

*На правах рукописи*

**Голомидов Илья Михайлович**

**ИЗУЧЕНИЕ РАННИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ  
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ФОРМЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И ПОИСК  
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ НА  
МОДЕЛИ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Специальность 1.5.7. – Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Гатчина 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук

**Саранцева Светлана Владимировна,**

заведующая лабораторией экспериментальной генетики ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

**Никитина Екатерина Александровна,**

заведующая кафедрой анатомии и физиологии человека и животных РГПУ им. А.И. Герцена, ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург

кандидат биологических наук

**Бондарев Станислав Александрович,**

научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург

Защита состоится « » \_\_\_\_\_ в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.088.01 (Д.002.214.01) в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института [www.vigg.ru](http://www.vigg.ru), тел. 8-499-135-14-31.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Горячева И.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования и современное состояние проблемы

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, частота встречаемости которого в Европе возрастает от 0,1% до 3% в возрастных группах от 70 до 90 лет [Pringsheim et al., 2014]. По мере увеличения продолжительности жизни населения и отсутствия эффективной терапии, данное заболевание становится одной из главных медицинских и экономических проблем, с которыми сталкивается современное общество. Было предсказано, что к 2030 году количество людей с диагностированной БП будет приближаться к 9 миллионам человек по всему миру [Dorsey et al., 2007].

БП характеризуется гибелью дофаминергических нейронов (ДН) в черной субстанции, что приводит к развитию двигательных нарушений, таких как: брадикинезия, акинезия, тремор покоя, ригидность мускулатуры. На сегодняшний день был выявлен ряд генетических факторов риска развития БП. Хотя семейные формы заболевания занимают небольшой процент от общего количества случаев, их изучение позволяет значительно расширить представление о патогенезе БП.

При патологоанатомическом исследовании мозга людей с БП часто выявлялось наличие интранейрональных включений, получивших название телец Леви, состоящих преимущественно из белка  $\alpha$ -синуклеина. Считается, что именно склонность  $\alpha$ -синуклеина к формированию агрегатов различной структуры является ключевым патоморфологическим фактором БП. Однако до сих пор нет однозначного представления о том, какие факторы приводят к нарушению фолдинга белка и стабилизации его токсичных для клеток форм.

$\alpha$ -синуклеин человека представляет собой небольшой белок, состоящий из 140 аминокислотных остатков, кодируемый геном *SNCA*, расположенным на 4 хромосоме [Wang et al., 2015]. Открытие замены аланина на треонин (A53T) в гене *SNCA* [Polymeropoulos, 1997] и замены аланина на пролин (A30P) [Krüger et al., 1998], которые ответственны за развитие аутосомно-доминантной формы БП, привело к созданию первых моделей БП на животных. Первая генетическая модель БП на мышах была опубликована в 2000 году E. Masliah, вскоре после открытия вовлеченности гена *SNCA* человека в семейные формы БП. В том же 2000 году M. V. Feany и W.W. Bender опубликовали свою модель БП на дрозофиле. Трансгенные мухи экспрессировали ген *SNCA* человека дикого типа и его формы с мутациями A30P и A53T. У дрозофилы гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями приводила к возрастной и селективной потере дофаминергических нейронов в дорсомедиальных кластерах мозга, а также к дегенерации фоторецепторных клеток в сетчатке [Feany et al., 2000]. Эти модели положили начало активного изучения  $\alpha$ -синуклеина и его функциональной роли в развитии нейропатологии.

Сегодня изучению БП посвящены многочисленные исследования, направленные на определение точных причин и механизмов возникновения заболевания. Эти вопросы остаются до сих пор открытыми. Как и вопрос о

токсичности  $\alpha$ -синуклеина. По-прежнему остается неясным, какие именно формы  $\alpha$ -синуклеина наиболее токсичны и провоцируют каскад нарушений, приводящих к дегенерации нейронов и развитию БП. Также стоит отметить, что  $\alpha$ -синуклеин обладает большим спектром функциональных взаимодействий с различными элементами клеток, что делает его исключительно важным компонентом в регуляции многих процессов, участвующих не только в синаптической передаче, но и в регуляции экспрессии генов. Изучение патогенеза заболевания как на предсимптомной фазе, так и в фазе видимых двигательных нарушений имеет большое значение, поскольку понимание факторов, приводящих к нарушениям на той или иной стадии заболевания, может помочь с определением стратегии терапии БП, которая может принести максимальную эффективность.

Также хочется отметить, что до сих пор, ни одно лекарственное средство не останавливает, а только лишь замедляет, прогрессию заболевания. На сегодняшний день основополагающим терапевтическим средством является леводопа (L-DOPA), которая почти всегда сочетается с карбидопой или бенсеразидом – ингибиторами декарбоксилазы ароматических кислот. Однако эффективность действия леводопы со временем снижается, что приводит к необходимости повышать дозировку препарата, а это в свою очередь, влечет за собой увеличение рисков проявления побочных эффектов, которые включают в себя: тошноту, рвоту, ортостатическую гипотензию, спутанность сознания, нарушение сна, галлюцинации и дискинезии. Поэтому различными группами исследователей проводятся скрининги веществ, обладающих нейропротекторными свойствами. И становится ясно, что для терапии данного заболевания будет необходим комплексный подход, направленный как на изменение уровня агрегации  $\alpha$ -синуклеина, регуляцию его экспрессии, так и на восстановление активности митохондрий и уменьшение уровня окислительного стресса.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы является изучение на модели *Drosophila melanogaster* ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона, а также поиск потенциальных агентов для разработки терапии заболевания.

**Задачи:**

1. Провести морфологический и функциональный анализ нервно-мышечных соединений на личинке *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его формы с мутацией, приводящей к замене A30P и формы с мутацией, приводящей к замене A53T.
2. Проанализировать влияние подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на нейродегенеративные процессы на *D. melanogaster*.
3. Исследовать нейропротекторную активность «красного пигмента» дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на модели БП на *D. melanogaster*.
4. Исследовать нейропротекторную активность фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  на модели БП на *D. melanogaster*.

5. Проанализировать нейропротекторные свойства фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на модели болезни Гоше (БГ) на *D. melanogaster*.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями в моторных нейронах личинок *D. melanogaster* приводит к нарушению формирования синаптических контактов, а также влияет на локализацию синаптотагмина.

2. Подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями у *D. melanogaster* приводит к уменьшению растворимых форм белка  $\alpha$ -синуклеина и замедлению развития нейропатологии.

3. «Красный пигмент» дрожжей *S. cerevisiae* обладает нейропротекторной активностью на модели БП на *D. melanogaster*.

4. Использование фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  способствует замедлению нейродегенеративных процессов на модели БП на *D. melanogaster*.

5. Фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы, относящиеся к классу аллостерических активаторов, замедляют развитие нейродегенерации на модели БГ на *D. melanogaster*.

**Научная новизна исследования.** В работе впервые показано, что экспрессия гена *SNCA* влияет на формирование синаптических контактов и распределение синаптических белков в синаптическом бутоне у *D. melanogaster*. Также впервые продемонстрировано, что подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями замедляет развитие нейропатологии, а наличие растворимых форм  $\alpha$ -синуклеина связано с прогрессированием нейродегенерации. В системе *in vivo* на модели БП на *D. melanogaster* показана нейропротекторная активность «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* и нейропротекторные свойства фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$ . Показано, что применение фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы, относящихся к классу аллостерических активаторов, может влиять на скорость развития нейродегенерации на модели БГ на *D. melanogaster*.

**Теоретическое и практическое значение работы.** В работе показана роль  $\alpha$ -синуклеина в формировании и поддержании синаптических контактов, а также его влияние на распределение синаптотагмина. Была установлена связь между развитием ранней нейропатологии и продолжительностью экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. А также показано влияние гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на уровень экспрессии других синаптических генов.

Практическая значимость работы обусловлена исследованием «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* и фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  в качестве соединений, обладающих возможным нейропротекторным эффектом. В работе показана эффективность данных веществ в отношении замедления развития нейродегенерации. Также исследован новый класс низкомолекулярных шаперонов глюкоцереброзидазы, направленных на терапию БГ, но

опосредованно способных влиять на снижение риска развития БП. Была продемонстрирована эффективность данного класса соединений в отношении развития нейродегенерации на модели БГ на *D. melanogaster*. Как итог – некоторые из исследованных веществ в дальнейшем могут найти применение для разработки терапии БП.

**Личный вклад автора.** Основная часть работы выполнена автором лично. Морфологический и функциональный анализ нервно-мышечных соединений проведен совместно с Латыповой Е.М. Подготовка препаратов для конфокальной микроскопии осуществлялась совместно с Рябовой Е.В. и Суриной Н.В. Тесты на уровень локомоторной активности и продолжительность жизни дрозофилы проведены совместно с Большаковой О.И. Анализ уровня активных форм кислорода проведен совместно с Комиссаровым А.Е. Описание совместных исследований, анализ и интерпретация результатов проведены лично автором.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность экспериментальных результатов и сделанных на их основе выводов подтверждается согласующимися между собой данными, полученными различными и независимыми современными генетическими и биохимическими методами. Статистический анализ проводился с использованием специального программного обеспечения – KyPlot 5.0, Past v. 4.07b и Jasp v. 0.16.0.0. Постулируемые в работе утверждения формулировались с опорой на проанализированную литературу отечественных и зарубежных авторов.

Материалы данного исследования прошли апробацию на следующих конференциях и конгрессах: Международная конференция «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, Россия, 2020 г.), XVI International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology» (Судак, Россия, 2020 г.), Международный конгресс «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» (Санкт-Петербург, Россия, 2019 г.), XIV International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology» (Судак, Россия, 2018 г.), Международная конференция «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, Россия, 2017 г.) и других.

