

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого  
Институт биомедицинских систем и биотехнологий

Работа допущена к защите

Директор ВШБСиТ

\_\_\_\_\_ О.Л. Власова

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА**

**ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА ЕВЗ ПРЕДОТВРАЩАЕТ  
ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СИНАПСАХ  
ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ  
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

по направлению 16.03.01 Техническая физика

по образовательной программе 16.03.01\_06 Медицинская и биоинженерная  
физика

Выполнила  
студентка гр. 4731601/60602

А.В. Раковская

Научный руководитель  
профессор ВШБСиТ ИБСиБ, д.б.н.

И.Б. Безпрозванный

Научный консультант  
научный сотрудник лаборатории молекулярной  
нейродегенерации СПбПУ, к.ф.-м.н.

Е.И. Пчицкая

Консультант по нормконтролю  
доцент ВШБСиТ ИБСиБ, к.т.н.

В.П. Октябрьский

Санкт-Петербург

2020

## РЕФЕРАТ

На 45 с., 6 рисунков, 1 таблица

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** болезнь Альцгеймера, амилоидная токсичность, гиппокамп, динамические микротрубочки, дендритные шипики, EB3, PSD-95.

Белок EB3 крепится к положительному концу растущих нейрональных микротрубочек и регулирует их динамику. Гиперэкспрессия EB3 вызывает значительное увеличение числа дендритных шипиков грибовидного типа в первичных гиппокампальных нейронах. В работе рассмотрено нейропротекторное влияние белка EB3 на гиппокампальные нейроны в условиях низкой амилоидной токсичности, моделирующей болезнь Альцгеймера. Кластеризация белка PSD-95 связана со стабильностью дендритных шипиков. Автором разработан методический подход для анализа плотности и размеров кластеров белка PSD-95 в дендритах нейронов с применением локальной бинаризации после коррекции фона и устранения шума на конфокальных изображениях. Показано, что гиперэкспрессия белка EB3 вызывает увеличение ширины головки грибовидных шипиков нейронов и плотности кластеров белка PSD-95 в дендритах в сравнении с контрольной группой, но не изменяет их размер. Вирус-опосредованный нокадаун белка EB3 приводит к значительному уменьшению плотности и размера кластеров постсинаптического белка PSD-95. Вирус-опосредованная гиперэкспрессия белка EB3 при добавлении токсичных для нейронов олигомерных форм бета-амилоида предотвращает снижение плотности и ширины головки дендритных шипиков, а также снижение плотности кластеров белка PSD-95. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что белок EB3 крайне важен для стабилизации постсинаптических контактов в норме и снижает дегенеративное проявления в нейронах в условиях низкой амилоидной токсичности.

## ABSTRACT

P. 45 Fig. 6 Tabl. 1

Key words: Alzheimer's disease, amyloid toxicity, hippocampus, dynamic microtubules, dendritic spines, EB3, PSD-95.

The EB3 protein fastens to the positive end of growing neuronal microtubules and regulates their dynamics. It is known that hyperexpression of EB3 protein leads to a significant increase in mushroom spines to the dominant fraction in primary hippocampal neurons.

This study examines the neuroprotective influence of EB3 protein on hippocampal neurons under conditions of low amyloid toxicity modeling Alzheimer's disease.

PSD-95 protein clustering is connected with the stability of dendritic spines.

The author developed a methodological approach to analyze the density and size of the PSD-95 protein clusters in neuronal dendrites using local binarization when the background correction and noise elimination in confocal images had been made. It was shown that overexpression of EB3 protein causes an increase in the head width of neuronal mushroom-shaped spines and the density of PSD-95 protein clusters in dendrites compared with the control group, although it does not change their size.

Virus-mediated knockdown of EB3 protein leads to a significant reduction in the density and cluster size of the postsynaptic PSD-95 protein.

Virus-mediated overexpression of EB3 protein prevents a decrease in the density and width of dendritic spines heads, as well as a decrease in the density of PSD-95 protein clusters, while toxic for neurons oligomeric forms of beta-amyloid are added.

Due to results of the current study the hypothesis was confirmed. The EB3 protein is extremely important for postsynaptic contacts stabilization in normal conditions. The EB3 protein reduces the degenerative manifestations in neurons under conditions of low amyloid toxicity.

## Содержание

Список сокращений .....	6
Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Дегенеративные изменения в нейронах при Болезни Альцгеймера .....	12
1.2. Динамические микротрубочки и плюс-концевые белки в нейронах .....	15
1.3 Семейство белков EB.....	19
Глава 2. Материалы и методы.....	23
2.1. Выделение первичной нейрональной культуры гиппокампа.....	23
2.2. Ведение первичной гиппокампальной культуры .....	24
2.3. Ведение клеточной линии НЕК 293Т .....	24
2.4. Кальций-фосфатная трансфекция первичных гиппокампальных нейронов .....	24
2.5. Сборка лентивирусных частиц .....	25
2.6. Вестерн-блот анализ .....	25
2.7. Приготовление A $\beta$ 42 олигомеров .....	26
2.8. Иммуноцитохимическое окрашивание.....	27
2.9. Конфокальная микроскопия .....	27
2.10. Изучение морфологии дендритных шипиков нейронов .....	28
2.11. Анализ распределения постсинаптического белка PSD-95.....	28
2.12. Статистический анализ.....	28
Глава 3. Результаты.....	30
3.1. Проверка эффективности вирусной трансдукции в первичной нейрональной гиппокампальной культуры.....	30

3.2. Влияние вирус-опосредованной гиперэкспрессии и нокдауна белков EB3 на плотность и размер кластеров белка PSD-95 в дендритах первичных гиппокампальных нейронов.....	31
3.3 Влияние вирус-опосредованной гиперэкспрессии белков EB3 в условиях низкой амилоидной токсичности на плотность и размер кластеров белка PSD-95 в дендритах первичных гиппокампальных нейронов .....	32
3.4 Влияние гиперэкспрессии белка EB3 на морфологию дендритных шипиков в условиях низкой амилоидной токсичности .....	34
Заключение .....	36
Выводы. ....	37
Список используемых источников.....	38

## Список сокращений

APP — белок предшественник амилоида

A $\beta$  — бета-амилоид

A $\beta$ 42 — бета-амилоид, который состоит из 42 аминокислотных остатков

C83 — фрагмент APP, образующийся при делении APP  $\alpha$ -секретазой

C99 — фрагмент APP, образующийся при делении APP  $\beta$ -секретазой

Ca<sup>2+</sup> — ион кальция

FBS — инактивированная эмбриональная бычья сыворотка

EB — End-binding protein

IP3R — рецептор инозитол 1,4,5- трифосфата

MAP2 — ассоциированный с микротрубочками белок 2 типа

p — уровень статистической значимости

PBS — фосфатно-солевой буфер

pH — водородный показатель

PSD-95 — белок постсинаптической плотности 95

sAPP $\alpha$  — эктодомен APP, образующийся при делении APP  $\alpha$ -секретазой

sAPP $\beta$  — эктодомен APP, образующийся при делении APP  $\beta$ -секретазой

STIM1/2 — стромальная молекула межклеточного взаимодействия 1/2 типа

TBST — буфер, содержащий трис, SDS, NaCl и Tween.

+TIPs — белки, ассоциированные с положительным (растущим) концом микротрубочки

TEMED — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

Tris — трис или трис(гидроксиметил)аминометан

Tris-HCl — трис(гидроксиметил)аминометан с добавлением соляной кислоты

Tween — полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат

БА — болезнь Альцгеймера

БСА — бычий сывороточный альбумин

ГТФ — гуанозинтрифосфат

ГДФ — гуанозиндифосфат

МВ — молекулярный вес

МТ — микротрубочки

ПФ — протофиломенты

ЭР — эндоплазматический ретикулум

## Введение

### Актуальность исследования

Множество нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезнь Альцгеймера (БА), характеризуются нарушением в формировании синаптических контактов или потерей их стабильности. Специализированные мембранные выросты – дендритные шипики, формирующие контакт между аксоном и дендритом, подвергаются постоянному изменению в форме и плотности. Ранее считалось, что цитоскелет дендритных шипиков представлен исключительно актином, а тубулин участвует лишь в формировании дендритов и аксонов. Недавно было показано, что динамические тубулиновые микротрубочки способны временно проникать в дендритный шипик, регулируя синаптическую пластичность [36]. Однако в настоящее время данное явление изучено недостаточно, поэтому проведение исследований в данном направлении крайне актуальны.

Плюс-концевой белок end-binding protein 3 (EB3) крепится к положительному концу нейрональных тубулиновых микротрубочек. Нейропротекторная функция EB3 продемонстрирована только на одной мышинной линии PS1-M146V-KI [56], моделирующей БА. Данная линия характеризуется экспрессией белка Пресенилина 1 с мутацией характерной для наследственной формы данного заболевания, а также отсутствием выраженного накопления бета-амилоида в головном мозгу грызунов.

Для подтверждения нейропротекторного потенциала белка EB3 необходимо оценить влияние данного белка также в условиях низкой амилоидной токсичности, моделирующей болезнь Альцгеймера. БА является одной из самых распространенных форм деменции, которая поражает пожилых людей. Однако на сегодняшний день данное заболевание считается неизлечимым, поэтому исследования в данной области необходимы для разработки эффективной терапии, предотвращающей дегенеративные изменения в синапсах.

### Объект и предмет исследования

В данной работе рассмотрено влияние белка EB3 на морфологию дендритных шипиков в условиях амилоидной токсичности на первичной нейрональной гиппокампальной культуре.

### Теоретическая и методологическая база исследования

При написании выпускной квалификационной работы были использованы российские и зарубежные источники по соответствующей тематике. Исследования производились с использованием материалов и методов, применяющихся в Лаборатории молекулярной нейродегенерации СПбПУ. В ходе работы были освоены следующие методы: культивирование диссоциированных нейронов гиппокампа мышей, ведение клеточной линии НЕК293Т, сборка лентивирусов, Вестерн-блот анализ, иммуоцитохимический анализ, выделение плазмидной ДНК, кальций-фосфатная трансфекция нейронов, конфокальная микроскопия, анализ морфологии дендритных шипиков в программном обеспечении NeuronStudio, деконволюция конфокальных изображений, бинаризация изображений, анализ размера и плотности кластеров в программном обеспечении Synpanal.

### Степень научной разработанности проблемы

Снижение плотности дендритных шипиков продемонстрировано в различных мышинных моделях, таких как PS1-M146V-KI [56], APP-KI [75], APPPS1 [57]. Однако, влияние белка EB3 на морфологические параметры рассмотрено только на мышцах линии PS1-M146V-KI. Данная трансгенная линия характеризуется мутацией M146V в белке Пресенилине 1, однако в нейронах мышей линии PS1-M146V-KI не происходит характерное для БА накопление бета-амилоида [56].

