № 3. – P. 993-1000.
69. Kahle P.J., Neumann M., Ozmen L., Muller V., Jacobsen H., Schindzielorz A., Okochi M., Leimer U., van Der Putten H., Probst A., Kremmer E., Kretschmar H.A., Haass C. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain // *J Neurosci*. – 2000. – V. 20. – № 17. – P. 6365-73.
70. Karube H., Sakamoto M., Arawaka S., Hara S., Sato H., Ren C.H., Goto S., Koyama S., Wada M., Kawanami T., Kurita K., Kato T. N-terminal region of alpha-synuclein is essential for the fatty acid-induced oligomerization of the molecules // *FEBS Lett*. – 2008. – V. 582. – № 25-26. – P. 3693-700.

71. Kay D.M., Factor S.A., Samii A., Higgins D.S., Griffith A., Roberts J.W., Leis B.C., Nutt J.G., Montimurro J.S., Keefe R.G., Atkins A.J., Yearout D., Zabetian C.P., Payami H. Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* – 2008. – V. 147B. – № 7. – P. 1222-30.
72. Kelley W.L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power // *Trends Biochem Sci.* – 1998. – V. 23. – № 6. – P. 222-7.
73. Klein C., Lohmann-Hedrich K. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease // *Curr Opin Neurol.* – 2007. – V. 20. – № 4. – P. 453-64.
74. Klivenyi P., Siwek D., Gardian G., Yang L., Starkov A., Cleren C., Ferrante R.J., Kowall N.W., Abeliovich A., Beal M.F. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins // *Neurobiol Dis.* – 2006. – V. 21. – № 3. – P. 541-8.
75. Kokhan V.S., Bolkunov A.V., Ustiugov A.A., Van'kin G.I., Shelkovnikova T.A., Redkozubova O.M., Strekalova T.V., Bukhman V.L., Ninkina N.N., Bachurin S.O. [Targeted inactivation of gamma-synuclein gene affects anxiety and exploratory behaviour of mice] // *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova.* – 2011. – V. 61. – № 1. – P. 85-93.
76. Kokhan V.S., Van'kin G.I., Bachurin S.O., Shamakina I.Y. Differential involvement of the gamma-synuclein in cognitive abilities on the model of knockout mice // *BMC Neurosci.* – 2013. – V. 14. – P. 53.
77. Kramer M.L., Schulz-Schaeffer W.J. Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies // *J Neurosci.* – 2007. – V. 27. – № 6. – P. 1405-10.
78. Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schols L., Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // *Nat Genet.* – 1998. – V. 18. – № 2. – P. 106-8.

79. Lang T., Jahn R. Core proteins of the secretory machinery // *Handb Exp Pharmacol.* – 2008. 10.1007/978-3-540-74805-2_5. – № 184. – P. 107-27.
80. Larsen K.E., Schmitz Y., Troyer M.D., Mosharov E., Dietrich P., Quazi A.Z., Savalle M., Nemani V., Chaudhry F.A., Edwards R.H., Stefanis L., Sulzer D. Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis // *J Neurosci.* – 2006. – V. 26. – № 46. – P. 11915-22.
81. Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target // *Nat Rev Neurosci.* – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 38-48.
82. Lavedan C. The synuclein family // *Genome Res.* – 1998. – V. 8. – № 9. – P. 871-80.
83. Lee S.J., Jeon H., Kandrор K.V. Alpha-synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles // *Acta Neurobiol Exp (Wars).* – 2008. – V. 68. – № 4. – P. 509-15.
84. Li W., West N., Colla E., Pletnikova O., Troncoso J.C., Marsh L., Dawson T.M., Jakala P., Hartmann T., Price D.L., Lee M.K. Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – V. 102. – № 6. – P. 2162-7.
85. Liu S., Ninan I., Antonova I., Battaglia F., Trinchese F., Narasanna A., Kolodilov N., Dauer W., Hawkins R.D., Arancio O. alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – № 22. – P. 4506-16.
86. Luk K.C., Song C., O'Brien P., Stieber A., Branch J.R., Brunden K.R., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – V. 106. – № 47. – P. 20051-6.