**Перечень публикаций.** Результаты работы опубликованы в 5 статьях в научных журналах, 4 из которых входят в перечень ВАК, а также в 15 сборниках научных международных и российских конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 174 страницах и состоит из «Введения», «Аналитического обзора», «Материалов и методов», «Результатов и обсуждения», включающих 33 рисунка и 4 таблицы, заключения, «Выводов» и «Списка литературы», содержащего 311 источников.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Линии *D. melanogaster*, использованные в работе**

В работе использовались следующие линии *D. melanogaster*. Линии получены из Bloomington Stock Center (США).

$P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$  – линия содержит вставку Р–элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для нейронов промотором (далее – *elav*, #458 BDSC, USA), I хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$  – линия содержит вставку гена *SNCA* человека дикого типа (далее – *SNCA.WT*, #8146 BDSC, USA), III хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$  – линия содержит вставку гена *SNCA* человека, приводящей к замене A30P (далее – *SNCA.A30P*, #8147 BDSC, USA), III хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$  – линия содержит вставку гена *SNCA* человека, приводящей к замене A53T (далее – *SNCA.A53T*, #8148 BDSC, USA), III хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$  – линия содержит вставку Р–элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для моторных нейронов промотором (далее – *D42*, #8816 BDSC, USA), III хромосома;

$y^l w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5$  – линия содержит вставку Р–элемента с генетической конструкцией, которая запускает экспрессию химерного гена *mCD8::GFP*, кодирующего флуоресцирующий белок, встраивающийся в мембрану клетки (далее – *CD8*, #5137 BDSC, USA), II хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2$  – линия с экспрессией гена *Syt1* совместно с *eGFP* (далее – *Syt1*, #6925 BDSC, USA), II хромосома;

$w^{1118}$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/CyO$  – линия с экспрессией гена *GFP* который кодирует флуоресцирующий белок, встраивающийся в мембрану митохондрий (далее – *mito*, #8442 BDSC, USA), II хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$  – линия содержит вставку Р–элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для дофаминергических нейронов промотором (далее – *ple*, #8848 BDSC, USA), III хромосома;

$y^l w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}$  – линия содержит вставку Р–элемента с генетической конструкцией химерного гена *mCD8::GFP*, который кодирует флуоресцирующий белок, встраивающийся в мембрану клетки (далее – *CD8*, получена из #5136 BDSC, USA), I хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^s\}20$ ; *TM2/TM6B*, *Tb<sup>1</sup>* – линия несет инсерцию температурно–зависимого аллеля *GAL80*, экспрессирующегося под промотором  $\alpha$ -Tub84B (далее – *GAL80*, #7019 BDSC, USA), II хромосома;

$w^*$ ;  $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$   $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$  – линия, содержащая вставку Р–элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для холинергических нейронов промотором (далее – *cha*, #6793 BDSC, USA), II хромосома;

$w^{1118}$ ; *Mi\{GFP<sup>E.3xP3</sup>=ET1\}Gba1b<sup>MB03039</sup>/TM6C*, *Sb<sup>1</sup>* – линия несет вставку мобильного элемента *Minos* в ген *CG31414* дрозофилы. Инсерция приводит к преждевременному прекращению синтеза белка (далее – *Gba1b*, #23602 BDSC, USA), III хромосома;

$w^{1118}$ ;  $Mi\{GFP^{E.3xP3=ET1}\}Gba1a^{MB02296}$  – линия несет вставку мобильного элемента *Minos* в ген *CG31148* дрозофилы. Инсерция приводит к преждевременному прекращению синтеза белка (далее – *Gba1a*, #23435 BDSC, USA), III хромосома;

Также в работе были использованы линия мух дикого типа *CantonS* и линия мух с мутацией *white* – *white<sup>1118</sup>*.

В ходе эксперимента по анализу нервно–мышечных соединений личинки дрозофилы и мухи содержались при температуре 25°C при 12 часовом световом дне, на среде, содержащей: 0,4% агара (w/v), 2,5% дрожжей (w/v), 4% сахарного песка (w/v), 3,5% манная крупа (w/v).

В экспериментах, проводимых при помощи системы *UAS–GAL4/GAL80*, до вылета мухи содержались при 18°C, для депрессии синтеза целевого белка, затем при 29°C, чтобы активировать белковый синтез на среде, содержащей: 0,4% агара (w/v), 2,5% дрожжей (w/v), 4% сахарного песка (w/v), 3,5% манная крупа (w/v).

В ходе эксперимента по определению нейропротекторной активности «красного пигмента» дрожжей до достижения возраста в 30 дней мухи содержались на среде с составом: 1,1% агара, 5% сахарного песка с добавлением инактивированных красных или белых дрожжей *S. cerevisiae* в концентрации 20%. «Красный» штамм 23Sr и «белый» изогенный штамм 23Sw дрожжей выращивали на твердых стандартных средах (YEED) в течение 5 дней и использовали для кормления дрозофилы.

В ходе эксперимента по определению нейропротекторной активности фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$ , а также молекулярных шаперонов глюкоцереброзидазы, на протяжении всей жизни, либо до достижения возраста в 30 дней (в зависимости от исследуемого показателя) мухи содержались на среде с составом: 1,1% агара, 5% сахарного песка с добавлением инактивированных дрожжей в концентрации 20%, содержащими, либо не содержащими фуллеренолы или молекулярные шапероны глюкоцереброзидазы.

### **Приготовление препаратов личинки *D. melanogaster* для лазерной конфокальной микроскопии**

Личинки третьего возраста препарировались согласно методике [Schuvalova et al, 2014]. Образцы были проанализированы на лазерном конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica, Germany) с использованием программного обеспечения Leica LASX. Каждый эксперимент был выполнен в не менее чем 3 биологических повторах.

### **Вестерн-блот анализ**

Вестерн-блот анализ был проведён согласно методике [Golomidov et al., 2022]. Фоновое окрашивание вычиталось из сигналов образцов, интенсивность полос  $\alpha$ -синуклеина была нормирована на интенсивность полос тубулина. Каждый эксперимент был выполнен в не менее чем 3 биологических повторах.

### **Анализ уровня дофамина**

Уровень дофамина измеряли согласно методике [Golomidov et al., 2022] с использованием набора ИФА (ImmSmol Dopamine ELISA kit) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию останавливали путем добавления стоп-



раствора; оптическую плотность измеряли спектрофотометром Multiskan FC (Thermo Scientific) на длине волны 450 нм. Каждый эксперимент был выполнен в не менее чем 3 биологических повторах.

### **Анализ активных форм кислорода**

Уровень активных форм кислорода измерялся согласно методике [Trindade de Paula et al., 2016 с изменениями]. Измерение проб проводилось не менее 6 раз. Каждый эксперимент был выполнен в не менее чем 3 биологических повторах.

### **Оценка локомоторной активности**

Локомоторная активность мух определялась в тесте на отрицательный геотаксис. По 20-25 мух помещались в пробирку, мягко стряхивались на дно. Учитывалось количество мух, способных подняться на 5 см вверх по стенке пробирки в течение 15 секунд. Результаты представлены в процентах от всех мух, находящихся в стакане. Уровень локомоторной активности определялся у не менее чем 100 особей. Каждый эксперимент был выполнен в не менее чем 3 биологических повторах.

### **Статистическая обработка результатов**

Статистическая обработка данных была проведена в программах KyPlot 5.0, Past v.4.07b и Jasp v.0.16.0.0. Для проверки соответствия распределения выборки нормальному распределению использовали критерий Шапиро-Уилка. Оценка равенства дисперсий выборок проводилась с использованием критерия Левина (для трех и более независимых количественных выборок). При нормальном распределении данных и равенстве дисперсий выборок проводился однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В рамках апостериорного анализа проводили попарное множественное сравнение исследуемых групп с использованием теста Тьюки для равных объемов выборок, либо теста Бонферрони, если объемы выборок различались. Для выборок, распределение которых отличается от нормального, использовался критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением выборок при помощи критерия Данна.

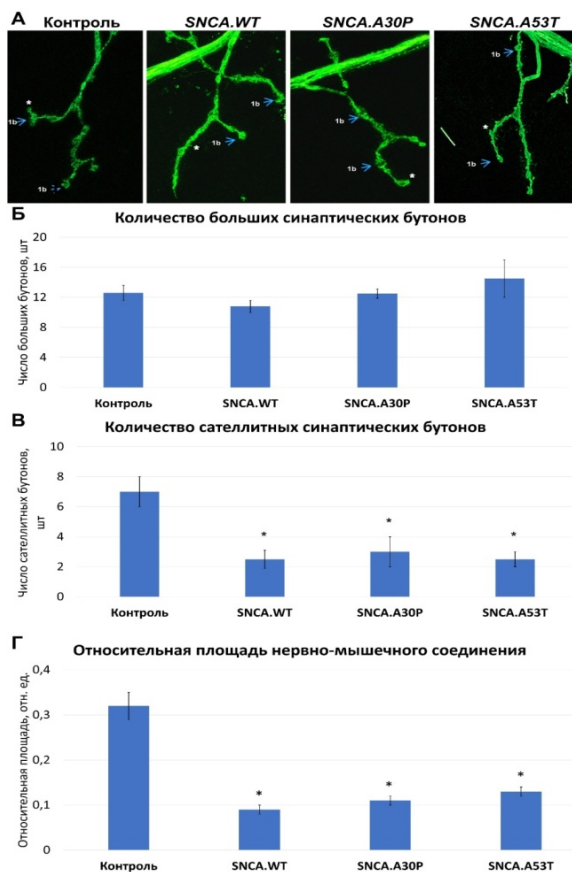
## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Морфологический и функциональный анализ нервно–мышечных соединений личинки *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями**