EB3 взаимодействует также с белком постсинаптической плотности 95 (PSD-95, Postsynaptic density protein-95), способствуя модуляции динамики МТ во время образования дендритов [69]. PSD-95 является маркерным белком для постсинаптической плотности, которая состоит из большого количества рецепторов, регуляторных белков и молекул, принимающие участие в синаптической передаче. Впервые рассмотрено влияние гиперэкспрессии и

нокдауна EB3 на плотность и размер кластеров белка PSD-95 в дендритах гиппокампальных нейронов в норме и в условиях амилоидной токсичности.

#### Научная новизна и практическая значимость

В данной работе исследуется влияние белка EB3 на гиппокампальные нейроны в норме и при воздействии олигомерами бета-амилоида в низкой концентрации. Ранее подобные исследования не проводились, и полученные результаты позволяют сделать предположения о роли динамических тубулиновых микротрубочек в функционировании нейронов. Произведение оценки нейропротекторного потенциала белка EB3 позволит разработать новые механизмы и мишени для предотвращения дегенеративных изменений в гиппокампальных нейронах при БА, ассоциированных с (=являющихся причиной) прогрессирующей потерей памяти у пациентов.

На основе полученных результатов, можно предположить о перспективности использования белка EB3 в качестве возможной терапевтической мишени для создания лечения БА.

#### Цель и задачи исследования

Цель исследования – изучить влияние гиперэкспрессии и нокдауна белка EB3 на гиппокампальные нейроны в норме и на клеточной модели болезни Альцгеймера.

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Осуществить сборку вирусов для гиперэкспрессии и нокдауна белка EB3 и определить их оптимальную концентрацию для воздействия на первичные гиппокампальные нейроны;
2. Разработать методический подход для анализа плотности и размера кластеров белка PSD-95 в дендритах нейронов;
3. Оценить влияние вирус-опосредованной гиперэкспрессии и нокдауна белка EB3 на плотность и размер кластеров постсинаптического белка PSD-95 в дендритах первичных гиппокампальных нейронов в норме и в условиях низкой амилоидной токсичности;

4. Изучить влияние гиперэкспрессии и нокдауна белка EV3 на плотность дендритных шипиков и ширину их головки в норме и в условиях низкой амилоидной токсичности.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Дегенеративные изменения в нейронах при болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется накоплением внеклеточных бета-амилоидных (A $\beta$ ) бляшек и интранейрональных тау-содержащих нейрофибриллярных клубков в головном мозге [28].

Амилоидный белок-предшественник (APP, amyloid precursor protein) содержится во многих тканях и органах, включая головной и спинной мозг. Предполагается, что он играет роль в росте клеток, образовании новых синапсов, дифференцировке нейронов, адгезии клеток, метаболизме кальция и транспорте белка [16]. Длина белка APP варьируется от 695 до 770 аминокислот. Расщепление APP приводит к образованию A $\beta$ , пептида из 39-42 аминокислот. A $\beta$  – основной компонент амилоидных бляшек, обнаруженных в мозге пациентов с диагностированной БА [72]. APP может расщепляться неамилоидогенным путем или токсичным амилоидогенным путем, в ходе которого образуется A $\beta$  (Рисунок 1.1).

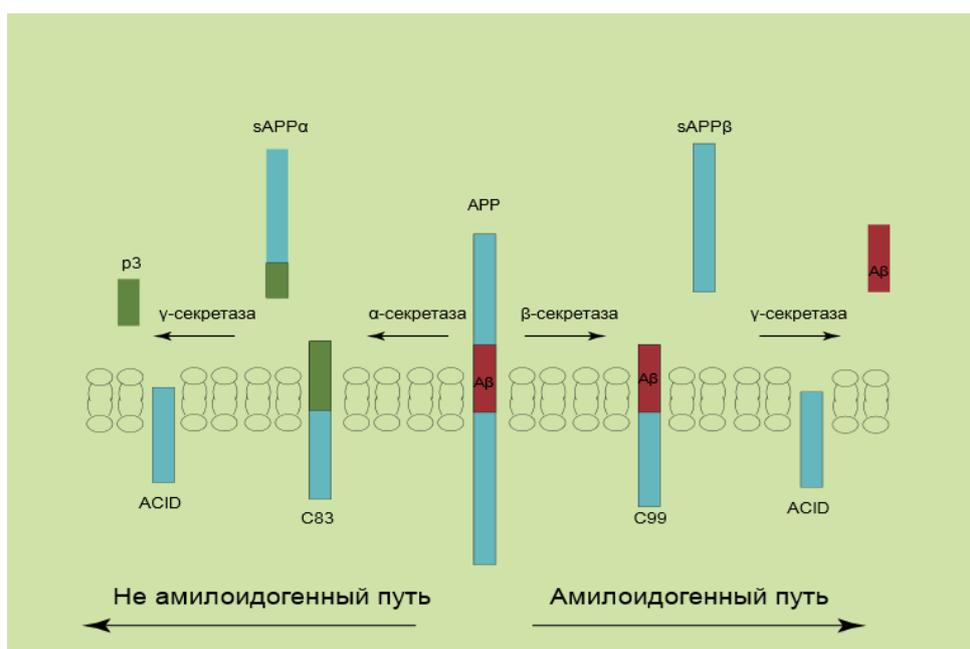


Рисунок 1.1 - Протеолиз APP. Адаптировано из [86].

В неамилоидогенном пути APP расщепляется ферментом  $\alpha$ -секретазой, а затем  $\gamma$ -секретазой. Расщепление  $\alpha$ -секретазой происходит внутри домена A $\beta$  (у связи Lys16-Leu17). Расщепление  $\alpha$ -секретазой высвобождает внеклеточный секретлируемый  $\alpha$ -фрагмент APP, называемый sAPP $\alpha$  [65]. В отличие от A $\beta$ , sAPP $\alpha$  играет важную роль в выживаемости нейронов и защищает их от эксайтотоксичности [21, 43]. sAPP $\alpha$  также регулирует пролиферацию нервных стволовых клеток и важен для раннего развития центральной нервной системы [7, 55]. Оставшийся C-концевой фрагмент (C83) APP затем подвергается либо деградации лизосомами, либо расщеплению  $\gamma$ -секретазой, что приводит к образованию бляшек p3 (молекулярная масса равна 3 кДа) и внутриклеточного домена APP (AICD) [70].

Амилоидогенный путь расщепления APP главным образом характерен для нейрональных клеток. В рамках этого пути APP подвергается последовательному воздействию ферментами  $\beta$ -секретазой (фермент расщепления APP  $\beta$ -сайта) и  $\gamma$ -секретазой. В результате расщепления APP с участием  $\beta$ -секретазы образуется мембранный связанный C-концевой фрагмент C99, который затем обрабатывается  $\gamma$ -секретазой с образованием A $\beta$  [14]. Сайт расщепления  $\gamma$ -секретазой внутри трансмембранного домена APP варьируется, в результате чего продуцируемые A $\beta$  имеют различную длину от 39 до 42 аминокислот. После производства A $\beta$  обычно секретруется во внеклеточное пространство посредством экзоцитоза [71]. A $\beta$  является основным компонентом сенильных бляшек, которые обнаруживаются внеклеточно при болезни Альцгеймера. A $\beta$ 42 агрегирует быстрее, чем другие изоформы, образуя кластеры и фибриллы [12]. У людей с БА повышенные концентрации бета-амилоидных бляшек могут привести к клеточным дисфункциям. Наличие бляшек A $\beta$  является недостаточным условием для постановки диагноза БА, так как такие бляшки имеются также и у многих людей без снижения когнитивных функций [58].

Мутации в гене APP, его дупликация или мутации в генах, кодирующих расщепляющие APP ферменты пресенилины 1 или 2, которые являются

каталитической субъединицей  $\gamma$ -секретазного комплекса, приводят к развитию наследственной формы БА [72]. При БА потеря нейронов происходит в определенных областях коры и подкорковых ядрах [18], например, в СА1 зоне гиппокампа [40]. Количество нейронов в СА1 области снижается по мере развития заболевания [33]. Потеря синапсов и уменьшение плотности дендритных шипиков наблюдается также вдоль дендритов в трансэнториальной коре [17]. Предполагается, что потеря памяти при БА связана с уменьшением числа грибовидных шипиков [78]. В пользу данного утверждения свидетельствуют результаты полученных в ряде исследований на мышинных моделях БА PS1-M146V-KI [68], APP-KI [75], APPPS1 [57], в условиях низкой амилоидной токсичности *in vitro* и *in vivo* [59], где было обнаружено снижение числа грибовидных шипиков в гиппокампе.

Формирование агрегатов А $\beta$  предшествует образованию нейрофибриллярных клубков из гиперфосфорилированного белка тау, который оказывает токсическое влияние на нейроны [49]. Тау принадлежит к семейству белков, ассоциированных с микротрубочками, и выполняет несколько физиологических функций в здоровых аксонах, включая сборку микротрубочек и их стабилизацию, транспорт, рост и полярность нейронов [62]. При БА белок тау гиперфосфорилируется, вызывая нарушение нейронального транспорта и последующую гибель нейрона. [64]. Тау фосфорилирование представляет собой добавление фосфата к белку с помощью ферментов киназ [3]. В здоровом мозге человека на один моль тау приходится два-три моля фосфата для выполнения его нормальных биологических функций. Когда тау становится гиперфосфорилированным, отношение фосфата к тау увеличивается в три-четыре раза по сравнению с нормальными уровнями фосфорилирования [35]. Увеличенное количество фосфата изменяет функцию тау, в результате чего данный белок становится нерастворимым [34] и снижается его сродство к микротрубочкам.

Резюмируя выше сказанное, при БА сначала образуются амилоидные фибриллы, из-за которых нарушается функционирование нервных клеток, а позже происходит формирование нейрофибриллярных клубков. Два этих процесса приводят к дегенерации и гибели нейронов, главным образом, в таких структурах мозга, как кора и гиппокамп.

## 1.2. Динамические микротрубочки и плюс-концевые белки в нейронах

Микротрубочки (МТ) являются одним из основных компонентов цитоскелета, присутствующих во всех типах эукариотических клеток, в том числе нейрональных. Они состоят из гетеродимеров  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина, которые связываются с образованием 13 поляризованных линейных протофиламентов (ПФ), латерально связанных друг с другом для создания МТ (Рисунок 1.2 А)[1].