87. Lundblad M., Decressac M., Mattsson B., Bjorklund A. Impaired neurotransmission caused by overexpression of alpha-synuclein in nigral dopamine neurons // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V. 109. – № 9. – P. 3213-9.
88. Magga J.M., Jarvis S.E., Arnot M.I., Zamponi G.W., Braun J.E. Cysteine string protein regulates G protein modulation of N-type calcium channels // *Neuron.* – 2000. – V. 28. – № 1. – P. 195-204.
89. Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal // *J Neurosci.* – 1988. – V. 8. – № 8. – P. 2804-15.
90. Marti M.J., Tolosa E., Campdelacreu J. Clinical overview of the synucleinopathies // *Mov Disord.* – 2003. – V. 18 Suppl 6. – P. S21-7.
91. Masliah E., Iwai A., Mallory M., Ueda K., Saitoh T. Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease // *Am J Pathol.* – 1996. – V. 148. – № 1. – P. 201-10.
92. Meijer M., Burkhardt P., de Wit H., Toonen R.F., Fasshauer D., Verhage M. Munc18-1 mutations that strongly impair SNARE-complex binding support normal synaptic transmission // *EMBO J.* – 2012. – V. 31. – № 9. – P. 2156-68.
93. Meyer A.C., Neher E., Schneggenburger R. Estimation of quantal size and number of functional active zones at the calyx of held synapse by nonstationary EPSC variance analysis // *J Neurosci.* – 2001. – V. 21. – № 20. – P. 7889-900.
94. Mizuta I., Tsunoda T., Satake W., Nakabayashi Y., Watanabe M., Takeda A., Hasegawa K., Nakashima K., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Toda T. Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease // *Hum Genet.* – 2008. – V. 124. – № 1. – P. 89-94.

95. Nemani V.M., Lu W., Berge V., Nakamura K., Onoa B., Lee M.K., Chaudhry F.A., Nicoll R.A., Edwards R.H. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis // *Neuron*. – 2010. – V. 65. – № 1. – P. 66-79.
96. Nie Z., Ranjan R., Wenniger J.J., Hong S.N., Bronk P., Zinsmaier K.E. Overexpression of cysteine-string proteins in *Drosophila* reveals interactions with syntaxin // *J Neurosci*. – 1999. – V. 19. – № 23. – P. 10270-9.
97. Ninkina N., Papachroni K., Robertson D.C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F., Court F., Rosenthal A., Fleetwood-Walker S.M., Davies A.M., Buchman V.L. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene // *Mol Cell Biol*. – 2003. – V. 23. – № 22. – P. 8233-45.
98. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. Gamma-synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein // *Hum Mol Genet*. – 2009. – V. 18. – № 10. – P. 1779-94.
99. Noskova L., Stranecky V., Hartmannova H., Pristoupilova A., Baresova V., Ivanek R., Hulkova H., Jahnova H., van der Zee J., Staropoli J.F., Sims K.B., Tyynela J., Van Broeckhoven C., Nijssen P.C., Mole S.E., Elleder M., Kmoch S. Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis // *Am J Hum Genet*. – 2011. – V. 89. – № 2. – P. 241-52.
100. Olivieri G., Otten U., Meier F., Baysang G., Dimitriadis-Schmutz B., Muller-Spahn F., Savaskan E. Beta-amyloid modulates tyrosine kinase B receptor expression in SHSY5Y neuroblastoma cells: influence of the antioxidant melatonin // *Neuroscience*. – 2003. – V. 120. – № 3. – P. 659-65.