Для определения влияния экспрессии гена *SNCA* на морфологию и структуру нервно–мышечных соединений мы использовали трансгенную линию *CD8;D42*, мембраны моторных нейронов личинок которой мечены GFP. У потомков от скрещиваний этой линии с линиями, несущими вставку гена *SNCA* человека дикого типа или его мутантных форм методом конфокальной микроскопии были проанализированы нервно–мышечные соединения на 4–ой мышце 3–его абдоминального сегмента личинки (терминологию см. [Budnik et al., 2006]). Мы провели подсчет числа больших и сателлитных бутонов в контрольной линии и линиях с экспрессией гена *SNCA*. Как следует из Рисунка 1, количество больших синаптических бутонов в нервно–мышечных соединениях личинок линий, экспрессирующих ген *SNCA* человека дикого типа и его мутантных форм, не уменьшалось по сравнению с контролем (Рисунок 1 А,

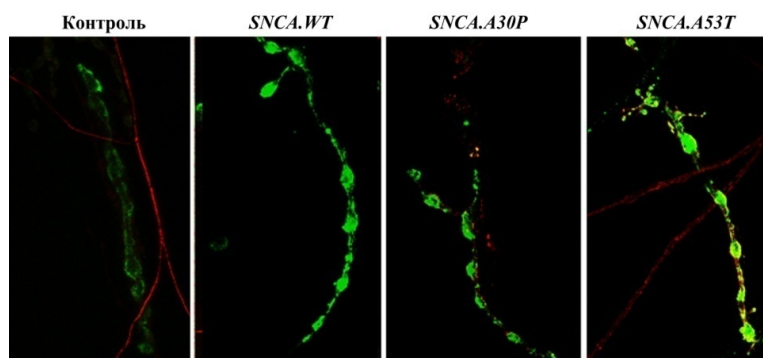
Б). Однако, все линии с экспрессией *SNCA.WT/SNCA.A30P/SNCA.A53T* имели сниженное количество сателлитных бутонов по сравнению с контрольной линией без экспрессии гена *SNCA* (Рисунок 6 А, В) [Schuvalova et al., 2014].

Экспрессия гена *SNCA* человека, как дикого типа, так и его форм с мутациями, в моторных нейронах *D. melanogaster* также уменьшала площадь нервно-мышечных соединений по сравнению с контрольной линией без экспрессии гена *SNCA* человека (Рисунок 1 Г) [Schuvalova et al., 2014].



**Рисунок 1 – Морфологический анализ нервно-мышечных соединений четвертой мышцы третьего брюшного сегмента личинок *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа (*SNCA.WT*) и его форм с мутациями А30Р (*SNCA.A30P*) и А53Т (*SNCA.A53T*). А – Конфокальные изображения нервно-мышечных соединений. Стрелки указывают на большие синаптические бутоны 1b. Звездочка (\*) обозначает сателлитные бутоны. Масштаб 25 мкм. Б – Число больших синаптических бутонов. В – Число сателлитных синаптических бутонов. Г – Относительная площадь нервно-мышечного соединения (абсолютная площадь нервно-мышечного соединения делится на площадь соответствующей мышцы) личинки *D. melanogaster*. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего, \* $p < 0.05$ ,  $n \geq 8$ ,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.**

Далее мы исследовали распределение белка синаптотагмина-1 (Syb1), который является интегральным мембранным гликопротеином синаптических везикул и считается основным кальциевым сенсором, запускающим экзоцитоз нейротрансмиттеров [Koh et al., 2003; Südhof, 2004]. На Рисунке 2 показано, что в контрольной линии Syb1 локализовался внутри синаптических бутонов, ближе к мембране, в то время как в линиях с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями, Syb1 большей частью был распределен внутри синаптического бутона [Schuvalova et al., 2014].



**Рисунок 2 - Распределение синаптотагмина-1 в нервно-мышечных соединениях личинок *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека и его форм с мутациями А30Р и А53Т. Конфокальная микроскопия. Масштаб 25 мкм.**

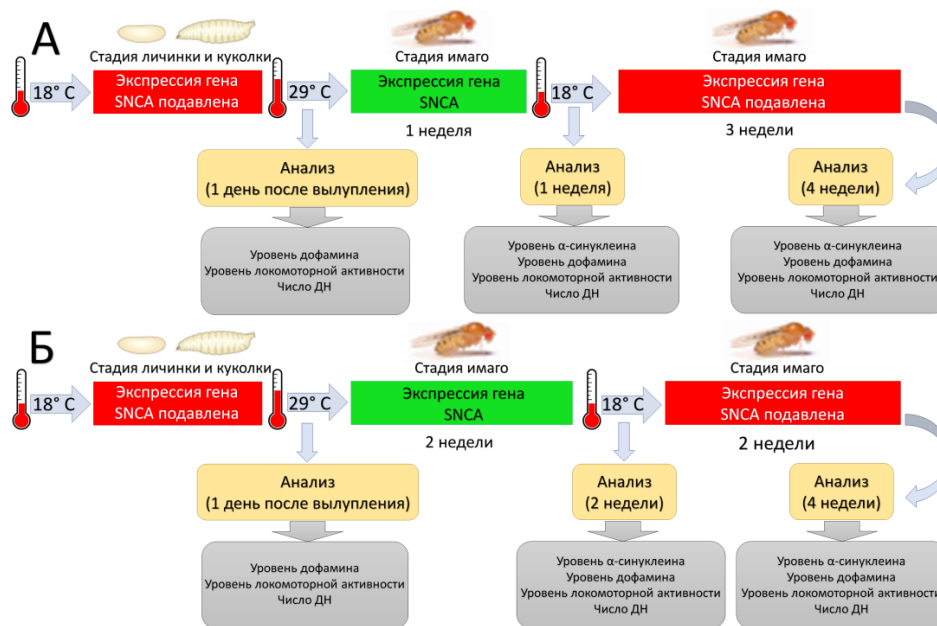
Нарушение в распределении Syb1 может оказать влияние на секрецию нейромедиаторов. Расположение данного белка непосредственно у мембраны синаптического бутона имеет важное значение, поскольку в дополнение к образованию  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых комплексов с фосфолипидами, синаптотагмин-1 также связывается с комплексами SNARE. Синаптотагмин-1 связывается с комплексом SNARE в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , но переключается на фосфолипидную мембрану, как только поступают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  дестабилизирует промежуточное связывание SNARE и синаптических везикул, вызывая частичную вставку C2-доменов синаптотагмина-1 в фосфолипиды. Предполагается, что это действие вызывает механическое возмущение, которое открывает поры мембраны и позволяет выйти медиатору в синаптическую щель [Südhof, 2004]. Нарушение распределения Syb1 может послужить дестабилизации белковых комплексов с синаптическими везикулами, а также развитию синаптической дисфункции.

Таким образом, мы продемонстрировали, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями модулирует формирование и поддержание синаптических контактов и способствует развитию синаптической патологии.

## **2. Подавление экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями способствует замедлению развития ранней нейропатологии при БП на модели *D. melanogaster*.**

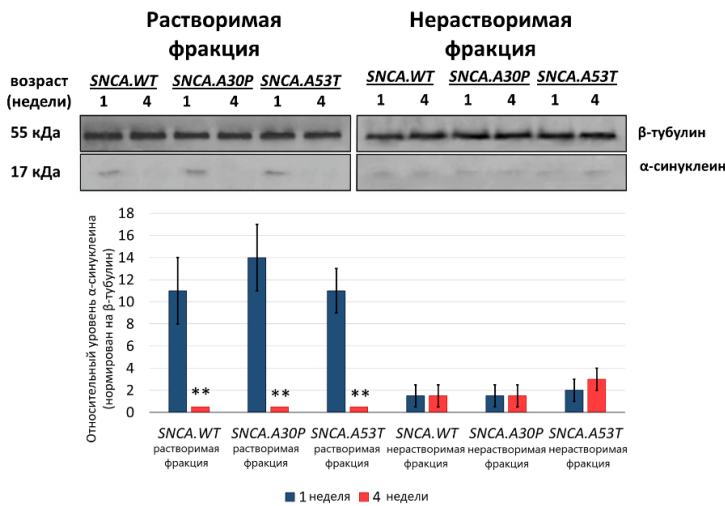
Для исследования эффектов подавления экспрессии гена *SNCA* была использована TARGET система, которая основана на способности дрожжевого белка GAL80 подавлять активатор экспрессии Gal4. Совместная экспрессия *UAS-GAL4* и температурно-зависимого аллеля *GAL80* приводит к сильному подавлению экспрессии целевого гена при 18°C и запуску его экспрессии при 29°C. Следовательно, можно контролировать экспрессию генов-мишеней во времени на протяжении всей жизни дрозифилы.

Мы использовали преимущества этой системы для экспрессии *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* человека только в течение определенного периода жизни дрозифилы (в течение одной или двух недель на стадии имаго). Затем, в течение оставшегося периода жизни (до четвертой недели жизни), экспрессия генов была подавлена. Были проанализированы следующие показатели: уровень белка  $\alpha$ -синуклеина, количество дофаминергических нейронов, уровень дофамина в клетках мозга *D. melanogaster* и локомоторная активность мух. В нашей системе экспрессия *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* запускалась в различных типах тканей для анализа определенных показателей нейропатологии: для оценки сохранения количества дофаминергических нейронов (ДН) экспрессия осуществлялась только в дофаминергических клетках, в то время как для исследования остальных показателей экспрессия запускалась во всех нейронах дрозифилы (Рисунок 3) [Golomidov et al., 2022].