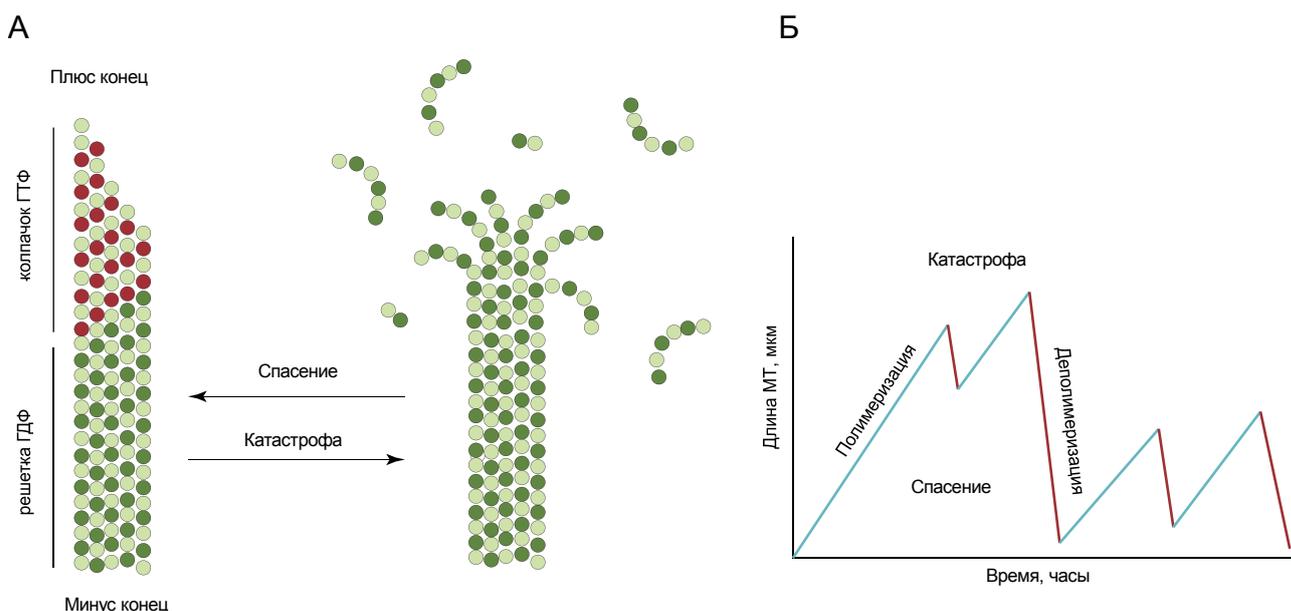


Рисунок 1.2 – Динамическая нестабильность микротрубочек. Адаптировано из [1]

МТ являются чрезвычайно динамичными структурами, существующими либо в растущем состоянии (полимеризация), либо в усадочном состоянии (деполимеризация). МТ могут быстро переключаться между этими двумя состояниями, переходя от роста к деполимеризации (катастрофа) или наоборот (спасение) (Рисунок 1.2 Б). Данный процесс называется динамическая нестабильность [10].

Динамическая нестабильность включает в себя основные этапы:

Растворимый тубулин связывается с ГТФ (гуанозинтрифосфат).  $\alpha$ -субъединица связывает ГТФ без гидролиза или обмена. Обмениваемый ГТФ на  $\beta$ -субъединице гидролизуется и быстро высвобождает свой фосфат после полимеризации [63].

- Сборка способствует гидролизу ГТФ, связанного с субъединицами. Это происходит потому, что входящая субъединица функционирует как GAP (белок, активирующий ГТФазу) для субъединицы, дополняя ее нуклеотидно-активный сайт [53].

- ГТФ-тубулин собирается в микротрубочки, при условии, что концентрация свободного тубулина достаточно высока (т.е. выше критической концентрации). ГДФ - тубулин будет собираться в цепочки, не длиннее олигомеров.

- Растущие микротрубочки имеют слегка изогнутые ПФ и / или листообразные удлинения на своих кончиках [13], а деполимеризующиеся микротрубочки имеют на своих кончиках сильно закрученные ПФ, которые, по-видимому, отслаиваются от микротрубочек. Изолированный ГДФ - тубулин может образовывать кольца, похожие на кольца ПФ.

- ГТФ-тубулин и ГДФ-тубулин имеют изогнутую конформацию, но ГТФ-тубулин способен изменить свое положение, а именно выстроиться вдоль прямой. Предполагается, что изгиб происходит как внутри, так и между субъединицами [6].

- Микротрубочки, собранные из медленно гидролизующего ГТФ-подобного аналога GMPCPP, полимеризуются как нормальные, но деполимеризуются гораздо медленнее. Это наглядно демонстрирует, что энергия ГТФ используется для разрушения микротрубочки, а не для ее создания.

- После того, как новая субъединица добавляет к растущему концу МТ, короткая задержка в гидролизе и высвобождении фосфата приводит к обогащению ГТФ области (ГТФ cap3) на растущем конце, тогда как более старые

части микротрубочки в основном состоят из ГДФ-тубулина (этот регион иногда называют «решеткой ГДФ») (рис. 1.2 А).

- Гидролиз ГТФ способствует деполимеризации, по крайней мере, двумя способами: во-первых, ГДФ - тубулин в решетке микротрубочек находится в состоянии деформации, поскольку он вынужден находиться в неблагоприятной прямой конформации. Этот тип эффективно ослабляет и без того слабые боковые связи между ПФ [76]. Кроме того, конформационные изменения, связанные с гидролизом и потерей фосфатов, ослабляют продольную связь [60][76]. С помощью криоэлектронной микроскопии было показано, что боковые контакты решетки ГТФ и ГДФ похожи: гидролиз ГТФ еще больше ослабляет боковые связи, увеличивая нагрузку на эти связи [76].

- Когда присутствует колпачок ГТФ (до тех пор, пока новый ГТФ-тубулин добавляется в кончик быстрее, чем он теряется в результате диссоциации и / или гидролиза), его относительно прочные боковые связи сохраняют трубчатую структуру и позволяют продолжить полимеризацию. Однако, если ГТФ-шапочка потеряна, происходит так называемая катастрофа: ГДФ-тубулин открыт, ПФ расходятся, когда субъединицы ГДФ принимают свою предпочтительную изогнутую конформацию, и микротрубочки быстро деполимеризуются.

- Согласно этой модели, решетка ГДФ под колпачком ГТФ хранит энергию гидролиза ГТФ, позволяя деполимеризующейся микротрубочке выполнять свои функции [26] [47].

Однако в нейронах тубулиновые МТ отличаются большей стабильностью в сравнении с соматическими клетками, позволяя поддерживать определенную форму их отростков [78]. Раньше считалось, что тубулин является основным составляющим цитоскелета аксонов и дендритов. Однако недавно с помощью прижизненной микроскопии был детектирован вход динамических микротрубочек в дендритные шипики [46]. Для полимеризации МТ в шипик требуется как повышение концентрации кальция в головке и шейке шипика, так и присутствие актина для дальнейшей полимеризации [46]. Следовательно, МТ,

по-видимому, преимущественно входят в шипики, которые подвергаются зависимым от активности изменениям, а не полимеризуются в небольшую группу шипиков случайным образом.

Динамическая МТ после проникновения в шипик, находится в нем в течение несколько минут, после чего деполимеризуется [30]. Кроме того, МТ входят в дендритные шипики различной формы, в том числе грибовидные, тонкие и пеньковые, а также филоподии [27, 30, 31]. С помощью электронной микрофотографии было продемонстрировано, что МТ могут проникать в шипики с помощью актиновых филаментов [36]. Хотя МТ могут полимеризоваться вдоль нитей актина, взаимодействие этих двух компонентов клеточного цитоскелета маловероятно является непосредственным, а скорее всего происходит через множество различных актин- и МТ-ассоциированных белков [15][8].

+TIPs – это белки, которые связываются с растущим плюс-концом МТ, где они регулируют динамику МТ, а также облегчают их взаимодействие с другими белками, органеллами и актином [1]. Было обнаружено, что многие белки из семейства + TIP имеют решающее значение для различных процессов развития нервной системы, особенно во время расширения нейритов и разрастания аксонов. Например, белок аденоматозного полипоза кишечника (APC, Adenomatous Polyposis Coli) широко экспрессируемый в нервных клетках, играет важную роль в установлении нейрональной полярности, а также помогает в миграции и перемещении аксонов путем стабилизации МТ [19]. Цитоплазматические линкерные белки (CLIP) представляют собой еще одну группу + TIP белков, которые участвуют в нескольких нервных процессах развития, включая образование и разрастание аксонов, а также дендритное ветвление [73]. CLIP присутствуют в конусах роста аксонов, где они стабилизируют МТ, проникающие в передний край конуса роста, и дендритными шипами, где они регулируют взаимодействие между актином и динамическими МТ [52]. Подобно CLIP, белки, ассоциированные с цитоплазматическим линкером CLASP, также регулируют динамику МТ во время разрастания

аксонов и способствуют навигации аксонов во время развития [37][41]. Дополнительные + TIRs белки, которые, как было установлено, важны для регуляции динамики МТ во время развития нервной системы, включают МТ-полимеразу ХМАР215 [38], ХМАР215-интерактор, ТАСС3 [54][4][20], а также члены семейства белков ТАСС, ТАСС1 и ТАСС2 [39][61].

### 1.3 Семейство белков EB

Белки семейства EB (End-binding protein), вовлеченные в развитие нейронов, также являются членами группы белков + TIRs. Семейство белков EB состоит из трех членов: EB1–3 [25]. EB крепятся на растущий положительный конец МТ, выступая в качестве посредника для других + TIRs, и таким образом регулируют динамику МТ [1]. Кроме того, в нескольких исследованиях была показана значительная роль белков EB во время развития нервной системы. Хотя EB1 повсеместно распространен, EB3 преимущественно экспрессируется в мозге, главным образом в нейронах [51].

Все три члена семейства EB, EB1, EB2 и EB3, взаимодействуют с N-концевым сегментом внутриклеточного домена Plexin-B3, трансмембранного рецептора семафорина 5, участвующего в разрастании нейритов [43]. EB1 и EB3 накапливаются на дистальных концах растущих МТ по всему нейрону [66]. Было показано, что оба белка EB1 и EB3 участвуют в разрастании аксонов [67]. В нейронах дрозофилы EB1 необходим для однородной полярности МТ в дендрите и росте МТ в точках ветвления дендритов [42]. Тем не менее, EB1 специфически активируется во время роста аксонов и было показано, что он является критическим для правильной организации МТ, так как снижение экспрессии EB1 у дрозофилы приводит к аномалиям в архитектуре МТ, приводящим к абберрантному росту аксонов [2]. Экспрессия EB3 повышается во время развития нервной системы и важна для регуляции динамики МТ при росте дендритных шипиков [31]. Интересно, что увеличение экспрессии EB3 совпадает с уменьшением экспрессии EB1 [31].

