

На правах рукописи

**РОДИН Дмитрий Игоревич**

**Эффекты гиперэкспрессии гена белка предшественника амилоида  
в нервных клетках дрозофилы и поиск антиамилоидогенных соединений**

03.02.07 – генетика

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

Санкт-Петербург  
2014

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

Научный руководитель: доктор биологических наук  
**Саранцева Светлана Владимировна**,  
заместитель директора, заведующая  
лабораторией экспериментальной и прикладной  
генетики ФГБУ «ПИЯФ» НИЦ «Курчатовский  
институт», г. Гатчина.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук  
**Чухловин Алексей Борисович**,  
профессор кафедры клинической лабораторной  
диагностики ГБОУ ВПО «Первый Санкт-  
Петербургский государственный медицинский  
университет им. акад. И. П. Павлова»  
Минздрава РФ, г. Санкт-Петербург,

кандидат биологических наук  
**Никитина Екатерина Александровна**,  
старший научный сотрудник, заместитель  
заведующего лабораторией нейрогенетики  
Института физиологии им. И. П. Павлова РАН,  
г. Санкт-Петербург.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт молекулярной  
генетики Российской академии наук.

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании  
диссертационного совета Д 212.232.12 на базе Санкт-Петербургского  
государственного университета по адресу: 199034, г. Санкт-Петербург,  
Университетская наб., д. 7/9, Санкт-Петербургский государственный университет,  
биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. М. Горького Санкт-  
Петербургского государственного университета.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 212.232.12  
доктор биологических наук

Л. А. Мамон

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Белок-предшественник амилоида (APP) – крупный трансмембранный белок, в большом количестве обнаруживаемый в синапсах нейронов. Белок принимает участие в развитии различных заболеваний, среди которых можно выделить синдром Дауна, амилоидную ангиопатию и болезнь Альцгеймера. На сегодняшний день функции APP неясны. Однако было показано, что он участвует в разнообразных процессах, включающих клеточную адгезию, клеточную сигнализацию, формирование структуры и функции нейронов [Breen *et al.*, 1991; Neve *et al.*, 2007; Stante *et al.*, 2009].

Основным механизмом протеолиза APP является его расщепление тремя протеазами, получившими название  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретазы. Процессинг APP осуществляется по так называемому амилоидогенному (при участии  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретазы) и неамилоидогенному пути (при участии  $\alpha$ - и  $\gamma$ -секретазы). Основным отличием является то, что в случае амилоидогенного пути происходит образование небольшого по размерам амилоид-бета-пептида (A $\beta$ ). В свою очередь нарушение метаболизма A $\beta$  приводит к его агрегированию и образованию так называемых сенильных бляшек – одного из главных маркеров широко распространенного старческого нейродегенеративного заболевания – болезни Альцгеймера (БА).

БА – одна из значимых медицинских проблем современного мира, характеризующаяся тяжелой и разнообразной симптоматикой, включающей амнезию, зрительно-пространственные и временные нарушения, алексию, аграфию. Дальнейшее прогрессирование заболевания ведет к общему физическому истощению и в конечном итоге к летальному исходу. В аутопсате мозга пациентов обычно обнаруживаются классические маркеры БА – дегградация тканей мозга и наличие нейрофибриллярных клубков, основным компонентом которых является гиперфосфорилированный белок тау, и амилоидных бляшек, состоящих в основном из агрегированного A $\beta$ .

На сегодняшний день не существует эффективного способа лечения БА. За годы исследований заболевания было протестировано и отвергнуто множество препаратов. В большей степени это связано с отсутствием глубинного понимания механизмов, ведущих к развитию патологии. Тем не менее, с каждым годом число тестируемых препаратов растет. Наиболее перспективными являются соединения, обладающие антиамилоидогенной активностью, т. е. способные восстанавливать гомеостаз A $\beta$ .