**Рисунок 3 – Схема проведения эксперимента.** А – До вылета мух содержали при температуре 18 °С, что приводило к подавлению экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*. После этого мух перемещали в термостат и содержали при температуре 29 °С в течение одной недели для экспрессии целевого гена. Затем, вплоть до 28-го дня жизни (4 недели), мух снова перемещали в термостат и содержали при температуре 18 °С, чтобы подавить экспрессию целевого гена. Б – Схема эксперимента аналогична схеме, показанной в (А), за исключением периодов времени: экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* запускалась в течение двух недель, а подавление экспрессии осуществлялось до 28-го дня жизни. В точках, обозначенных как "анализ", измеряли уровень α-синуклеина, уровень дофамина, уровень локомоторной активности и количество дофаминергических нейронов. Кроме того, первые три параметра были измерены с помощью экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* во всех нейронах (*elav*), а степень дегенерации нейронов определяли при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в дофаминергических нейронах (*ple*) дрозофилы.

Мы провели вестерн-блот анализ, с помощью которого оценили уровни растворимых в Triton/SDS и нерастворимых в Triton/SDS (растворимых в мочеvine) фракций α-синуклеина после последовательной экстракции. Triton/SDS растворимая фракция, содержащая как растворимую цитозольную форму, так и растворимые липид-ассоциированные формы белка, в дальнейшем называется нами «растворимой фракцией α-синуклеина». Фракция, которая нерастворима в Triton/SDS, но растворима в буфере с мочеvine, содержит белковые агрегаты и в дальнейшем называется нами «нерастворимой фракцией α-синуклеина». Когда ген *SNCA* человека дикого типа и его формы с мутациями экспрессировались в течение 1 недели во всех нейронах, мы наблюдали небольшое накопление белка α-синуклеина как дикого типа, так и его форм с мутациями, в основном растворимой фракции, в клетках мозга дрозофилы (Рисунок 4) [Golomidov et al., 2022].

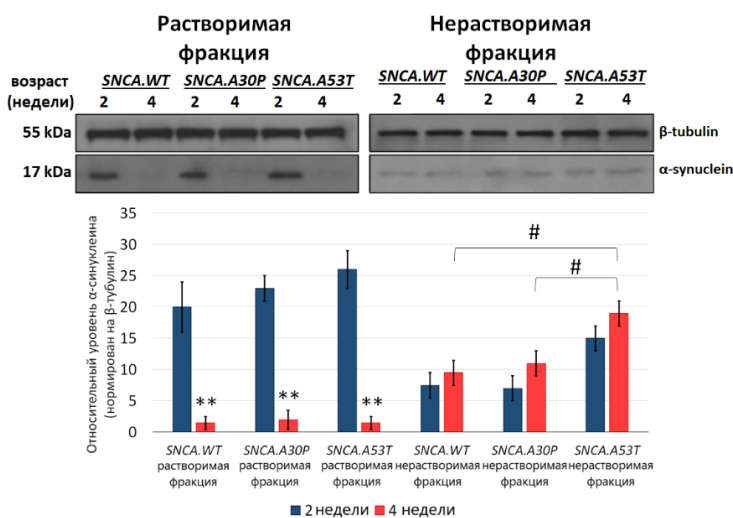


**Рисунок 4 – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* во всех нейронах дрозофилы в течение одной недели с использованием системы *UAS-GAL4* / *GAL80* приводит к накоплению различного уровня  $\alpha$ -синуклеина в растворимой и нерастворимой фракциях.** Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни растворимого и нерастворимого  $\alpha$ -синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Гистограмма показывает снижение относительного уровня  $\alpha$ -синуклеина после

подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в растворимой, но не в нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина (измерено на 4 неделе жизни). Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\* $p < 0.005$ , 100 голов/генотип,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.

После блокирования экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в течение следующих 3 недель растворимая фракция белка  $\alpha$ -синуклеина была удалена из клеток, в то время как уровень белка нерастворимой фракции оставался на том же, незначительно определяемом уровне (измеренном на 4-ой неделе).

При экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями в течение двух недель во всей нервной системе, мы наблюдали значительно более высокие уровни белка  $\alpha$ -синуклеина как растворимой, так и нерастворимой фракции (Рисунок 5) [Golomidov et al., 2022].



**Рисунок 5 – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в течение 2 недель с использованием системы *UAS-GAL4* / *GAL80* приводит к различному уровню накопления  $\alpha$ -синуклеина в растворимой и нерастворимой фракциях.** Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни растворимого и нерастворимого  $\alpha$ -синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Гистограмма показывает

снижение относительного уровня белка  $\alpha$ -синуклеина после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в растворимой, но не в нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина (измерено на 4 неделе жизни). Звездочка (\*) – характеризует изменения в пределах одного генотипа. Решетка (#) – характеризует изменения между различными генотипами. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, # $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , 100 голов/генотип,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.

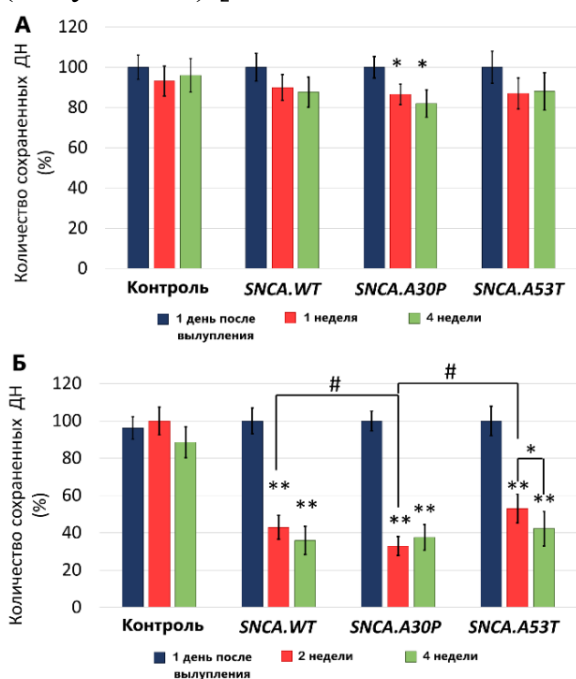
После подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями у дрозофилы уровень растворимой фракции белка  $\alpha$ -синуклеина значительно снизился к 4-ой неделе. Между тем уровень нерастворимой фракции белка  $\alpha$ -синуклеина оставался на прежнем уровне. Но, стоит отметить, что уровень нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина к 4-й неделе у мух с генотипом *SNCA.A53T* находился на более высоком уровне по сравнению с нерастворимой фракцией белка у мух с экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P*.

Ранее было показано, что  $\alpha$ -синуклеин с мутациями A30P и A53T более стабилен и устойчив к деградации, чем белок дикого типа [Cuervo, 2014]. В наших экспериментах подавление экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями приводило к значительному снижению растворимых форм белка, в то же время нерастворимая фракция не удалялась из клеток к четвертой неделе. Более того, у мух с экспрессией гена *SNCA* человека с точечной мутацией, приводящей к замене A53T уровень нерастворимых форм  $\alpha$ -синуклеина на 4 неделе был выше, чем уровень нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина у мух с экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P*. Это может быть объяснено тем, что данная мутация увеличивает тенденцию  $\alpha$ -синуклеина полимеризоваться в фибриллярные структуры. Ускоренное образование фибрилл при наличии мутации A53T было отмечено ранее К. А. Conway с коллегами [Conway et al., 1998].

Далее мы оценили количество ДН в мозге дрозофилы при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. Для того чтобы сделать кластеры визуально различимыми, мы запускали экспрессию *GFP* в мембранах дофаминергических нейронов, с последующим количественным анализом GFP-позитивных клеток при помощи конфокальной микроскопии, согласно методу J. A. Botella [Botella et al., 2008].

Экспрессия *SNCA.WT* и *SNCA.A53T* в течение одной недели не приводила к статистически достоверной гибели ДН, однако у линии с экспрессией гена *SNCA.A30P* мы обнаружили развитие начальных признаков нейродегенерации, выраженное в небольшой (отличие от контроля не более чем на 15%), но статистически достоверной гибели ДН (Рисунок 6А) [Golomidov et al., 2022]. После блокирования экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями мы не наблюдали, статистически достоверной разницы в снижении количества дофаминергических нейронов у мух всех генотипов между первой и четвертой неделями жизни. Экспрессия у дрозофилы гена *SNCA.WT* в течение 2 недель приводила к потере более чем 50% дофаминергических нейронов. Этот эффект также наблюдался при экспрессии гена *SNCA* с мутациями A30P и A53T. На том же временном интервале у контрольных мух не наблюдалось потери ДН. После подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* мы не наблюдали статистически значимых различий в количестве ДН между второй и четвертой неделями. Однако мы наблюдали статистически достоверное уменьшение количества ДН к четвертой неделе у мух с экспрессией *SNCA.A53T*, но стоит отметить, что гибель ДН в этот временной промежуток была значительно

меньше, чем в первые 2 недели, когда экспрессия гена не была подавлена (Рисунок 6Б) [Golomidov et al., 2022].



**Рисунок 6 – Количество сохранных дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*.** А – Гистограмма количества дофаминергических нейронов после 1 недели экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с последующим подавлением экспрессии гена в течение 3 недель. Б – Гистограмма количества дофаминергических нейронов после 2 недель экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с последующим подавлением экспрессии гена в течение 2 недель. Звездочка (\*) характеризует изменения в пределах одного генотипа. Решетка (#) характеризует изменения между различными генотипами. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, # $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ ,  $n \geq 8$  голов/генотип,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.

анализ.