Белки-партнеры EB можно разделить на две группы в зависимости от типа их взаимодействия с EB-белками: регуляторные партнеры, связывающиеся с EB-белками за пределами плюс-концов микротрубочек, и партнеры, взаимодействующие с EB-белками на плюс-концах микротрубочек. Эти группы, в свою очередь, можно разделить формально в зависимости от места взаимодействия. Например, взаимодействие с белками STIM1 и STIM2 происходит через полипептидный мотив серин-х-изолейцин-пролин (SxIP) [29] или с доменом p-150Glued через Cap-Gly ; однако функциональная роль этих белков не соответствует используемому сайту взаимодействия [73]. Следует отметить, что мотив SxIP довольно широко представлен в различных белках [32]. Однако, формальное присутствие в белке-партнере мотива SxIP не во всех случаях приводит к взаимодействию с EB только через эту область [44, 45].

Таблица 1.3

## Классификация белков партнеров EB. Адаптировано из [50]

Место функционального взаимодействия белка-партнера с EB	Механизм прямого связывания / взаимодействия с EB-белками	Некоторые характерные представители этого типа белков-партнеров	Функции и роль взаимодействия этого типа белков-партнеров с EB
В основном на растущих плюс-концах микротрубочек	Связывание через домен и линкер с гомологией кальпонины	$\alpha$ - и $\beta$ -тубулин	Расположение EB на плюс-конце МТ
	Связывание через EBH-домен (опосредуется через SxIP-мотив на партнерском белке)	APC, CLASP, MCAK (mitotic centromere-associated kinesin), STIM1, STIM2	Модуляция динамики МТ, регуляция связывания и взаимодействия с пролиферацией кинетохорных клеток
	Связывание через EEY / F-tail (опосредуется через домен Cap-Gly на партнерском белке)	CLIP-170, p-140Glued	Модуляция динамики МТ, регулирование нагрузки транспорта

	Связывание через димеризованный EBH-домен	yeast protein polymerase of microtubules Dis1.	Регуляция сегрегации хромосом
Снаружи плюс-концов микротрубочек	Связывание через домен и линкер с гомологией кальпонины	Актин	Регуляция стабильности МТ в зонах богатых актином
	Связывание через С-терминальный домен EB	MAP1B (microtubule-associated protein 1), Tau MAP2 (Tau microtubule-associated protein 2)	Регуляция количества EB в цитозоле, регуляция кинетики связывания EB

EB1 взаимодействует динамическими микротрубочками, рекрутируя динеин-динактиновый комплекс, что приводит к инициации ретроградного транспорта двигательным белком динеином [48]. XMAP215 является тубулин-полимеразой [22] и в присутствии EB1 увеличивает скорость полимеризации микротрубочек [74]. Белок EB1 при взаимодействии с белком STIM1 контролирует депо-управляемый вход кальция [11] и опосредует движение ЭР (эндоплазматический ретикулум) в невозбудимых клетках [29].

EB3 взаимодействует с различными белками, которые регулируют актиновый цитоскелет, такими как дребрин, в филоподиях прогрессирующих конусов роста, [23] и p140Cap, который входит в состав динактинового комплекса и регулирует погрузку и транспорт грузов, которые переносятся с участием динеина [58] в дендритных шипиках [31].

Белок EB3, попав в дендритные шипики на конце полимеризующихся МТ, стабилизирует связанный с актином белок p140Cap в постсинаптической плотности [31]. Было продемонстрировано, что EB3 и актин-связывающий белок дребрин взаимодействуют в развивающихся конусах роста аксонов [23]. Недавние эксперименты с дендритами подтвердили, что дребрин является ключевым актин-ассоциированным белком, участвующим в полимеризации МТ в шипиках [46]. Таким образом, вероятно, существует сложное взаимодействие

между актином и МТ-ассоциированными белками в шейке и головке дендритного шипика. Важно, что полимеризующиеся МТ должны рекрутироваться в конкретные дендритные шипики, а не стохастически полимеризоваться в любые. Таким образом, для входа МТ в шипики требуются следующие условия: N-метил-d-аспаратат-зависимый приток кальция, активация сигнальных каскадов, приводящих к полимеризации актина, и взаимодействие белков МТ + ТИР (EB3) с актиновыми белками в шейке (дребрине) и головке (p140Cap) шипика [31][44–46].

EB3 взаимодействует также с белком постсинаптической плотности 95 (PSD-95, Postsynaptic density protein-95), способствуя модуляции динамики МТ во время образования дендритов [69]. Одна из связей белка EB3 – EB3-опосредованное взаимодействие с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3R). EB3 контролирует сборку IP3R в сигнальные кластеры Ca (2+), благодаря которым Ca<sup>2+</sup> высвобождается из ЭР. [24].

Ранее продемонстрировано влияние уровня экспрессии белка EB3 в нейронах на морфологию дендритных шипиков. Авторы показали, что STIM2 образует комплекс с EB3, зависящий от концентрации Ca<sup>2+</sup> в ЭР и что нарушение взаимодействия STIM2-EB3 приводит к потере грибовидных шипиков в нейронах гиппокампа. [77] Гиперэкспрессия EB3 увеличивает количество грибовидных шипиков и способна восстановить их дефицит в гиппокампальных нейронах, полученных на мышинной модели БА PS1-M146V-KI [56]. Данная трансгенная линия характеризуется мутацией M146V в белке Пресенилине 1. Однако, в данной линии не происходит накопление бета-амилоида.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что тубулиновые динамические микротрубочки играют важную роль в нейрональном транспорте, а также принимают участие в росте и развитии аксонов, дендритов и дендритных шипиков. Однако нейропротекторное влияние белка EB3, стабилизирующего микротрубочки, до сих пор остается недостаточно изученным.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Выделение первичной нейрональной культуры гиппокампа

Нейроны гиппокампа были выделены из новорожденных мышат линии FVB не старше двух дней. Гиппокампы мышей гомогенно состоят из крупных пирамидальных нейронов и глиальных клеток и обычно используются в качестве источника первичной нейрональной гиппокампальной культуры. Гиппокампы были отделены от мозга под стереоскопическим микроскопом с использованием скальпеля и пинцета. Область гиппокампа находилась в Dissection buffer (раствор Хенса (Gibco, #14185-052), 4-(2-оксиэтил)-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES, Sigma, #H3375),  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma, #S5761), антибиотики пенициллин и стрептомицин (Gibco, #15140-122), стерильная вода, pH 7,6) и охлаждалась на льду. Все последующие процедуры, за исключением инкубации и центрифугирования, выполнялись в вытяжном шкафу с ламинарным потоком. Раствор папаина и дезоксирибонуклеазы I (Macherey Nagel GmbH, #R1542S ) добавляли в гиппокампы в пробирке, которые затем инкубировали при 37°C 30 мин. Раствор папаина готовили растворением сухого фермента (125 U/флаконе, Worthington, #LK003176) в 10 мл Neurobasal-A (Gibco, #10888-022, ) и фильтровали с использованием фильтра 0,2 мкм (TPP, #20160342 ).

После инкубации и расщепления ферментами на отдельные клетки гиппокампы медленно пипетировали. Нейроны культивировались в среде следующего состава: Neurobasal-A, 1% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco, #10500-064), 2% бессывороточной добавки B-27 (Gibco, #17504-044), 0,5 мМ L-глутамин (Gibco, #25030-0244) в инкубаторе (Galaxy 170R, New Brunswick) с увлажненной атмосферой с 5%  $\text{CO}_2$  и 95% воздуха при температуре +37°C. Стекла поэтапно были очищены в 100% ацетоне, 100% и 70% этиловом спирте. Предварительно стекла инкубировались при температуре +37°C 2-3 часа в присутствии поли-D-лизина в концентрации 0,1 мг/мл.

## **2.2. Ведение первичной гиппокампальной культуры**

На 7 DIV производилась замена половины среды для культивирования на свежую среду (Neurobasal A, 0,5 mM L-глутамин, 2% B27). На 14-16 DIV клетки фиксировались раствором, состоящем из 4% формальдегида и 4% сукрозы в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4.

## **2.3. Ведение клеточной линии НЕК 293Т**

Клетки НЕК 293Т культивировали в среде для культивации следующего состава: DMEM (Gibco, #41965-039) с добавлением 10% FBS и раствором пенициллин-стрептомицина (Pen Strep, Gibco, #15140-122) – 1% в увлажненном инкубаторе 37°C и 5% CO<sub>2</sub> и собирали при достижении 80–90% конфлюента.

## **2.4. Кальций-фосфатная трансфекция первичных гиппокампальных нейронов**

Плазмидную ДНК (1 мкг) медленно добавляли к 2 М раствору CaCl<sub>2</sub> и доводили смесь до объема 25 мкл путем добавления воды. Для трансфекции двумя плазидами растворы плазмидной ДНК (всего 1 мкг ДНК) смешивают перед добавлением в раствор CaCl<sub>2</sub>. 2xHBSS (25 мкл) добавляли по каплям к раствору ДНК / CaCl<sub>2</sub>. Реакционную пробирку осторожно встряхивали каждый раз после добавления трех капель буфера для трансфекции. Смесь для трансфекции инкубировали 1 минуту, после чего добавляли по каплям к нейрональной гиппокампальной культуре на 7 день культивирования. С лунок предварительно удаляется старая среда и добавляется Neurobasal A. Клетки инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37° С в течение получаса. Нейроны промывали предварительно нагретой бессывороточной средой с кислым pH в течение 5 минут для разрушения преципитатов, после чего клетки помещались в кондиционную среду.

## 2.5. Сборка лентивирусных частиц

Для метода трансфекции на основе PEI клетки HEK293T высевали на культуральную чашку диаметром 10 см примерно за 18 ч до трансфекции. Клетки промывали и добавляли улучшенную минимальную основную среду (Opti-MEM, Gibco, #1932112) 3 мл непосредственно перед трансфекцией. Плазмиды смешиваются в соотношении  $\frac{1}{2}$  челночная плазида (7,5 мкг),  $\frac{3}{8}$  пакующего вектора delta8.9 (6 мкг) и  $\frac{1}{8}$  вектора доставки VSVG (2 мкг). Смесь плазмидной ДНК (15 мкг на чашку) разводили в 500 Opti-MEM и добавляли 60 мкл раствора полиэтиленимина (10 мг/мл, Polysciense, #23966). Получившийся раствор перемешивали и через 10 минут смесь для трансфекции по каплям добавляли к клеткам. После 12 часов инкубации добавляли 10 мл среды, состоящую из DMEM, 10% FBS, 1% PEST. Через 48 часов супернатант откручивался (2000 оборотов/минуту 5 минут) для осаждения клеток и фильтровался (0,45 мм, TPP, #20160342). Собранный вирус аликваторивали и замораживали в жидком азоте (-196°C).