Согласно гипотезе амилоидного каскада токсичные растворимые формы A $\beta$  запускают каскад патологических процессов, приводящих в итоге к дисфункции нейронов, нарушению синаптической передачи и когнитивным изменениям. Несмотря на наличие множества данных, бесспорно подтверждающих правомерность амилоидной гипотезы, более пристальное изучение вопроса последних лет показало, что не только вызываемый A $\beta$  каскад патологических изменений, но и ряд других не связанных или опосредованно связанных с A $\beta$  параллельных процессов может вести к манифестации клинической симптоматики заболевания. Среди этих процессов можно выделить патологические изменения цитоскелета нейрона, нарушение антиоксидантной

системы, нарушение апоптоза, изменение клеточного метаболизма и др. [Brion, 1998; Peers *et al.*, 2007; Kumar-Singh, 2008; Kroner, 2009; Su *et al.*, 2008, Bermejo-Pareja *et al.*, 2010].

Кроме того, не до конца ясна функция полноразмерного белка APP и других его фрагментов в развитии нейродегенерации. Долгое время APP рассматривался исключительно как источник A $\beta$ . В то же время ряд исследований показывает, что нарушение нормальной функции APP может также приводить к развитию разнообразных патологий нервной системы [Rovelet-Lecrux *et al.*, 2005]. Определение роли APP в развитии патологических процессов, наблюдаемых при БА, – ключевой момент для понимания базисных молекулярных механизмов, ведущих к развитию заболевания, что крайне важно для разработки эффективных методов лечения.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель диссертационной работы – исследовать эффекты гиперэкспрессии гена *APP* в нервной системе *Drosophila melanogaster* и охарактеризовать, как содержание трансгенных особей *Drosophila* на среде с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, мутантными по гену *ADE2* и продуцирующими красный пигмент, влияет на нейродегенерацию и амилоидогенез. В работе поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать морфологические дефекты развития особей *Dr. melanogaster* с гиперэкспрессией в нервных клетках гена *APP*, *APP* с мутацией *Swedish*, а также с образованием A $\beta$ <sub>42</sub>.

2. Используя трансгенные линии *Dr. melanogaster*, изучить влияние экспрессии *APP*, *APP* с мутацией *Swedish*, последовательностей, кодирующих укороченные формы *APP*, а также образования A $\beta$ <sub>42</sub> на транскрипционную активность генов пресинаптических белков.

3. Определить влияние содержания особей *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид A $\beta$ <sub>42</sub>, на среде с дрожжами *Sac. cerevisiae*, продуцирующими красный пигмент, на уровень растворимого и агрегированного A $\beta$ <sub>42</sub> в мозге мух.

4. Исследовать влияние содержания трансгенных *Dr. melanogaster* на среде с дрожжами *Sac. cerevisiae*, продуцирующими красный пигмент, на продолжительность жизни и поведение мух.

**Научная новизна.** В работе продемонстрировано влияние гиперэкспрессии гена *APP* на развитие *Dr. melanogaster*. Показано, что нарушение экспрессии *APP* может независимо от A $\beta$  приводить к морфологическим аномалиям развития мух. Кроме того, оценено влияние как APP и его форм, так и A $\beta$ <sub>42</sub> на транскрипционные изменения генов пресинаптических белков синаптотагмина и нейронального синаптобревина в мозге *Dr. melanogaster*. Впервые *in vivo* продемонстрировано позитивное влияние потребления дрожжей-продуцентов красного пигмента на содержание растворимой и нерастворимой фракции A $\beta$ <sub>42</sub>, а также на когнитивные функции *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид A $\beta$ <sub>42</sub>.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Изучение