101. Oueslati A., Fournier M., Lashuel H.A. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies // *Prog Brain Res.* – 2010. – V. 183. – P. 115-45.
102. Pahlman S., Ruusala A.I., Abrahamsson L., Mattsson M.E., Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation // *Cell Differ.* – 1984. – V. 14. – № 2. – P. 135-44.
103. Paleologou K.E., Oueslati A., Shakked G., Rospigliosi C.C., Kim H.Y., Lamberto G.R., Fernandez C.O., Schmid A., Chegini F., Gai W.P., Chiappe D., Moniatte M., Schneider B.L., Aebischer P., Eliezer D., Zweckstetter M., Masliah E., Lashuel H.A. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions // *J Neurosci.* – 2010. – V. 30. – № 9. – P. 3184-98.
104. Pankratz N., Wilk J.B., Latourelle J.C., DeStefano A.L., Halter C., Pugh E.W., Doheny K.F., Gusella J.F., Nichols W.C., Foroud T., Myers R.H., Psg P., GenePd Investigators C., Molecular Genetic L. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease // *Hum Genet.* – 2009. – V. 124. – № 6. – P. 593-605.
105. Panneerselvam M., Muthu K., Jayaraman M., Sridharan U., Jenardhanan P., Ramadas K. Molecular dynamic simulations of the tubulin-human gamma synuclein complex: structural insight into the regulatory mechanism involved in inducing resistance against Taxol // *Mol Biosyst.* – 2013. – V. 9. – № 6. – P. 1470-88.
106. Papachroni K.K., Ninkina N., Papapanagiotou A., Hadjigeorgiou G.M., Xiromerisiou G., Papadimitriou A., Kalofoutis A., Buchman V.L. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease // *J Neurochem.* – 2007. – V. 101. – № 3. – P. 749-56.

107. Payton J.E., Perrin R.J., Woods W.S., George J.M. Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein // *J Mol Biol.* – 2004. – V. 337. – № 4. – P. 1001-9.
108. Pellizzari R., Rossetto O., Schiavo G., Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 1999. – V. 354. – № 1381. – P. 259-68.
109. Perrin R.J., Woods W.S., Clayton D.F., George J.M. Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276. – № 45. – P. 41958-62.
110. Pobbati A.V., Stein A., Fasshauer D. N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion // *Science.* – 2006. – V. 313. – № 5787. – P. 673-6.
111. Rickman C., Medine C.N., Bergmann A., Duncan R.R. Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282. – № 16. – P. 12097-103.
112. Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice // *J Neurochem.* – 2004. – V. 89. – № 5. – P. 1126-36.
113. Rozas J.L., Gomez-Sanchez L., Mircheski J., Linares-Clemente P., Nieto-Gonzalez J.L., Vazquez M.E., Lujan R., Fernandez-Chacon R. Motoneurons require cysteine string protein-alpha to maintain the readily releasable vesicular pool and synaptic vesicle recycling // *Neuron.* – 2012. – V. 74. – № 1. – P. 151-65.
114. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R. Parkinson's disease // *Lancet.* – 2004. – V. 363. – № 9423. – P. 1783-93.

115. Scheff S.W., Price D.A., Schmitt F.A., DeKosky S.T., Mufson E.J. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment // *Neurology*. – 2007. – V. 68. – № 18. – P. 1501-8.
116. Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis // *Physiol Rev*. – 2000. – V. 80. – № 2. – P. 717-66.
117. Schluter O.M., Fornai F., Alessandri M.G., Takamori S., Geppert M., Jahn R., Sudhof T.C. Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice // *Neuroscience*. – 2003. – V. 118. – № 4. – P. 985-1002.
118. Schoch S., Deak F., Konigstorfer A., Mozhayeva M., Sara Y., Sudhof T.C., Kavalali E.T. SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice // *Science*. – 2001. – V. 294. – № 5544. – P. 1117-22.
119. Scholz S.W., Houlden H., Schulte C., Sharma M., Li A., Berg D., Melchers A., Paudel R., Gibbs J.R., Simon-Sanchez J., Paisan-Ruiz C., Bras J., Ding J., Chen H., Traynor B.J., Arepalli S., Zonozi R.R., Revesz T., Holton J., Wood N., Lees A., Oertel W., Wullner U., Goldwurm S., Pellecchia M.T., Illig T., Riess O., Fernandez H.H., Rodriguez R.L., Okun M.S., Poewe W., Wenning G.K., Hardy J.A., Singleton A.B., Del Sorbo F., Schneider S., Bhatia K.P., Gasser T. SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy // *Ann Neurol*. – 2009. – V. 65. – № 5. – P. 610-4.
120. Scott D., Roy S. alpha-Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis // *J Neurosci*. – 2012. – V. 32. – № 30. – P. 10129-35.
121. Senior S.L., Ninkina N., Deacon R., Bannerman D., Buchman V.L., Cragg S.J., Wade-Martins R. Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein // *Eur J Neurosci*. – 2008. – V. 27. – № 4. – P. 947-57.