## 2.6. Вестерн-блот анализ

Клетки промывали ледяным PBS и лизировали охлажденным на льду буфером для лизиса RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% додецилсульфата натрия, 0.5% дезоксихолата натрия, 1% NP-40, ингибиторы протеаз (#S8820, Sigma) и фосфатаз (#P0044, Sigma), в который добавляли непосредственно перед использованием 1 mM фенилметилсульфонилфторида, в течение 40 минут. Перед нанесением лизатов в гель они варились 5 минут при 95°C с добавлением буфера Лэммли (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS (#0920C002, Amresco), 10% глицерин, 0,006% бромфеноловый синий, 100 mM d-меркаптоэтанол). 20 мкл каждого образца наносили (до входа в гель 60 В и после 120 В, 3 часа) в концентрирующий 5% (40% смесь акриламида и N,N'-метиленабисакриламида (29:1) в воде (#1610145, Bio-Rad), 0,13M Tris-HCl pH=6.8

(#0043C241, Helicon), 0,1% SDS, 0,1% PSA (#7727540, Sigma-Aldrich), 1 мкл/мл TEMED, бидисциплированная вода) и разделяющий 10% (40% смесь акриламида и N,N'-метилен-бисакриламида (29:1) в воде, 375мМ Tris-HCl pH=8.8, 0,1% SDS, 0,1% PSA, 0,008% TEMED, бидисциплированная вода) акриламидный гель триглицериновом буфере Running buffer (10x Tris Glu, 0,1% SDS, H<sub>2</sub>O). Затем переносили на мембрану поливинилиденфторида (PVDF) (#IPVH00010, Merck Millipore) в Transfer bufer (25 мМ Trис, 192 мМ глицина, 20% MeOH (#67-56-1, Merck Millipore), 0,01% SDS) при 25 В, 30 минут. Мембраны блокировали в течение 1 часа в PBS, содержащем 5% промывочном Trис-буфере с полисорбатом 20 (tris-buffered saline and Tween 20 (TBST)): 50 мМ Trис, 150мМ NaCl, 0,1% Tween 20, pH=7,6. Затем мембраны инкубировали антителами к EB3 (1/2000) и anti-Actin (1/2000) разбавленные в TPBST с 2,5% БСА. После трехкратной отмывки TPBST были добавлены вторичные антитела анти-кроличьи (1:2000, ДАКО, P0448) и анти-мышинные (1:2000, ДАКО, P0447). Сигнал был фиксирован усиленной хемиллюминесценцией (9 мл воды, 1,5 мл 1М трис-HCl pH 8,8, 50 мкл люминола (44 мг/мл, #МКСВ1206V, Sigma), 22 мкл паракумарата (15 мг/мл, #110M1259V, Sigma), 7 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и детектирован на рентгеновскую пленку.

## 2.7. Приготовление A $\beta$ 42 олигомеров

Лиофилизированную аликвоту (1 мг) пептидов A $\beta$ 42 (AnaSpec, #20276) растворяли в 80 мкл 1% NH<sub>4</sub>OH, а после чего добавляли 920 мкл стерильного натрий-фосфатного буфера (PBS Phosphatebufferedsaline), изотонический нетоксичный для клеток буферного раствора, для получения исходного раствора с концентрацией 1 мг/мл (хранили аликвоты по 100 мкл в -20°C). Рабочие растворы A $\beta$  делали непосредственно перед обработкой клеток путем разбавления концентрата до конечных концентраций A $\beta$  пептида 0,1 мкМ в среде Neurobasal A (Gibco, Lifetechnologies, USA). Рабочие растворы инкубировали при температуре +4°C в течение 24 часов для достижения олигомеризации. В

день использования рабочие растворы центрифугировали при 14000 g, +4°C, 10 минут для очистки олигомерной фракции A $\beta$  от фибрилл.

## **2.8. Иммуноцитохимическое окрашивание**

Для визуализации дендритов и постсинаптических белков применялось иммуноцитохимическое окрашивание. После трехкратного промывания PBS в течение 5 минут и пермеабелизации клеточной мембраны 0,25% раствором Triton X-100 (Helicon, #9002-93) в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре, клетки блокировались в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma, #9048-46-8) в PBS 1 час. Затем предметные стекла три раза промывали PBS и добавлялись первичные моноклональные антитела к MAP2 (1:1000, Milipore) и PSD-95 (1:300, ThermoFisher), разбавленные в PBS с 2,5% БСА. Инкубацию проводили при комнатной температуре с постоянным помешиванием в течение 1-3 часов. После трехкратной отмывки PBS были добавлены вторичные антитела Alexa Fluor 594 (1:1000, Invitrogen) и Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen). После промывки PBS стекла были монтированы в жидкости для заключения Aqua-Poly/Mount (Polysciences, #18606).

## **2.9. Конфокальная микроскопия**

Конфокальную микроскопию проводили с использованием конфокального микроскопа ThorLabs (США), оснащенного программным обеспечением ThorImage (США). Использовались иммерсионный объектив с 100-кратным (UPlanSApo, NA=1,4, Olympus, Япония) увеличением. Для анализа дендритных шипиков были получены серии изображений, включающие от семи до одиннадцати снимков. Изображения имели размер 1024  $\times$  1024 пикселя, разрешение 0,108 мкм/пиксель, ширина шага по оси z = 0,2 мкм. Для подсчета размера и количества кластеров были получены изображения со следующими характеристиками: размер изображения 2016  $\times$  2016 пикселя и разрешение 0,034 мкм/пиксель.

## **2.10. Изучение морфологии дендритных шипиков нейронов**

Обработка изображений производилась с помощью метода деконволюции по алгоритму Ричадсона-Люси. Это традиционный алгоритм деконволюции, разработанный независимо Уильямом Ричардсоном и Леоном Люси в 1972 и 1974 годах соответственно. Алгоритм был получен из теоремы Байеса и представляет собой итерационный процесс, слепая форма которого чередуется между оценкой функции рассеяния точки (ядро) и светящегося объекта (изображение с размытием) и сходится к решению с максимальным правдоподобием для исследуемого объекта. Для определения точных размеров головки была произведена локальная бинаризация в программе ImageJ. После чего количественный анализ морфологии дендритных шипиков производился в программе NeuronStudio.

## **2.11. Анализ распределения постсинаптического белка PSD-95**

Выделение границ дендрита осуществлялось путем бинаризации изображения, характеризующего распределение белка MAP2, методом минимальной перекрестной энтропии Ли. Детекция кластеров производилась на изображениях, характеризующих распределение белка PSD-95. Предварительно изображения обрабатывались фильтром «Rolling ball» для уменьшения шума. Для проведения локальной бинаризации с помощью плагина для ImageJ Adaptive 3D Threshold 1.22. использовались следующие параметры:  $r=2$ ,  $C=160$ , локальный вес=5%. Плотность и размер кластеров подсчитывались в программном обеспечении Synpanal.

## **2.12. Статистический анализ**

Статистический анализ данных был выполнен с использованием R studio и программы Microsoft Excel. Для определения распределения проводился расчет

критерия Шапиро-Уилка. Полученные результаты соответствовали нормальному распределению. Для подтверждения равенства дисперсий происходила оценка данных с помощью критерия Ливиня. В группах была подтверждена однородность дисперсий, а значит проводился стандартный однофакторный дисперсионный анализ. Статистическое сравнение результатов, в качестве апостериорных тестов, проводили с использованием  $t$  критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

## Глава 3. Результаты

### 3.1. Анализ эффективности вирусной трансдукции первичной нейрональной гиппокампальной культуры

Эффективность вирусной трансдукции проверялась с помощью метода Вестерн-блот. На 7-й день культивирования (DIV) первичной нейрональной гиппокампальной культуры, выделенная из мышей дикого типа, заражалась контрольным лентивирусом, несущим случайную последовательность, негомологичную ни одной из матричных РНК клетки, лентивирусом с антисмысловой последовательностью к матричной РНК EB3, и лентивирусом, несущим ген EB3. На 14DIV культура лизировалась, далее экспрессия белка EB3 в полученных пробах исследовалась с помощью метода Вестерн-блот. Белок актин использовался для оценки общего содержания белка в пробе. Результаты представлены на рис. 3.1

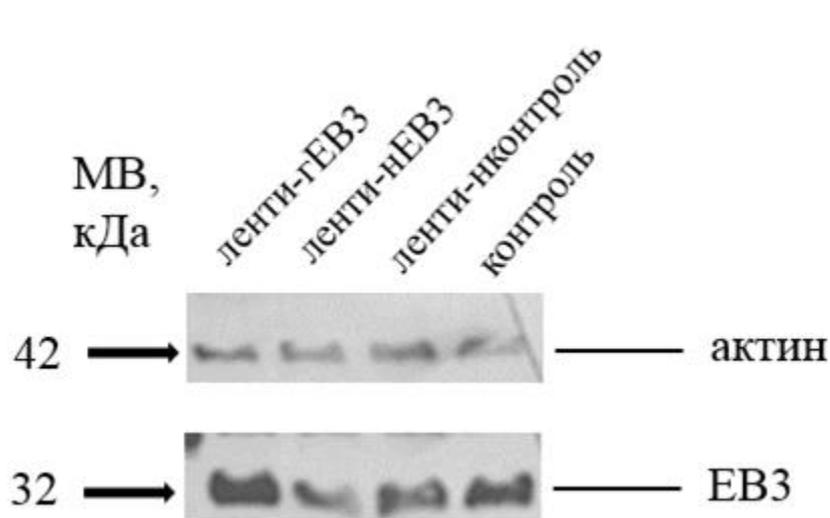


Рисунок 3.1 - Вестерн-блот анализ первичной нейрональной гиппокампальной культуры при трансдукции контрольным лентивирусом (контроль), лентивирусом, индуцирующим нокдаун EB3 (+ленти-нEB3) и гиперэкспрессию EB3 (+ленти-гEB3). МВ – молекулярный вес.

### **3.2. Влияние гиперэкспрессии и нокдауна белка EB3 на плотность и размер кластеров белка PSD-95 в дендритах первичных гиппокампальных нейронов**

При исследовании влияния вирус-опосредованной гиперэкспрессии и нокдауна белков EB3 на плотность и размер пунктов PSD-95 нейронов гиппокампов мышей дикого типа были получены следующие результаты. Контрольное значение плотности пунктов PSD-95 составило  $0,53 \pm 0,04$  1/мкм<sup>2</sup> (контроль) (рис. 3.2). Трансдукция нейрональной культуры контрольным лентивирусом, несущим случайную последовательность, негомологичную ни одной из матричных РНК клетки (ленти-нконтроль), не влияла на количество и размер пунктов. Вирус-опосредованная гиперэкспрессия белка EB3 (ленти-EB3) не способствовала увеличению кластеров в размерах, но увеличивала их плотность  $1,00 \pm 0,08$  1/мкм<sup>2</sup>, при нокдауне белка EB3 количество кластеров белка PSD-95 снижалось с  $0,53 \pm 0,04$  1/мкм<sup>2</sup> до  $0,33 \pm 0,05$  1/мкм<sup>2</sup>, как и размер кластеров с  $0,0967 \pm 0,0007$  мкм<sup>2</sup> до  $0,0721 \pm 0,0006$  мкм<sup>2</sup>.