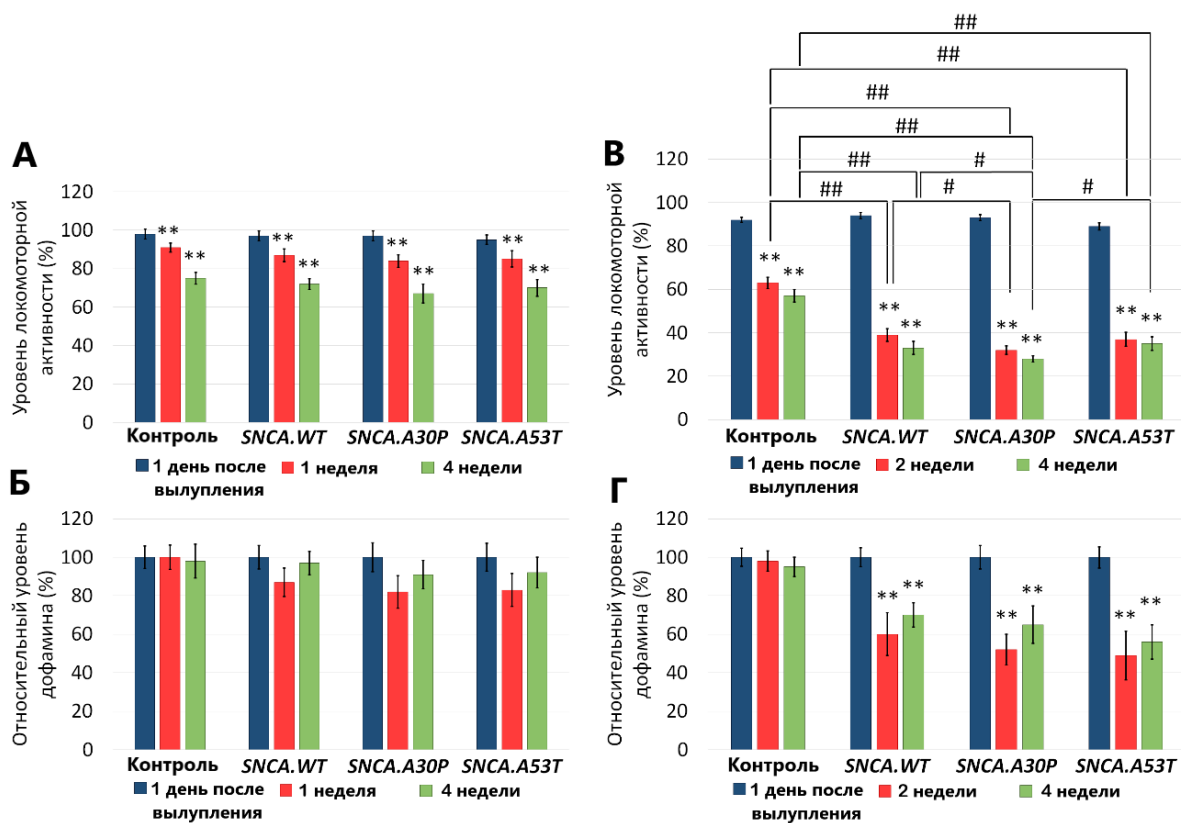
Интересно, что гибель ДН сопровождалась накоплением как растворимых, так и нерастворимых форм  $\alpha$ -синуклеина, в то время как к четвертой неделе снижение уровня растворимой и присутствие по большей части нерастворимой формы  $\alpha$ -синуклеина не усиливало нейродегенерацию. Этот факт может указывать на то, что именно растворимые формы  $\alpha$ -синуклеина участвуют в инициации патологии.

Точечные мутации, связанные с семейными формами БП, приводят к раннему началу развития патологии. Мы наблюдали наиболее сильные нейродегенеративные процессы у мух, экспрессирующих ген *SNCA* человека с мутацией А30Р. Это может быть связано с влиянием этой мутации на способность белка связываться с везикулами [Jensen et al., 1998]. Таким образом, в нервных клетках нарушается перенос  $\alpha$ -синуклеина с мутацией А30Р посредством быстрого аксонного транспорта. Перераспределение белка из-за потери его связывающей активности может быть одним из основных последствий мутации. Со временем это приводит к накоплению белка в отдельных частях клетки и образованию олигомерных и фибриллярных форм. Конформационная лабильность  $\alpha$ -синуклеина делает его более склонным к агрегации и может ускорить превращение мономерного  $\alpha$ -синуклеина в олигомеры или протофибриллы [Luk et al., 2009]. Известно, что многие патогенные эффекты в клетках развиваются под действием растворимых форм, в частности олигомеров  $\alpha$ -синуклеина [Campioni et al., 2010]. Олигомеры  $\alpha$ -синуклеина также способствуют увеличению продукции активных форм кислорода и снижению синаптической активности [Choi et al., 2013]. После остановки экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями

мы наблюдали значительное замедление развития нейродегенерации к четвертой неделе, при этом присутствовала в большей степени нерастворимая форма  $\alpha$ -синуклеина. Мы не обнаружили различий между количеством дофаминергических нейронов у мух с экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P* к четвертой неделе по сравнению со второй неделей жизни, но мы наблюдали более длительную дегенерацию нейронов у мух с генотипом *SNCA.A53T*. Наличие мутации A53T характеризуется не только повышенной тенденцией к фибрилляции  $\alpha$ -синуклеина, но и образованием агрегатов различной структуры [Li et al., 2001], что может привести к более быстрому образованию олигомеров и усилению его токсичного действия на клетки. Некоторые исследования также показали, что присутствие  $\alpha$ -синуклеина в форме фибрилл влияет на уровень нейродегенерации и образование новых агрегатов  $\alpha$ -синуклеина [Mougenot et al., 2012]. Однако стоит отметить, что процент нейронов, подвергшихся дегенерации в этот период, значительно меньше, чем в первые две недели жизни дрозофилы.

Учитывая наблюдаемое развитие нейропатологии, мы провели анализ уровня дофамина, а также оценили развитие двигательной дисфункции. Изменений в локомоторной активности у мух при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в течение одной недели по сравнению с контролем выявлено не было (Рисунок 7А), в то время как у мух с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в течение двух недель, было отмечено снижение двигательной активности на 60% к 14-му дню (Рисунок 7В) [Golomidov et al., 2022]. Наибольшее снижение двигательной активности наблюдалось у мух с генотипом *SNCA.A30P*. Однако после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* к четвертой неделе жизни, статистических значимых отличий от уровня локомоторной активности на второй неделе выявлено не было. Обнаруженные локомоторные изменения у *D. melanogaster* были взаимосвязаны с уровнем дофамина в клетках мозга дрозофилы. Экспрессия *SNCA* дикого типа или его форм с мутациями в течение одной недели после вылета не привела к изменениям уровня дофамина в клетках мозга дрозофилы (Рисунок 7Б) [Golomidov et al., 2022]. У мух всех исследованных линий не было обнаружено статистически значимой разницы в уровнях дофамина между первой и четвертой неделями после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*. Однако мы обнаружили, что экспрессия *SNCA* как дикого типа, так и его форм с мутациями, в течение двух недель привела к значительному снижению уровня дофамина. Наиболее сильный эффект в снижении уровня дофамина к четвертой неделе наблюдался у мух с экспрессией гена *SNCA* с точечными мутациями, приводящими к заменам A30P и A53T (Рисунок 7Г) [Golomidov et al., 2022], однако средние значения по отношению к уровню дофамина в линии *SNCA.WT* в аналогичный период времени не имеют статистически значимых отличий.





**Рисунок 7 –**Уровень локомоторной активности и уровень дофамина *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в течение разных промежутков времени. А) Локомоторная активность мух после одной недели экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и после трех недель, в течение которых экспрессия гена была подавлена. Б) Уровень дофамина в клетках мозга дрозофилы после одной недели экспрессии гена *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и после трех недель, в течение которых экспрессия гена была подавлена. В) Локомоторная активность мух после двух недель экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и после двух недель, в течение которых экспрессия гена была подавлена. Г) Уровень дофамина в клетках мозга дрозофилы после двух недель экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и после двух недель, в течение которых экспрессия гена была подавлена Звездочка (\*) – характеризует изменения внутри одного генотипа. Решетка (#) – характеризует изменения между различными генотипами. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\*  $p < 0.005$ , #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.005$ ,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.

Проводя сравнение значений между второй и четвертой неделями всех генотипов мух, мы обнаружили, что после подавления экспрессии гена *SNCA* как дикого типа, так и его форм с мутациями, уровень дофамина далее не снижался. У мух, с экспрессией гена *SNCA* с мутацией, приводящей к замене А30Р, наблюдалось наиболее сильное снижение локомоторной активности по сравнению с контролем. Как мы показали ранее, наличие этой мутации приводит к более быстрой потере дофаминергических нейронов. Весь каскад нейродегенеративных процессов, начиная с накопления  $\alpha$ -синуклеина, гибели дофаминергических нейронов и снижения уровня дофамина, приводит к характерным моторным нарушениям. В то же время, после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*, уровень локомоторной активности остается на прежнем уровне, что может также свидетельствовать о

замедлении нейродегенеративных процессов. Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что растворимая форма  $\alpha$ -синуклеина, в отличие от нерастворимых агрегатов, вносит больший вклад в патогенез БП на ранних стадиях развития нейропатологии. Впоследствии все большее количество олигомерных структур может генерироваться ранее сформированными фибриллами, и на более поздних стадиях развития заболевания токсичность будет проявляться как в присутствии олигомерных форм, так и фибрилл  $\alpha$ -синуклеина. Также гиперэкспрессия гена *SNCA* человека и его форм с мутациями у дрозофилы способствует изменению уровня экспрессии других синаптических генов, играющих ключевую роль в процессах синаптической передачи.