патогенетических основ развития БА – критически необходимое условие для создания полноценной многофакторной теории возникновения заболевания. Исследование роли основных участников патогенеза БА и анализ первичных транскрипционных и эпигенетических изменений важны не только с научной точки зрения, но и имеют значительный практический смысл, так как понимание механизмов, вызывающих начальные нейродегенеративные изменения – ключевое условие как для разработки новых методов диагностирования, так и для поиска новых эффективных терапевтических препаратов для лечения БА.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Нарушение нормальных функций белка APP ведет к активации иммунного ответа и соответствующей воспалительной реакции, вызывая тем самым патоморфологические дефекты развития и функционирования организмов.
- Нарушение метаболизма APP независимо от A $\beta$ <sub>42</sub> влияет на синаптическую плотность в мозге за счет негативной регуляции экспрессии генов синаптических белков. Определенный вклад в регуляцию транскрипции вносят эпигенетические факторы.
- Содержание трансгенных линий дрозофилы на среде с мутантными дрожжами *Sac. cerevisiae*, производящими красный пигмент, позитивно влияет на когнитивные функции и существенно снижает уровень A $\beta$ <sub>42</sub> в мозге.

**Апробация работы.** Результаты, предложенные к защите, были представлены на следующих отечественных и международных конференциях: V Международной научной конференции для студентов и аспирантов «Молодежь и прогресс биологии» (Львов, 2009); VII Международной научной конференции для студентов и аспирантов «Молодежь и прогресс биологии» (Львов, 2011); Европейской конференции по генетике человека (Готенбург, 2010); IX Курчатовской молодежной научной школе (Москва, 2011); Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» (Санкт-Петербург, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 4 статьи опубликованы в журналах, включенных в список ВАК, 1 статья – в научном сборнике и 4 статьи – в материалах российских и международных конференций.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и обсуждение, 25 рисунков, 5 таблиц, заключение, выводы и список литературы, содержащий 161 источник. Работа изложена на 104 страницах.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Материалы и методы исследования**

Были использованы следующие линии *Dr. melanogaster*: *UAS-APP* (содержит ген *APP* человека); *UAS-APP-Swedish* (содержит ген *APP* с мутацией *Swedish*); *UAS-APP $\Delta$ NT* (содержит укороченную форму гена *APP695*, в которой

последовательность сигнального пептида соединена напрямую с последовательностью, кодирующей А $\beta$ , трансмембранным доменом и цитоплазматическом хвостом); *UAS-APP $\Delta$ CT* (содержит укороченную форму гена *APP695*, в которой удалена большая часть цитоплазматического конца, за исключением короткого мембранного якоря); *UAS-APP.Abeta42* (содержит последовательность, кодирующую А $\beta_{42}$ ); *UAS-BACE* (содержит ген бета-секретазы человека); *UAS-PSEN1* (содержит ген пресенилина 1 человека); *UAS-PSEN1.M146V* (содержит ген пресенилина 1 человека с мутацией, приводящей к одноаминокислотному замещению M146V); *UAS-PSEN1.P267S* (содержит ген пресенилина 1 человека с мутацией, приводящей к одноаминокислотному замещению P267S); *UAS-GFP* (содержит последовательность, кодирующую белок GFP).

Экспрессия данных генов была проведена в системе GAL4-UAS при помощи активатора транскрипции *elav-Gal4*, запускающего транскрипцию в нервных клетках.

Линии получены из коллекции *Drosophila* Bloomington Stock Center. Мухи содержались на стандартной дрожжевой среде при температуре 25 °C при 12-часовом световом дне.

**В работе использованы следующие методы:** световая микроскопия, конфокальная микроскопия, ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, приготовление препаратов целых голов и парафиновых срезов мозга *Drosophila*, иммуногистохимические методы, методы анализа когнитивного состояния мух.

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Аномалии развития *Drosophila* с гиперэкспрессией гена *APP* и с образованием А $\beta$

Исследования полноразмерного APP показали его значимость в разнообразных процессах, в том числе и в развитии нейродегенерации. Например, было показано, что дупликация гена *APP* приводит к раннему развитию БА с аутосомно-доминантным типом наследования и церебральной амилоидной ангиопатии [Rovelet-Lecrux *et al.*, 2005]. Для более полного понимания функций белка APP мы экспрессировали ген *APP* человека и его мутантную форму *APP-Swedish*, приводящую к семейной форме заболевания, в нервных клетках *Dr. melanogaster*. Кроме того, мы провели совместную экспрессию этих генов с геном  $\beta$ -секретазы человека *BACE*. Так как у *Drosophila* есть все необходимые компоненты, ответственные за активность  $\gamma$ -секретазы, совместная экспрессия *APP* и *BACE* приводила к образованию А $\beta$  и последующему его отложению.