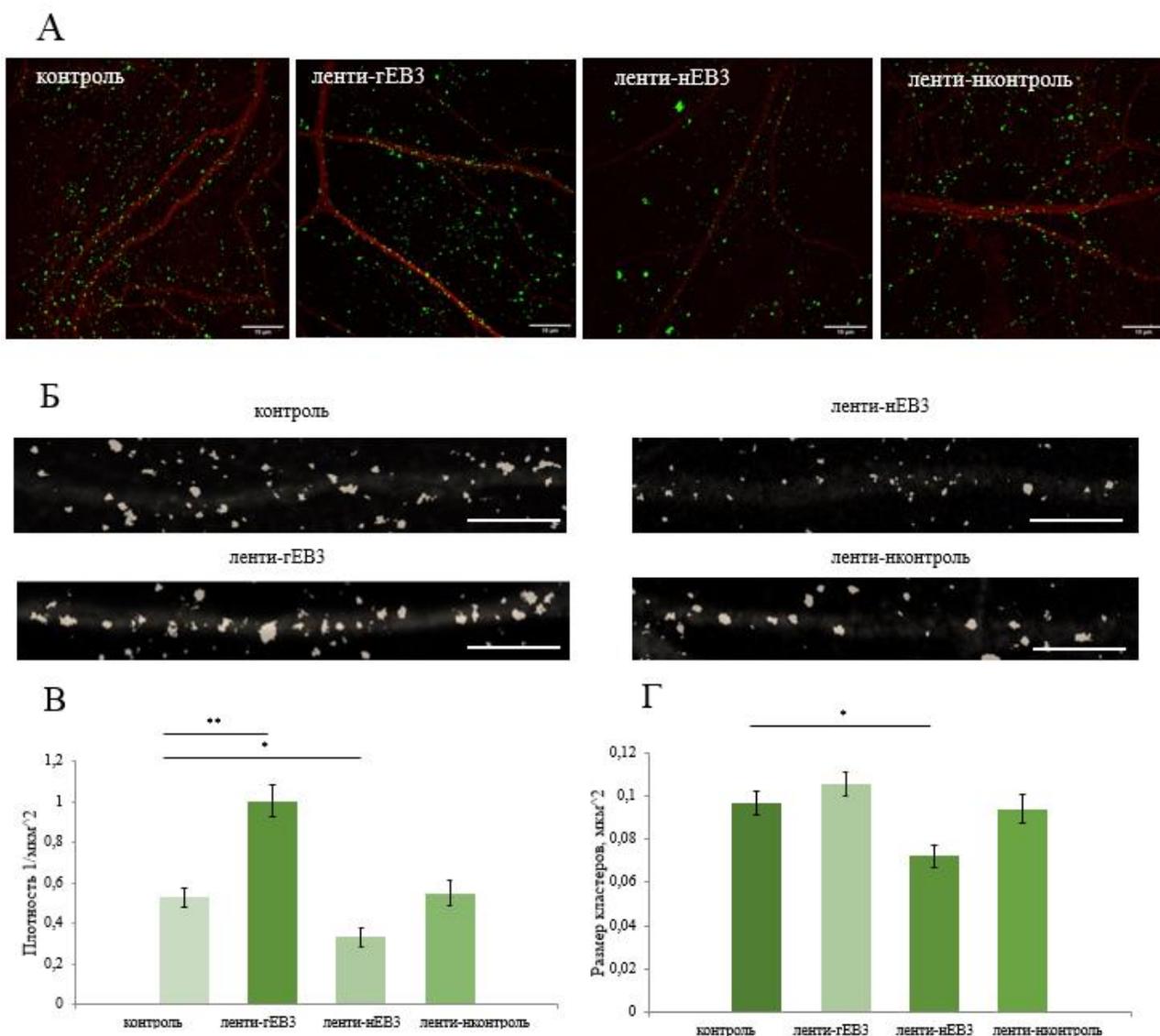


Рисунок 3.2 – А, Конфокальные изображения гиппокампальных нейронов дикого типа трансдуцированных контрольным лентивирусом (контроль), лентивирусом с нокдауном EB3 (ленти-нEB3) и лентивирусом с гиперэкспрессией EB3 (ленти-гEB3) на DIV7 и зафиксированных на DIV14. Длина масштабного отрезка составляет 10 мкм. Б, Бинаризация изображения для последующей обработки. Длина масштабного отрезка составляет 5 мкм. В, Г, В, Г, Плотность (В) и размер (Г) кластеров белка PSD-95 для каждой группы клеток на панели А. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,00005$

### 3.3 Влияние гиперэкспрессии белка EB3 в условиях низкой амилоидной токсичности на плотность и размер кластеров белка PSD-95 в дендритах первичных гиппокампальных нейронов

При исследовании влияния вирус-опосредованной гиперэкспрессии и нокадауна белков EB3 с добавлением пептидов A $\beta$ 42 на плотность и размер пунктов PSD-95 нейронов гиппокампов мышей дикого типа были получены следующие результаты. Плотность кластеров белка PSD-95 с добавлением пептидов A $\beta$ 42 составила  $0,38 \pm 0,04$  1/мкм<sup>2</sup> (контроль) (рис. 3.3). Вирус-опосредованная гиперэкспрессия белка EB3 (ленти-EB3) с добавлением A $\beta$ 42 олигомеров увеличила их количество до  $0,88 \pm 0,09$  1/мкм<sup>2</sup>. Гиперэкспрессия белка EB3 с добавлением A $\beta$ 42 достоверно не повлияла на размер кластеров PSD-95.

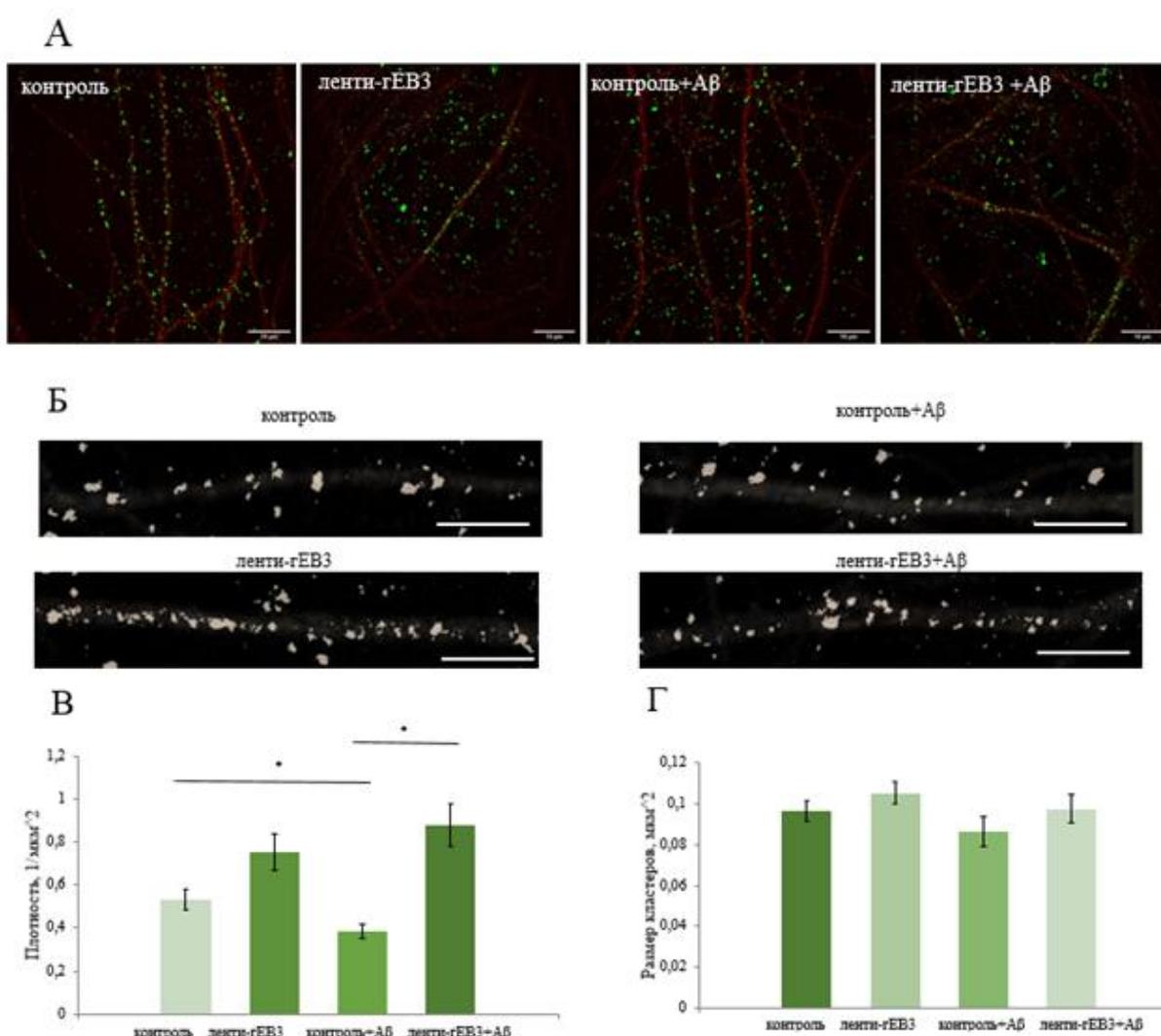


Рисунок 3.3 – А, Конфокальные изображения гиппокампальных нейронов дикого типа (WT) трансдуцированных контрольным лентивирусом (контроль), контрольным лентивирусом с добавлением A $\beta$  (контроль+A $\beta$ ), лентивирусом с гиперэкспрессией EB3 (ленти-гEB3) и лентивирусом с гиперэкспрессией EB3 с добавлением A $\beta$  (ленти-гEB3+A $\beta$ ) на DIV7 и

зафиксированных на DIV14. Длина масштабного отрезка составляет 10 мкм. Б, Бинаризация изображения для последующей обработки. Длина масштабного отрезка составляет 5 мкм. В, Г, Плотность (В) и размер (Г) кластеров белка PSD-95 для каждой группы клеток на панели А. \* $p < 0,05$

### **3.4 Влияние гиперэкспрессии белка EB3 на морфологию дендритных шипиков гиппокампальных нейронов в условиях низкой амилоидной токсичности**

С помощью конфокальной микроскопии проанализировано влияние гиперэкспрессии белка EB3 на морфологию дендритных шипиков в условиях амилоидной токсичности в первичных гиппокампальных нейронах дикого типа. Первичные гиппокампальные нейроны трансфецировались плазмидой, кодирующей флуоресцентный белок mCherry или ко-трансфецировались mCherry и плазмидой, кодирующей белок FLAG-EB3 на DIV7. На 10-11 DIV в среду для культивации добавлялась олигомерная фракция A $\beta$  до достижения концентрации 0,1 мкМ. На DIV14 нейроны фиксировались, после чего были получены конфокальные изображения. Обработка изображений производилась с помощью метода деконволюции по алгоритму Ричадсона-Люси; количественный анализ морфологии дендритных шипиков производился в программе NeuronStudio и ImageJ.