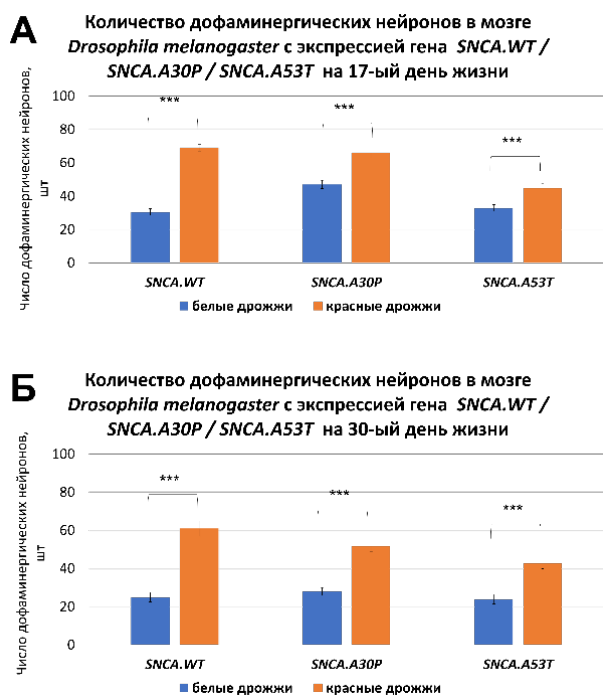
Таким образом, мы изучили фенотипические проявления запуска и подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. Проведение подобных исследований необходимо для понимания начала и прогрессирования патологических изменений при БП и других синуклеопатиях, а также для определения временных интервалов «терапевтических окон», когда развивающиеся дегенеративные изменения еще обратимы, а применяемая терапия наиболее эффективна.

### **3. Анализ нейропротекторной активности «красного пигмента» (КП) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на модели БП на *D. melanogaster***

Перспективной группой веществ, препятствующих образованию амилоидных фибрилл, являются производные имидазола. Одно из таких соединений – 5-фосфат-рибозил-аминоимидазол (АИР) лежит в основе полимера, образующегося в клетках дрожжей *S. cerevisiae* при мутациях в генах *ADE-1* и/или *ADE-2*, ответственных за биосинтез аденина и придающего колониям дрожжевых клеток характерный красный цвет, поэтому этот полимер получил название «красный пигмент» (КП).

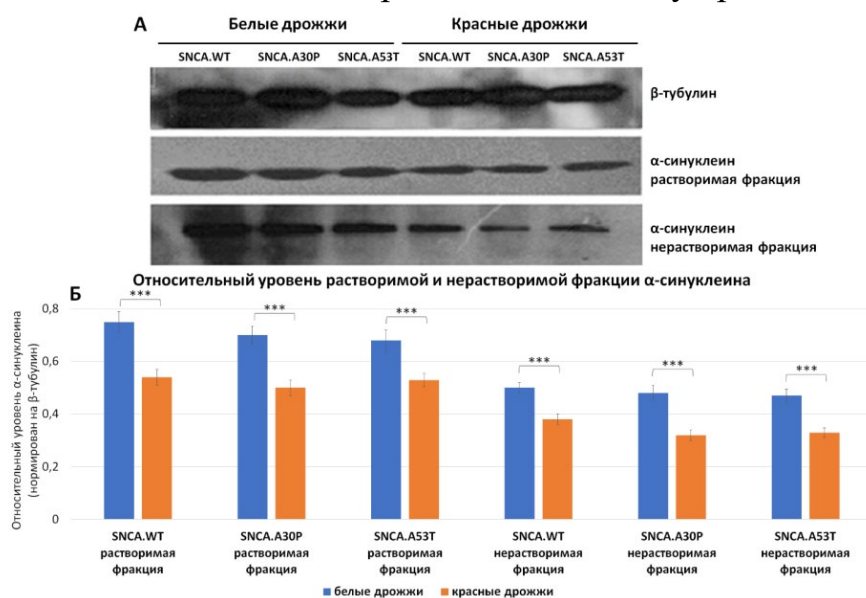
Для оценки потенциальной нейропротекторной активности «красного пигмента» особей трансгенных *D. melanogaster* с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* (для экспрессии трансгенов использовалась система *UAS-GAL4*) кормили красными или белыми дрожжами *S. cerevisiae*. Далее оценивались такие показатели как: число ДН и холинергических нейронов в мозге дрозофилы, уровень белка  $\alpha$ -синуклеина, а также уровень локомоторной активности мух.

В мозге трансгенных мух с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями наблюдалась возрастная потеря дофаминергических нейронов при получении в пищу белых дрожжей *S. cerevisiae*, в то время как при получении в пищу красных дрожжей количество дофаминергических нейронов сохранялось на более высоком уровне как на 17-ый, так и на 30-ый день жизни мух (Рисунок 8) [Nevzglyadova et al., 2018].



**Рисунок 8 – Число дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* при помощи системы *UAS-GAL4* на 17-ый (А) и 30-ый (Б) дни жизни. Мух кормили красными или белыми дрожжами *S. cerevisiae* в течение всего периода жизни. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n \geq 6$ ,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.**

КП способен связываться с амилоидами и, как предполагается, препятствовать образованию фибриллярных структур [Nevzglyadova et al., 2022]. В связи с предполагаемыми свойствами КП мы провели оценку уровня  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга трансгенных *D. melanogaster*. Мы проанализировали уровень растворимой и нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга трансгенных мух с экспрессией *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* при помощи системы *UAS-GAL4*, потребляющих в пищу красные или белые дрожжи.



**Рисунок 9 – Экспрессия *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* человека приводит к различному уровню накопления растворимой и нерастворимой формы  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга мух, при получении в пищу красных и белых дрожжей на 30-й день жизни.**

А – Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни растворимого и нерастворимого  $\alpha$ -синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Б – Гистограмма показывает снижение относительного уровня как растворимой, так и нерастворимой фракции белка  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга мух, при употреблении в пищу красных дрожжей по отношению к уровню  $\alpha$ -синуклеина, образовавшемуся у мух, получавших в пищу белые дрожжи. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\*\* $p < 0.001$ ,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.

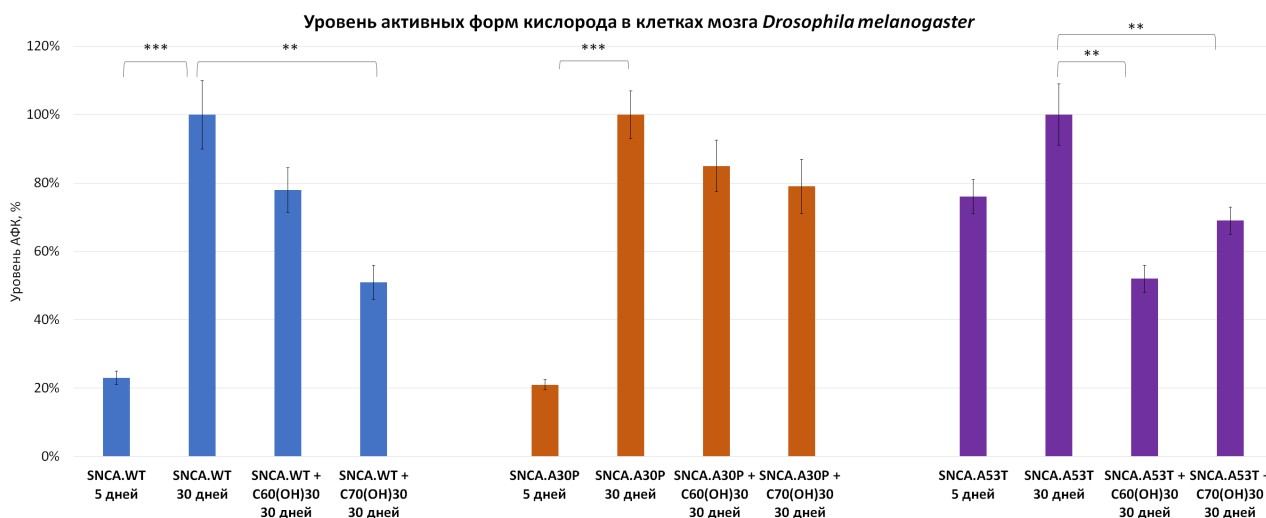
Показано, что у мух, употреблявших в пищу красные дрожжи был снижен уровень как нерастворимой, так и растворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина, по сравнению с уровнями  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга мух, употреблявших в пищу белые дрожжи (Рисунок 9) [Nevzglyadova et al., 2018].

Использование красных дрожжей в качестве корма трансгенных *D. melanogaster* с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*, позволило значительно замедлить развитие нейропатологии, что выражалось в сохранении большего числа дофаминергических нейронов, а также повышенной локомоторной активности у мух, употреблявших в пищу красные дрожжи.

#### 4. Исследование нейропротекторной активности фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на модели БП на *D. melanogaster*

Помимо образования агрегатов  $\alpha$ -синуклеина характерной чертой БП, как и многих других нейродегенеративных заболеваний, является нарушение активности митохондрий и повышение уровня окислительного стресса. Гидроксильированные производные фуллеренов – фуллеренолы имеют большие перспективы в качестве потенциальных терапевтических агентов, так как они обладают антиоксидантными свойствами благодаря способности поглощать и деактивировать кислородсодержащие свободные радикалы [Yamakoshi et al., 2003], при этом действуя более эффективно, чем традиционные антиоксиданты [Trajković et al., 2007].

Мы сравнили уровень АФК в клетках мозга мух с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* при добавлении в корм мух фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  на 30-ый день жизни (Рисунок 10).