122. Sharma M., Burre J., Bronk P., Zhang Y., Xu W., Sudhof T.C. CSpalpa knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function // EMBO J. – 2012. – V. 31. – № 4. – P. 829-41.
123. Sharma M., Burre J., Sudhof T.C. CSpalpa promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity // Nat Cell Biol. – 2011. – V. 13. – № 1. – P. 30-9.
124. Sharon R., Bar-Joseph I., Frosch M.P., Walsh D.M., Hamilton J.A., Selkoe D.J. The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease // Neuron. – 2003. – V. 37. – № 4. – P. 583-95.
125. Simon-Sanchez J., Schulte C., Bras J.M., Sharma M., Gibbs J.R., Berg D., Paisan-Ruiz C., Lichtner P., Scholz S.W., Hernandez D.G., Kruger R., Federoff M., Klein C., Goate A., Perlmutter J., Bonin M., Nalls M.A., Illig T., Gieger C., Houlden H., Steffens M., Okun M.S., Racette B.A., Cookson M.R., Foote K.D., Fernandez H.H., Traynor B.J., Schreiber S., Arepalli S., Zonozi R., Gwinn K., van der Brug M., Lopez G., Chanock S.J., Schatzkin A., Park Y., Hollenbeck A., Gao J., Huang X., Wood N.W., Lorenz D., Deuschl G., Chen H., Riess O., Hardy J.A., Singleton A.B., Gasser T. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease // Nat Genet. – 2009. – V. 41. – № 12. – P. 1308-12.
126. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease // Science. – 2003. – V. 302. – № 5646. – P. 841.
127. Skipper L., Liu J.J., Tan E.K. Polymorphisms in candidate genes: implications for the current treatment of Parkinson's disease // Expert Opin Pharmacother. – 2006. – V. 7. – № 7. – P. 849-55.

128. Sorensen J.B., Nagy G., Varoqueaux F., Nehring R.B., Brose N., Wilson M.C., Neher E. Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23 // *Cell*. – 2003. – V. 114. – № 1. – P. 75-86.
129. Soto I., Oglesby E., Buckingham B.P., Son J.L., Roberson E.D., Steele M.R., Inman D.M., Vetter M.L., Horner P.J., Marsh-Armstrong N. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model // *J Neurosci*. – 2008. – V. 28. – № 2. – P. 548-61.
130. Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1998. – V. 95. – № 11. – P. 6469-73.
131. Spillantini M.G., Goedert M. The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy // *Ann N Y Acad Sci*. – 2000. – V. 920. – P. 16-27.
132. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies // *Nature*. – 1997. – V. 388. – № 6645. – P. 839-40.
133. Surgucheva I., McMahan B., Ahmed F., Tomarev S., Wax M.B., Surguchov A. Synucleins in glaucoma: implication of gamma-synuclein in glaucomatous alterations in the optic nerve // *J Neurosci Res*. – 2002. – V. 68. – № 1. – P. 97-106.
134. Surguchov A. Molecular and cellular biology of synucleins // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2008. – V. 270. – P. 225-317.
135. Surguchov A., McMahan B., Masliah E., Surgucheva I. Synucleins in ocular tissues // *J Neurosci Res*. – 2001. – V. 65. – № 1. – P. 68-77.
136. Sutherland G.T., Halliday G.M., Silburn P.A., Mastaglia F.L., Rowe D.B., Boyle R.S., O'Sullivan J.D., Ly T., Wilton S.D., Mellick G.D. Do polymorphisms in the familial Parkinsonism genes contribute to risk for