Гиперэкспрессия белка EB3 увеличила ширину головки шипиков в нейронах до значения  $1,30 \pm 0,04$  на 10 мкм (Рисунок 3.4) по сравнению с результатами контроля  $1,1 \pm 0,04$  на 10 мкм. Также заметное увеличение плотности с  $4,18 \pm 0,04$  на 10 мкм до  $5,48 \pm 0,04$  на 10 мкм и ширины головки с  $0,95 \pm 0,04$  мкм до  $1,17 \pm 0,05$  мкм в низкой амилоидной токсичности при гиперэкспрессии белка EB3.

Микрофотографии на рисунке 3.4 иллюстрируют изменения в морфологии шипиков после гиперэкспрессии белка FLAG-EB3 в условиях низкой амилоидной токсичности.

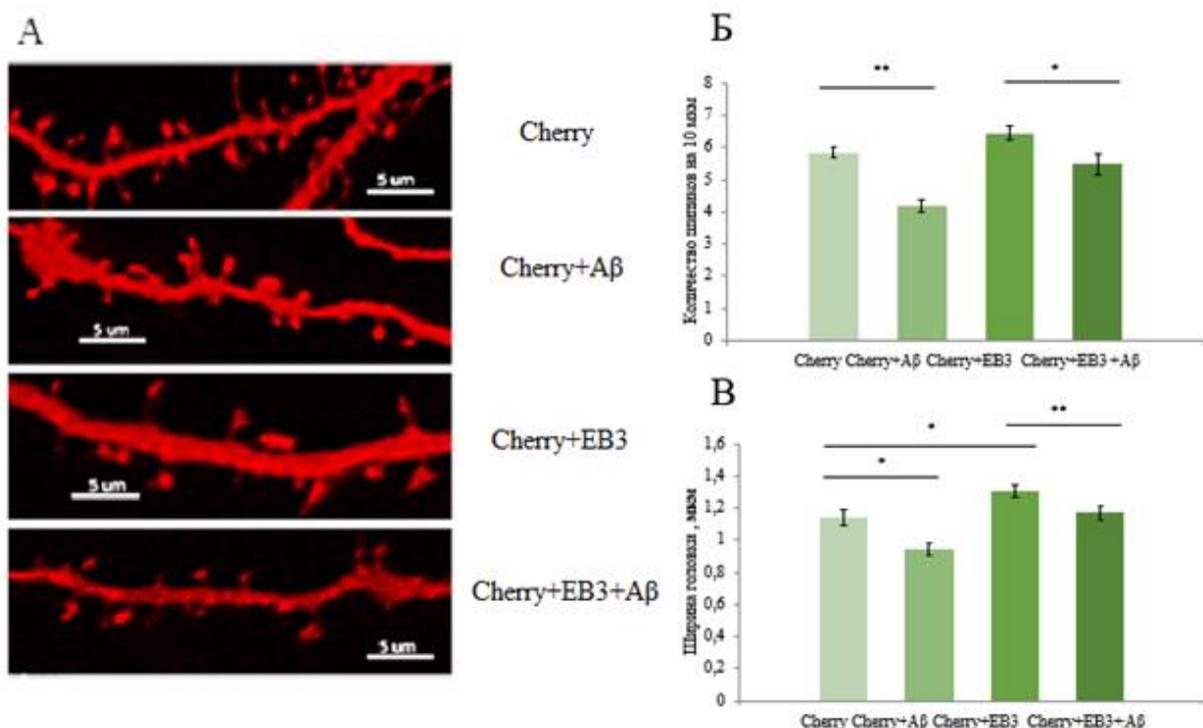


Рисунок 3.4 - А Конфокальные изображения гиппокампальных нейронов дикого типа (FVB) трансфицированных плазмидой mCherry или ко-трансфицированных mCherry и FLAG-EB3 на DIV7. На 10-11 DIV добавлялась олигомерная фракция Aβ, на DIV14 клетки фиксировались. Длина масштабного отрезка составляет 5 мкм. Б, Число шипиков на 10 мкм длины дендрита (Б) и ширина головки дендритных шипиков грибовидного типа (В) для каждой группы клеток на панели А. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0005$

## Заключение

Белок EB3, стабилизирующий полимеризующиеся микротрубочки, крепится к положительному концу нейрональных тубулиновых микротрубочек. В предыдущих исследованиях было продемонстрировано влияние уровня экспрессии белка EB3 в нейронах на морфологию дендритных шипиков [77]. Гиперэкспрессия EB3 увеличивает количество грибовидных шипиков и способна восстановить их дефицит на мышинной модели БА [56].

Известно, что белок EB3 взаимодействует с белком PSD-95, способствуя модуляции динамики МТ во время образования дендритов [69]. В предыдущих исследованиях показана связь между кластеризацией белка PSD-95 и стабильностью дендритного шипика *in vivo* [9], в связи с чем, было принято решение оценить влияние вирус-опосредованной гиперэкспрессии и нокдауна белка EB3 на плотность и размер кластеров постсинаптического белка PSD-95 в дендритах первичных гиппокампальных нейронов в норме и в условиях низкой амилоидной токсичности.

В данном исследовании показано, что гиперэкспрессия белка EB3 увеличивает ширину головки грибовидных шипиков в первичных гиппокампальных нейронах. Гиперэкспрессия белка EB3 в условиях низкой амилоидной токсичности, моделирующих БА, предотвращает уменьшение числа шипиков и сокращение размера их головки. Увеличение размера головки грибовидных шипиков коррелирует с силой синапса и размером постсинаптической плотности.

Продемонстрировано влияние гиперэкспрессии и нокдауна белка EB3 на плотность и размер кластеров белка PSD-95 в дендритах гиппокампальных нейронов в норме и в условиях амилоидной токсичности. Для подсчета плотности и размера кластеров PSD-95 в работе был разработан алгоритм с применением локальной бинаризации и программы Synpanal. Гиперэкспрессия белка EB3 вызывает увеличение плотности кластеров белка PSD-95 в сравнении

с контрольной группой, но не изменяет их размер. Нокдаун белка EB3 уменьшает размер и плотность кластеров белка PSD-95.

На основе полученных результатов, можно предположить о перспективности изучения белка EB3 в качестве возможной мишени для создания лечения БА.

Выводы:

1. При помощи Вестерн-блот анализа продемонстрирована эффективность собранных лентивирусных частиц для управления экспрессией белка EB3 и определена оптимальная нетоксичная концентрация лентивирусов для воздействия на первичные гиппокампальные нейроны;

2. Разработан и успешно применен метод анализа плотности и размеров кластеров белка PSD-95 в дендритах нейронов. Метод основан на коррекции фона и устранении шума изображений, с последующим применением локальной бинаризации изображений для выделения кластеров белка PSD-95, полученных с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии;

3. Гиперэкспрессия белка EB3 вызывает увеличение ширины головки дендритных шипиков и увеличение плотности кластеров белка PSD-95 в сравнении с контрольной группой, но не изменяет их размер. Вирус-опосредованный нокдаун белка EB3 приводит к значительному уменьшению плотности и размера кластеров постсинаптического белка PSD-95.

4. В условиях низкой амилоидной токсичности происходит снижение головки и плотности дендритных шипиков. Гиперэкспрессия белка EB3 предотвращает снижение количества дендритных шипиков в гиппокампальных нейронах и увеличивает ширину их головки, а также увеличивает плотность кластеров белка PSD-95. Полученные результаты позволяют сделать вывод о нейропротекторном свойстве данного белка на клеточной модели БА.

**Список используемых источников**

1. Akhmanova A., Steinmetz M.O. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. № 4 (9). С. 309–322.
2. Alves-Silva J. [и др.]. Spectraplakins promote microtubule-mediated axonal growth by functioning as structural microtubule-associated proteins and EB1-dependent +TIPs (tip interacting proteins) // *Journal of Neuroscience*. 2012. № 27 (32). С. 9143–9158.
3. Arendt T. Neurodegeneration and plasticity // *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2004. № 7 (22). С. 507–514.
4. Bearce E.A., Erdogan B., Lowery L.A. TIPsy tour guides: How microtubule plus-end tracking proteins (+TIPS) facilitate axon guidance // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. № JUNE (9). С. 1–12.
5. Boros B.D. [и др.]. Dendritic spine remodeling accompanies Alzheimer's disease pathology and genetic susceptibility in cognitively normal aging // *Neurobiology of Aging*. 2019. (73). С. 92–103.
6. Brouhard G.J., Rice L.M. The contribution of  $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics // *Journal of Cell Biology*. 2014. № 3 (207). С. 323–334.
7. Caillé I. [и др.]. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone // *Development*. 2004. № 9 (131). С. 2173–2181.
8. Cammarata G.M., Bearce E.A., Lowery L.A. Cytoskeletal social networking in the growth cone: How +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance // *Cytoskeleton*. 2016. № 9 (73). С. 461–476.
9. Cane M. [и др.]. The relationship between PSD-95 clustering and spine stability In Vivo // *Journal of Neuroscience*. 2014. № 6 (34). С. 2075–2086.

10. Cassimeris L.U. [и др.]. Dynamic instability of microtubules // *BioEssays*. 1987. № 4 (7). С. 149–154.
11. Chang C.L. [и др.]. EB1 binding restricts STIM1 translocation to ER-PM junctions and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry // *Journal of Cell Biology*. 2018. № 6 (217). С. 2047–2058.
12. Chen G.F. [и др.]. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2017. № 9 (38). С. 1205–1235.
13. Chrétien D., Fuller S.D., Karsenti E. Structure of growing microtubule ends: Two-dimensional sheets close into tubes at variable rates // *Journal of Cell Biology*. 1995. № 5 (129). С. 1311–1328.
14. Cole S.L., Vassar R. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the  $\beta$ -secretase, in Alzheimer disease pathophysiology // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. № 44 (283). С. 29621–29625.
15. Coles C.H., Bradke F. Coordinating Neuronal Actin-Microtubule Dynamics // *Current Biology*. 2015. № 15 (25). С. R677–R691.
16. Dawkins E., Small D.H. Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: Beyond Alzheimer's disease // *Journal of Neurochemistry*. 2014. № 5 (129). С. 756–769.
17. Domínguez-álvaro M. [и др.]. Three-dimensional analysis of synapses in the transentorhinal cortex of Alzheimer's disease patients // *Acta Neuropathologica Communications*. 2018. № 1 (6). С. 1–15.
18. Duyckaerts C., Delatour B., Potier M.C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease // *Acta Neuropathologica*. 2009. № 1 (118). С. 5–36.
19. Eom T.Y. [и др.]. Differential regulation of microtubule severing by APC underlies distinct patterns of projection neuron and interneuron migration // *Developmental Cell*. 2014. № 6 (31). С. 677–689.