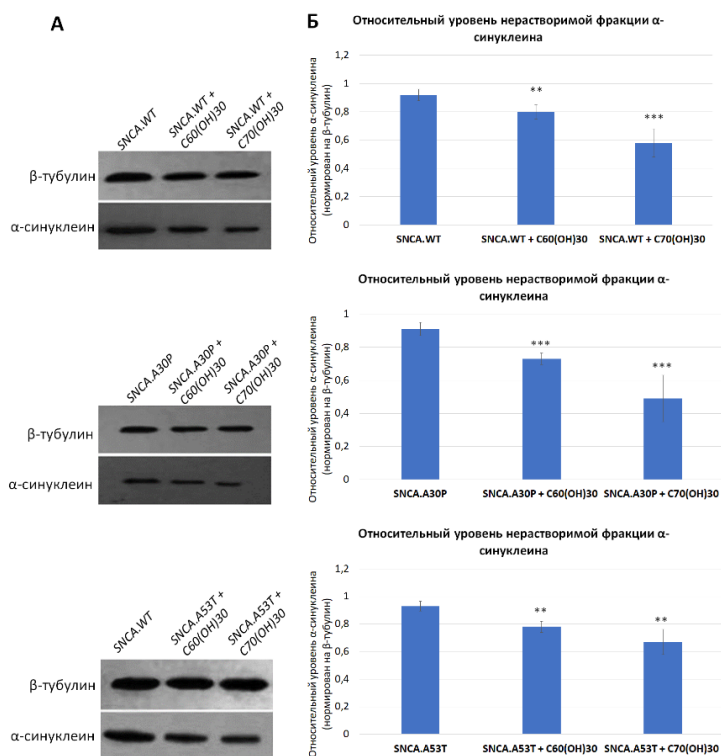


**Рисунок 10 – Уровень активных форм кислорода в клетках мозга *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* при добавлении в корм мух фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  на 5-ый и 30-ый день жизни. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ,  $N \geq 6$ , однофакторный дисперсионный анализ.**

Показано, что к 30 дню жизни мух, уровень АФК был повышен во всех исследуемых линиях, с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P*. Кроме того, стоит отметить, что у линии с экспрессией *SNCA* человека с мутацией A53T

уровень АФК был повышен уже на 5 день жизни, по сравнению с другими линиями, что может быть следствием наличия мутации в гене *SNCA* и ее влияния на активность  $\alpha$ -синуклеина и как следствие на уровень окислительного стресса в клетках мозга мух [Golomidov et al., 2020]. Содержание мух на среде, содержащей фуллеренолы, статистически значимо приводило к уменьшению уровня АФК у линии дрозофилы с экспрессией гена *SNCA* человека с мутацией A53T при использовании фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  и у линии с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа, однако только при использовании фуллеренола  $C_{70}(OH)_{30}$ . При этом мы не наблюдали статистически достоверных различий в уровне АФК у линии дрозофилы с экспрессией гена *SNCA.A30P* при использовании фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$ . Таким образом, мы показали, что в зависимости от того, какая форма *SNCA* человека (*SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P*) экспрессируется у дрозофилы, различается антиоксидантная способность фуллеренолов.

Однако, помимо своих антиоксидантных свойств фуллеренолы также способны препятствовать формированию агрегатов амилоидных белков, что было продемонстрировано в различных исследованиях при их взаимодействии с амилоидным пептидом  $\beta$ . Механизм, при помощи которого фуллерены препятствовали образованию амилоидных фибрилл заключался в установлении сильного гидрофобного взаимодействия между фуллереном и фенилаланином, которое в дальнейшем нарушало взаимодействие между аминокислотными остатками внутри пептида, необходимое для формирования  $\beta$ -слоев [Bolshakova et al., 2022b].



**Рисунок 11 – Относительный уровень нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* при добавлении в корм мух фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  на 30-ый день жизни. А – Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни нерастворимого  $\alpha$ -синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Б – Гистограмма показывает снижение относительного уровня нерастворимой фракции белка  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга мух, при добавлении в корм мух фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$ . Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ,  $N \geq 3$ ,**

однофакторный дисперсионный анализ.

$\alpha$ -синуклеин также относится к семейству амилоидных белков, что дает возможность предполагать, что применение фуллеренолов будет эффективно в отношении образования агрегатов  $\alpha$ -синуклеина различной структуры.

Мы провели вестерн-блот анализ нерастворимой фракции  $\alpha$ -синуклеина дикого типа и его форм с мутациями у мух с экспрессией *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* в течение 30 дней при добавлении в корм фуллеренолов  $C_{60}(OH)_{30}$  или  $C_{70}(OH)_{30}$  (Рисунок 11).

В том случае, если мухи на протяжении 30 дней получали вместе с пищей фуллеренолы, уровень нерастворимых форм  $\alpha$ -синуклеина в мозге был достоверно снижен относительно контроля, которым считали уровень нерастворимого  $\alpha$ -синуклеина в мозге мух, получавших обычную пищу [Golomidov et al., 2020].

## **5. Анализ нейропротекторных свойств фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на модели БГ на *D. melanogaster*.**

Носители мутаций в гене *GBA1* имеют повышенный риск развития БП. Поскольку данный фермент принимает активное участие в лизосомно-аутофагическом пути деградации различных белков, поддержание его функциональной активности является важным этапом регулирования метаболизма  $\alpha$ -синуклеина.

Ранее группой под руководством E. Sidransky был идентифицирован новый класс молекул – неингибирующих шаперонов [Patnaik et al., 2012]. Лидерное соединение из этого скрининга – N58, продемонстрировало эффективность при транспортировке глюкоцереброзидазы в лизосомы [Patnaik et al., 2012], а также восстановлению активности глюкоцереброзидазы в фибробластах у пациентов с болезнью Гоше [Aflaki et al., 2014].

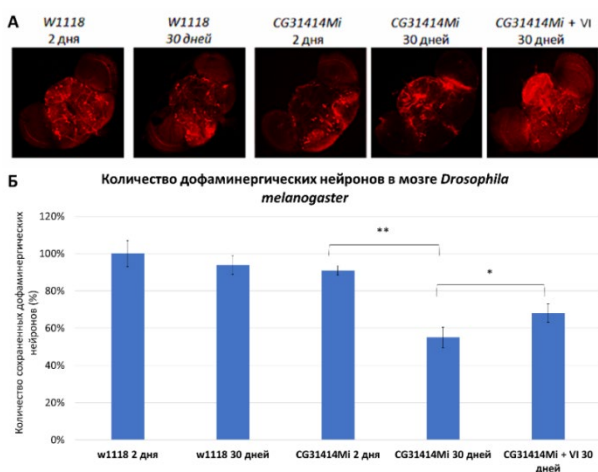
Сотрудниками лаборатории молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ (руководитель лаборатории д.б.н. С. Н. Пчелина) были предложены химические модификации соединения N58, направленные на повышение его растворимости в воде, за счёт уменьшения количества гидрофобных химических групп либо их замены на полярные группы. В лаборатории медицинской и биоорганической химии НИЦ «КИ» ПИЯФ, под руководством Ф. М. Ибатуллина, был синтезирован ряд веществ, являющихся производными N58. Данные соединения были исследованы на способность формировать стабильные комплексы с сайтом связывания GCase методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Соединение VI, которое представляет собой N-(1,2,3,6-тетрагидро-2,6-дикетопиримидин-4-ацетил)-4-метил анидид, показало наименьшую энергию связывания, а также наибольшее количество водородных связей, образуемых с GCase.

В качестве модели БГ использовали линию дрозофилы *CG31414Mi*, которая характеризуется прогрессирующей патологией, проявляющейся в снижении уровня локомоторной активности, сокращении продолжительности жизни, а также увеличением лизосомного сигнала в гемолимфе дрозофилы [Cabasso et al., 2019; Kawasaki et al., 2017].

Мы провели анализ количества дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster* линии *CG31414Mi* на 30-ый день жизни при добавлении в корм соединения VI в сравнении с линией *CG31414Mi*, в корм которой соединение VI не добавлялось, а также контрольной линией *w1118* (Рисунок 12).

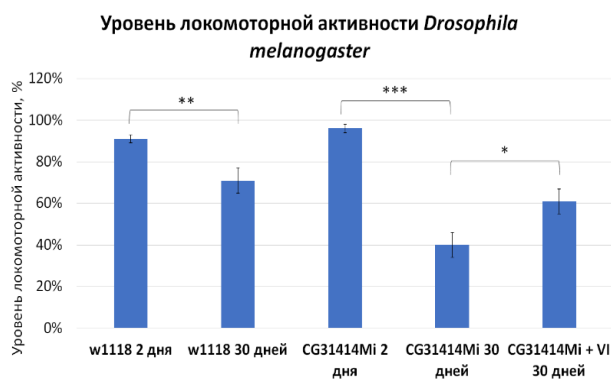
Мы показали, что у линии *D. melanogaster CG31414Mi* развивается нейродегенерация, характеризующаяся гибелью дофаминергических нейронов к 30-му дню жизни дрозофилы. При этом мы не наблюдали гибели дофаминергических нейронов в контрольной линии. Также можно отметить, что при добавлении в корм соединения VI к 30-му дню жизни у дрозофил линии *CG31414Mi* наблюдалось сохранение большего числа дофаминергических нейронов в сравнении с линией *CG31414Mi* не получавшей с кормом фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы.

Нарушение двигательной активности является одинаково важным маркером в моделях БГ, а также в моделях БП. Мы определили уровень двигательной активности *D. melanogaster CG31414Mi* при использовании соединения VI на 30-ый день жизни в сравнении с линией *CG31414Mi* не получающей с кормом данного соединения, а также с контрольной линией *w1118* (Рисунок 13).