- sporadic Parkinson's disease? // *Mov Disord.* – 2009. – V. 24. – № 6. – P. 833-8.
137. Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A.T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution // *Nature.* – 1998. – V. 395. – № 6700. – P. 347-53.
138. Tan E.K., Skipper L.M. Pathogenic mutations in Parkinson disease // *Hum Mutat.* – 2007. – V. 28. – № 7. – P. 641-53.
139. Tang J., Maximov A., Shin O.H., Dai H., Rizo J., Sudhof T.C. A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis // *Cell.* – 2006. – V. 126. – № 6. – P. 1175-87.
140. Tobaben S., Thakur P., Fernandez-Chacon R., Sudhof T.C., Rettig J., Stahl B. A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine // *Neuron.* – 2001. – V. 31. – № 6. – P. 987-99.
141. Tofaris G.K., Garcia-Reitbock P., Humby T., Lambourne S.L., O'Connell M., Ghetti B., Gossage H., Emson P.C., Wilkinson L.S., Goedert M., Spillantini M.G. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders // *J Neurosci.* – 2006. – V. 26. – № 15. – P. 3942-50.
142. Ueda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D.A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1993. – V. 90. – № 23. – P. 11282-6.
143. Ulmer T.S., Bax A., Cole N.B., Nussbaum R.L. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein // *J Biol Chem.* – 2005. – V. 280. – № 10. – P. 9595-603.
144. Umbach J.A., Saitoe M., Kidokoro Y., Gundersen C.B. Attenuated influx of calcium ions at nerve endings of csp and shibire mutant *Drosophila* // *J Neurosci.* – 1998. – V. 18. – № 9. – P. 3233-40.

145. Umbach J.A., Zinsmaier K.E., Eberle K.K., Buchner E., Benzer S., Gundersen C.B. Presynaptic dysfunction in *Drosophila* csp mutants // *Neuron*. – 1994. – V. 13. – № 4. – P. 899-907.
146. Washbourne P., Thompson P.M., Carta M., Costa E.T., Mathews J.R., Lopez-Bendito G., Molnar Z., Becher M.W., Valenzuela C.F., Partridge L.D., Wilson M.C. Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis // *Nat Neurosci*. – 2002. – V. 5. – № 1. – P. 19-26.
147. Wersinger C., Sidhu A. Partial regulation of serotonin transporter function by gamma-synuclein // *Neurosci Lett*. – 2009. – V. 453. – № 3. – P. 157-61.
148. Withers G.S., George J.M., Banker G.A., Clayton D.F. Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons // *Brain Res Dev Brain Res*. – 1997. – V. 99. – № 1. – P. 87-94.
149. Yavich L., Tanila H., Vepsäläinen S., Jakala P. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment // *J Neurosci*. – 2004. – V. 24. – № 49. – P. 11165-70.
150. Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atares B., Llorens V., Gomez Tortosa E., del Ser T., Munoz D.G., de Yebenes J.G. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia // *Ann Neurol*. – 2004. – V. 55. – № 2. – P. 164-73.
151. Zhang H., Kelley W.L., Chamberlain L.H., Burgoyne R.D., Wollheim C.B., Lang J. Cysteine-string proteins regulate exocytosis of insulin independent from transmembrane ion fluxes // *FEBS Lett*. – 1998. – V. 437. – № 3. – P. 267-72.
152. Zhang L., Zhang C., Zhu Y., Cai Q., Chan P., Ueda K., Yu S., Yang H. Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-

- terminal specific monoclonal antibody // Brain Res. – 2008. – V. 1244. – P. 40-52.
153. Zhang Y.Q., Henderson M.X., Colangelo C.M., Ginsberg S.D., Bruce C., Wu T., Chandra S.S. Identification of CSPalpha clients reveals a role in dynamin 1 regulation // Neuron. – 2012. – V. 74. – № 1. – P. 136-50.
154. Zhou P., Pang Z.P., Yang X., Zhang Y., Rosenmund C., Bacaj T., Sudhof T.C. Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion // EMBO J. – 2013. – V. 32. – № 1. – P. 159-71.
155. Zinsmaier K.E., Bronk P. Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis // Biochem Pharmacol. – 2001. – V. 62. – № 1. – P. 1-11.
156. Zinsmaier K.E., Hofbauer A., Heimbeck G., Pflugfelder G.O., Buchner S., Buchner E. A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of Drosophila // J Neurogenet. – 1990. – V. 7. – № 1. – P. 15-29.

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., Броновицкий 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.