Мы обнаружили, что как экспрессия *APP*, так и образование А $\beta$  приводили к высокой летальности организмов на стадии куколки (рис. 1).

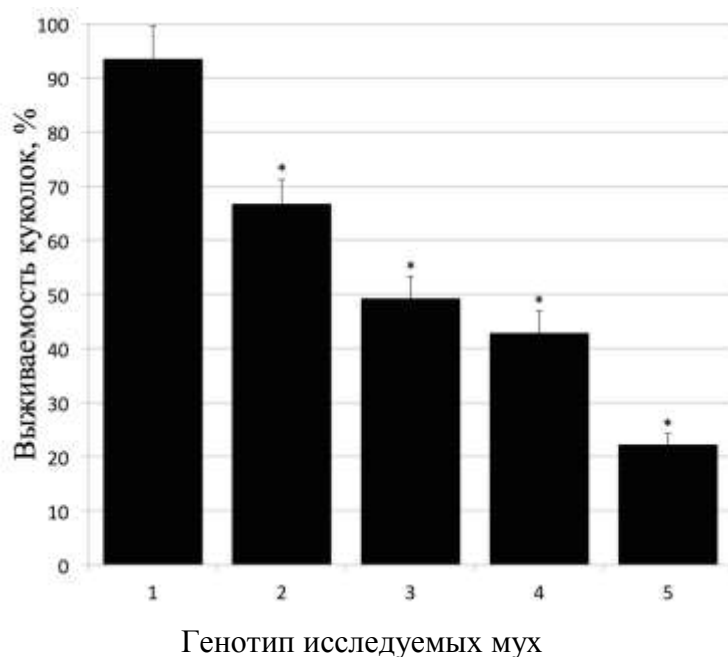


Рис. 1. Выживаемость куколок в зависимости от генотипа (%):  
 1 – *elav*, 2 – *elav;BACE/APP-SW*, 3 – *elav;BACE/APP*, 4 – *elav;APP-SW*, 5 – *elav;APP*

Экспрессия *APP* и *APP-Sw* в нервных клетках *Drosophila* как отдельно, так и совместно с *BACE* вызывала появление большого количества морфологических аномалий у взрослых мух, которые проявлялись в виде меланизации и некроза тканей в области хоботка, патологических изменений самого хоботка, недоразвитых крыльев и раздутых абдоменов, заполненных гемолимфой, что говорит об активном воспалительном процессе (рис. 2, 3).