**Рисунок 12 - Количество дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster*.** А – Конфокальные изображения спроецированной z-серии мозга линий *D. melanogaster w1118* и *CG31414Mi* на 2-ой и 30-ый дни жизни в отсутствии и при добавлении в корм соединения VI. Б – Общее количество дофаминергических нейронов в клетках мозга линий *D. melanogaster CG31414Mi* на 2-ой и 30-ый дни жизни в отсутствии и при добавлении в корм соединения VI. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ,  $n \geq 6$ ,  $N \geq 3$ , однофакторный дисперсионный анализ.

Показано, что уровень локомоторной активности у линии *D. melanogaster CG31414Mi* значительно снижен к 30-му дню по сравнению с контрольной линией *w1118*. При этом добавление в корм соединения VI способствует сохранению двигательной активности на более высоком уровне.



**Рисунок 13 – Уровень локомоторной активности *D. melanogaster CG31414Mi* при использовании соединения VI.** В качестве контроля использована линия *w1118*. Мухи содержались на стандартной дрожжевой среде в течение всей жизни. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $N \geq 6$ , однофакторный дисперсионный анализ.

Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать об эффективности новых фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы, которые в дальнейшем могут быть использованы для создания терапии при болезни Гоше.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Исходя из всех представленных данных можно сделать вывод о том, что нейродегенеративные процессы при БП начинаются на самом раннем этапе, о чем свидетельствует нарушение образования синаптических контактов, обусловленных экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. Мы изучили фенотипическое проявление гиперэкспрессии гена *SNCA* и его подавления. Проведение подобных исследований необходимо для понимания начала и прогрессирования патологических изменений при БП и других синуклеопатиях, а также для определения временных интервалов, когда развивающиеся дегенеративные изменения еще обратимы, а применяемая терапия наиболее эффективна.

На сегодняшний день уже становится очевидно, что лечение БП будет носить комплексный характер и включать несколько соединений, направленных на разные мишени, ответственные за развитие заболевания. В своей работе мы показали перспективность дальнейшего исследования производных имидазола, а также гидроксигированных форм фуллеренов в отношении замедления развития нейродегенерации.

### **ВЫВОДЫ**

1. Экспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями влияет на формирование синаптических контактов *D. melanogaster*, приводя к уменьшению количества сателлитных бутонов, площади нервно–мышечного контакта и числа митохондрий непосредственно в нервно–мышечном соединении.
2. Подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями замедляет развитие нейропатологии. Наличие растворимых форм  $\alpha$ -синуклеина ассоциировано с усилением нейродегенеративных процессов.
3. «Красный пигмент» дрожжей *S. cerevisiae* замедляет развитие патологического процесса, вызванного экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на модели болезни Паркинсона на *D. melanogaster*.
4. Фуллеренолы  $C_{60}(OH)_{30}$  и  $C_{70}(OH)_{30}$  обладают нейропротекторной и антиоксидантной активностью и способствуют замедлению развития нейродегенерации на модели болезни Паркинсона на *D. melanogaster*.
5. Фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы, относящиеся к классу аллостерических активаторов, обладают нейропротекторными свойствами на модели болезни Гоше на *D. melanogaster*.

### **Список публикаций по теме диссертации (из перечня рекомендуемых ВАК)**

1. Golomidov I. M., Latypova E. M., Ryabova E. V., Bolshakova O. I., Komissarov A. E., Sarantseva S. V. Reduction of the  $\alpha$ -synuclein expression promotes slowing



down early neuropathology development in the *Drosophila* model of Parkinson's disease // *J. Neurogenet.* 2022. № 36 (1). P. 1 – 10.

2. Golomidov I., Bolshakova O., Komissarov A., Sharoyko V., Slepneva E., Slobodina A., Latypova E., Zherybyateva O., Tennikova T., Sarantseva S. The neuroprotective effect of fullerenols on a model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. № 523 (2). P. 446 – 451.

3. Bolshakova O., Borisenkova A., Suyasova M., Sedov V., Slobodina A., Timoshenko S., Varfolomeeva E., Golomidov I., Lebedev V., Aksenov V., Sarantseva S. In vitro and in vivo study of the toxicity of fullerenols C60, C70 and C120O obtained by an original two step method// *Materials Science & Engineering C.* 2019. №. 104. P. 109945.

4. Nevzglyadova O. V., Mikhailova E. V., Artemov A. V., Ozerova Y. E., Ivanova P. A., Golomidov I. M., Bolshakova O. I., Zenin V. V., Kostyleva E. I., Soidla T. R., Sarantseva S. V. Yeast red pigment modifies cloned human  $\alpha$ -synuclein pathogenesis in Parkinson disease models in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster* // *Neurochemistry international.* 2018. №. 120. P. 172 – 181.

#### **Список прочих публикаций по теме диссертации:**

1. Schuvalova P., Ryabova E., Golomidov I., Bolshakova O., Sarantseva S. Overexpression of human SNCA gene in *Drosophila* motor neurons causes morphological and functional abnormalities in larval neuromuscular junction // *Visnyk of the Lviv Univ. Series Biology.* 2014. №. 66. P. 105 – 111.

#### **Тезисы докладов**

1. Голомидов И. М., Большакова О. И., Рябова Е. В., Саранцева С. В. Изучение эффектов гиперэкспрессии гена  $\alpha$ -синуклеина человека на модели *Drosophila melanogaster* // Международная конференция «Дрозофила в генетике и медицине» – 2020 – С. 13.

2. Golomidov Ilya M., Bolshakova Olga I., Emelyanov Anton K., Sarantseva Svetlana V. Analysis of neuroprotective properties of pharmacological glucocerebrosidase chaperones on the *Drosophila melanogaster* model // XVI International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology» – 2020 – P. 151 – 152.

3. Голомидов И. М., Латыпова Е. М., Большакова О. И., Тимошенко С. И., Саранцева С. В. Эффекты гиперэкспрессии гена альфа-синуклеина человека на модели *Drosophila melanogaster* // Международный конгресс «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» – 2019 – С. 738.

4. Bolshakova O. I., Golomidov I. M., Timoshenko S. I., Sarantseva S. V. New data on the biological effects of fullerenols // XIV International interdisciplinary congress «Neuroscience for medicine and psychology» – 2018 – P. 116.

5. Golomidov I. M., Bolshakova O. I., Timoshenko S. I., Sarantseva S. V. The influence of the red pigment from yeast on the levels of soluble and insoluble forms of alpha-synuclein and on the level of neurodegeneration in the cells of *Drosophila melanogaster* brain // XIV International interdisciplinary congress «Neuroscience for medicine and psychology» – 2018 – P. 160.

6. Голомидов И. М., Большакова О. И., Тимошенко С. И., Саранцева С. В. Влияние красного пигмента дрожжей на уровень отложений альфа-синуклеина и общий уровень нейродегенерации // Всероссийская конференция «Дрозофила в генетике и медицине» – 2017 – С. 66.
7. Саранцева С. В., Голомидов И. М., Большакова О. И., Тимошенко С. И. Подавление экспрессии гена альфа-синуклеина человека в мозге *Drosophila melanogaster* супрессирует развитие нейропатологии, характерной для болезни Паркинсона // Всероссийская конференция «Дрозофила в генетике и медицине» – 2017 – С. 40.
8. Голомидов И. М., Еронько О. Н., Саранцева С. В. Влияние экспрессии гена альфа-синуклеина человека на развитие нейропатологии, характерной для болезни Паркинсона, на модели *Drosophila melanogaster* // VI научно-техническая конференция «Неделя науки – 2016» СПбГТИ(ТУ) – 2016– С. 282.
9. Голомидов И. М., Рябова Е. В., Шувалова П. К., Мелентьев П. А., Саранцева С. В. Влияние экспрессии гена альфа-синуклеина человека и его мутантных форм на число дофаминергических нейронов в клетках мозга *Drosophila melanogaster* // VI научно-техническая конференция «Неделя науки – 2016» СПбГТИ(ТУ) – 2016 – С. 160.
10. Голомидов И. М., Мелентьев П. А., Саранцева С. В. Изучение функций гена альфа-синуклеина человека на модели *Drosophila melanogaster* // Научная конференция, посвященная 187-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного Технологического института, СПбГТИ(ТУ) – 2015 – С. 119.
11. Саранцева С. В., Голомидов И. М., Слепнева Е. Э. Подавление экспрессии гена альфа-синуклеина человека в мозге *Drosophila melanogaster* супрессирует развитие нейропатологии, характерной для болезни Паркинсона // XI Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» – 2015 – С. 338-339.
12. Голомидов И. М., Мелентьев П. А., Саранцева С. В. Изучение механизмов нейродегенеративных процессов при болезни Паркинсона на модели *Drosophila melanogaster* // XIII Курчатовская молодежная научная школа – 2015– С. 56.
13. Мелентьев П. А., Голомидов И. М., Саранцева С. В. Использование трансгенных *Drosophila melanogaster* для моделирования патологических изменений функционирования нейронов мозга, сопровождающих болезнь Паркинсона // 2 международный симпозиум, посвященный дню ДНК «Современные биотехнологии для науки и практики» – 2015 – С. 24 – 25.
14. Melentev P., Golomidov I., Sarantseva S. Suppression of *SNCA* expression in the brain arrested pathology progression in drosophila models of familial and sporadic PD // Neurodegenerative Diseases № 15 (1) – 2015 – P. 1409.
15. Голомидов И. М., Саранцева С. В. Анализ экспрессии пресинаптических генов в мозге *Drosophila melanogaster* с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека // 18-ая Международная Пущинская школа-конференция «Биология - наука XXI века» – 2014 – С. 246.