20. Erdogan B. [и др.]. The microtubule plus-end-tracking protein TACC3 promotes persistent axon outgrowth and mediates responses to axon guidance signals during development // *Neural Development*. 2017. № 1 (12). С. 1–10.
21. Furukawa K. [и др.]. Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of  $\alpha$ -Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain // *Journal of Neurochemistry*. 2002. № 5 (67). С. 1882–1896.
22. Gary J. Brouhard [и др.]. XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase // *Cell*. 2008. № 1 (132). С. 79–88.
23. Geraldo S. [и др.]. Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis // *Nature Cell Biology*. 2008. № 10 (10). С. 1181–1189.
24. Geyer M. [и др.]. Microtubule-Associated Protein EB3 Regulates IP3 Receptor Clustering and Ca<sup>2+</sup> Signaling in Endothelial Cells // *Cell Reports*. 2015. № 1 (12). С. 79–89.
25. Gouveia S.M., Akhmanova A. Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins. End binding proteins and their partners / S.M. Gouveia, A. Akhmanova, 1-е изд., Elsevier Inc., 2010. 1–74 с.
26. Grishchuk E.L. [и др.]. Force production by disassembling microtubules // *Nature*. 2005. № 7066 (438). С. 384–388.
27. Gu J., Firestein B.L., Zheng J.Q. Microtubules in dendritic spine development // *Journal of Neuroscience*. 2008. № 46 (28). С. 12120–12124.
28. Hernández-Zimbrón L.F. [и др.]. Beta Amyloid Peptides: Extracellular and Intracellular Mechanisms of Clearance in Alzheimer's Disease // *Update on Dementia*. 2016.
29. Honnappa S. [и др.]. An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal // *Cell*. 2009. № 2 (138). С. 366–376.

30. Hu X. [и др.]. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines // *Journal of Neuroscience*. 2008. № 49 (28). С. 13094–13105.
31. Jaworski J. [и др.]. Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity // *Neuron*. 2009. № 1 (61). С. 85–100.
32. Jiang K. [и др.]. A proteome-wide screen for mammalian SxIP motif-containing microtubule plus-end tracking proteins // *Current Biology*. 2012. № 19 (22). С. 1800–1807.
33. Jillian J.Kril S.P., Harding A.J., Halliday G.M. Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation // *Acta Neuropathologica*. 2002. № 4 (103). С. 370–376.
34. Kopeikina K.J., Hyman B.J., Spires-Jones T.L. Soluble forms of tau are toxic in alzheimer's disease // *Translational Neuroscience*. 2012. № 3 (3). С. 223–233.
35. Kopke E. [и др.]. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non- paired helical filament pool in Alzheimer disease // *Journal of Biological Chemistry*. 1993. № 32 (268). С. 24374–24384.
36. Korobova, F., & Svitkina T. Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis // *Molecular Biology of the Cell*. 2010. № 1 (21). С. 165–176.
37. Lee, H., Engel, U., Rusch, J., Scherrer, S., Sheard, K., & Van Vactor D. The Microtubule Plus End Tracking Protein Orbit/MAST/CLASP Acts Downstream of the Tyrosine Kinase Abl in Mediating Axon Guidance // *Neuron*. 2004. № 6 (42). С. 913–926.
38. Lowery L.A. [и др.]. Growth cone-specific functions of XMAP215 in restricting microtubule dynamics and promoting axonal outgrowth // *Neural Development*. 2013. № 1 (8).
39. Lucaj C.M. [и др.]. Xenopus TACC1 is a microtubule plus-end tracking protein that can regulate microtubule dynamics during embryonic development //

Cytoskeleton. 2015. № 5 (72). С. 225–234.

40. Mark J. [и др.]. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer ' s disease // *The Lancet*. 1994. № 8925 (344). С. 769–772.

41. Marx A. [и др.]. Xenopus cytoplasmic linker-associated protein 1 (XCLASP1) promotes axon elongation and advance of pioneer microtubules // *Molecular Biology of the Cell*. 2013. № 10 (24). С. 1544–1558.

42. Mattie F.J. [и др.]. Directed microtubule growth, +TIPs, and Kinesin-2 Are required for uniform microtubule polarity in dendrites // *Current Biology*. 2010. № 24 (20). С. 2169–2177.

43. Mattson M.P. Cellular actions of  $\beta$ -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives // *Physiological Reviews*. 1997. № 4 (77). С. 1081–1132.

44. Mcvicker D.P., Millette M.M., Dent E.W. Signaling to the microtubule cytoskeleton: An unconventional role for CaMKII // *Developmental Neurobiology*. 2015. № 4 (75). С. 423–434.

45. Merriam E.B. [и др.]. Dynamic microtubules promote synaptic NMDA receptor-dependent spine enlargement // *PLoS ONE*. 2011. № 11 (6). С. 1–7.

46. Merriam E.B. [и др.]. Synaptic regulation of microtubule dynamics in dendritic spines by calcium, F-actin, and Drebrin // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 42 (33). С. 16471–16482.

47. Mogilner A., Oster G. Force generation by actin polymerization II: The elastic ratchet and tethered filaments // *Biophysical Journal*. 2003. № 3 (84). С. 1591–1605.

48. Moughamian A.J. [и др.]. Ordered recruitment of Dynactin to the microtubule plus-end is required for efficient initiation of retrograde axonal transport // *Journal of Neuroscience*. 2013. № 32 (33). С. 13190–13203.

49. Mudher A., Lovestone S. Alzheimer's disease - Do tauists and baptists finally shake hands? // *Trends in Neurosciences*. 2002. № 1 (25). С. 22–26.

50. Mustyatsa V. V. [и др.]. EB-family proteins: Functions and microtubule interaction mechanisms // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. № 7 (82). С. 791–802.
51. Nakagawa H. [и др.]. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue // *Oncogene*. 2000. № 2 (19). С. 210–216.
52. Neukirchen D., Bradke F. Neuronal polarization and the cytoskeleton // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2011. № 8 (22). С. 825–833.
53. Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography // *Nature*. 1998. № 6663 (391). С. 199–203.
54. Nwagbara B.U. [и др.]. TACC3 is a microtubule plus end-tracking protein that promotes axon elongation and also regulates microtubule plus end dynamics in multiple embryonic cell types // *Molecular Biology of the Cell*. 2014. № 21 (25). С. 3350–3362.
55. Ohsawa I. [и др.]. Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells // *European Journal of Neuroscience*. 1999. № 6 (11). С. 1907–1913.
56. Pchitskaya E. [и др.]. Stim2-Eb3 Association and Morphology of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7). С. 1–13.
57. Penazzi L. [и др.]. A $\beta$ -mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D // *Neuropharmacology*. 2016. (105). С. 84–95.
58. Pianu B. [и др.]. The A $\beta$ 1-42 peptide regulates microtubule stability independently of tau // *Journal of Cell Science*. 2014. № 5 (127). С. 1117–1127.
59. Popugaeva E. [и др.]. STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity // *Molecular Neurodegeneration*. 2015. № 1 (10).

60. Rice L.M., Montabana E.A., Agard D.A. The lattice as allosteric effector: Structural studies of  $\alpha\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. № 14 (105). С. 5378–5383.
61. Rutherford E.L. [и др.]. *Xenopus TACC2 is a microtubule plus end-tracking protein that can promote microtubule polymerization during embryonic development* // *Molecular Biology of the Cell*. 2016. № 20 (27). С. 3013–3020.
62. Samsonov A. [и др.]. *Tau interaction with microtubules in vivo* // *Journal of Cell Science*. 2004. № 25 (117). С. 6129–6141.
63. Seetapun D. [и др.]. *Estimating the microtubule GTP cap size in vivo* // *Current Biology*. 2012. № 18 (22). С. 1681–1687.
64. Šimić G. [и др.]. *Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies* // *Biomolecules*. 2016. № 1 (6). С. 2–28.
65. Sisodia S.S. *Beta-Amyloid precursor protein cleavage a membrane-bound protease* // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. № July (89). С. 6075–6079.
66. Stepanova T. [и др.]. *Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein)* // *Journal of Neuroscience*. 2003. № 7 (23). С. 2655–2664.
67. Stepanova T. [и др.]. *History-dependent catastrophes regulate axonal microtubule behavior* // *Current Biology*. 2010. № 11 (20). С. 1023–1028.
68. Sun S. [и др.]. *Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice* // *Neuron*. 2014. № 1 (82). С. 79–93.
69. Sweet E.S., Tseng C.Y., Firestein B.L. *To branch or not to branch: How PSD-95 regulates dendrites and spines* // *BioArchitecture*. 2011. № 2 (1). С. 69–73.

70. Ur-Rahman A. *Frontiers in Clinical Drug Research - CNS and Neurological Disorders* / A. Ur-Rahman, под ред. А.- Ur-Rahman, Bentham Science Publishers, 2016. 117–120 с.
71. Vassar R. [и др.]. The  $\beta$ -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: Regulation, cell biology, function, and therapeutic potential // *Journal of Neuroscience*. 2009. № 41 (29). С. 12787–12794.
72. Walsh D.M., Selkoe D.J. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery // *Journal of Neurochemistry*. 2007. № 5 (101). С. 1172–1184.
73. Willige D. Van De, Hoogenraad C.C., Akhmanova A. Microtubule plus-end tracking proteins in neuronal development // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. № 10 (73). С. 2053–2077.
74. Zanic M. [и др.]. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels // *Nature Cell Biology*. 2013. № 6 (15). С. 688–693.
75. Zhang H. [и др.]. Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease // *Journal of Neuroscience*. 2015. № 39 (35). С. 13275–13286.
76. Zhang R. [и др.]. Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins // *Cell*. 2015. № 4 (162). С. 849–859.
77. Пчицкая Е.И., Попугаева Е.А., Власова О.Л. Б.И.. Роль белка STIM2 в формировании дендритных шипиков в условиях амилоидной синаптоксичности 2015.
78. Пчицкая Е.И., Жемков В.А., Безпрозванный И.Б. Динамические Микротрубочки При Болезни Альцгеймера: Связь С Патологией Дендритных Шипиков // *Биохимия*. 2018. № 9 (83). С. 1343–1350.