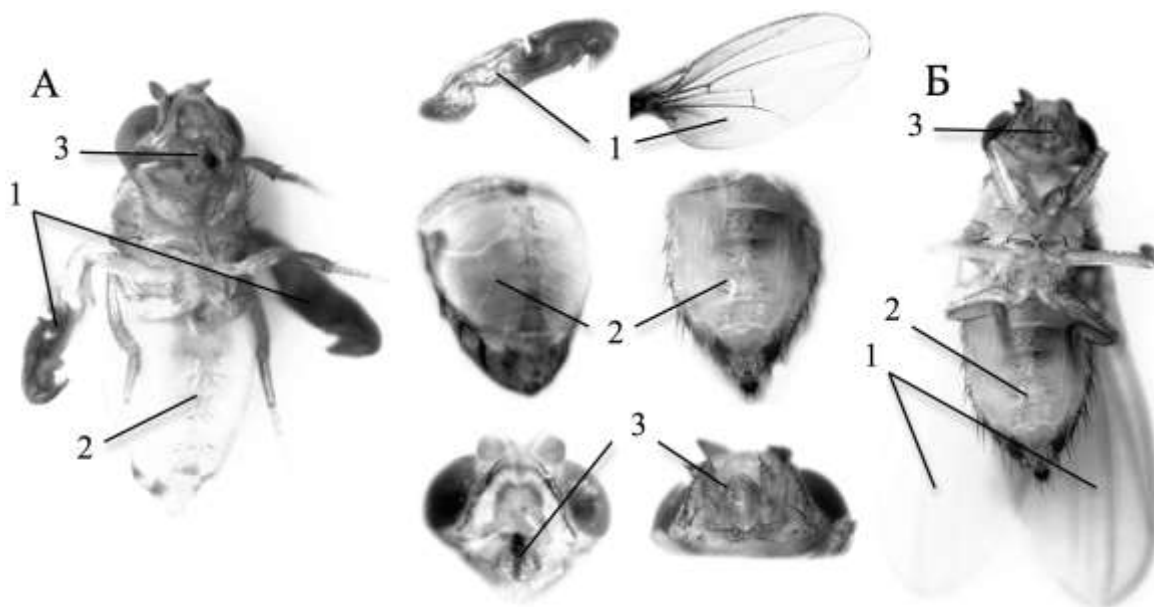


Рис. 2. Морфологические аномалии у мух с гиперэкспрессией *APP*:  
 А – гиперэкспрессия *APP* вызывает сильную деформацию и некроз хоботка, недоразвитие крыльев и раздутие абдомена; Б – мухи генотипа *elav* не обнаруживают морфологических аномалий.

1 – крылья, 2 – абдомен, 3 – хоботок

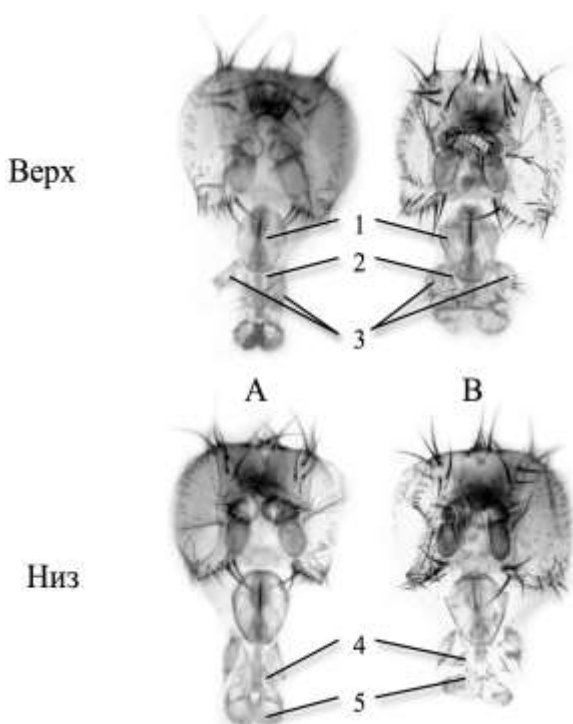


Рис. 3. Деформация хоботка у мух с гиперэкспрессией *APP*: А – мухи генотипа *elav* не обнаруживают морфологических изменений хоботка; В – гиперэкспрессия *APP* вызывает сильную деформацию хоботка. 1 – основание хоботка, 2 – верхняя губа, 3 – нижнечелюстные щупики, 4 – нижняя губа, 5 – лабеллумы с псевдотрахеями

У мух с аномальной морфологией наблюдалось появление асимметрии в строении основания хоботка и его увеличение на 20–30 % по сравнению с контролем. Кроме того, в отличие от контрольной линии у исследуемых мух наблюдалось также 20–30 %-ное утолщение верхней и нижней губы. Нижнечелюстные щупики также были заметно увеличены. При приблизительно одинаковой длине их ширина была на 30–50 % больше, чем у контрольной линии. Лабеллумы с псевдотрахеями были явно деформированы, что, по всей видимости, и приводило к невозможности потребления пищи.

Мы исследовали частоту встречаемости морфозов у взрослых мух различных генотипов, выращенных как на стандартной дрожжевой среде, так и на более питательной среде, содержащей мелассу. Среда с мелассой (далее в тексте м) была использована в эксперименте для оценки влияния калорийности на частоту возникновения аномальных морфологических изменений. Результаты эксперимента представлены на рис. 4.

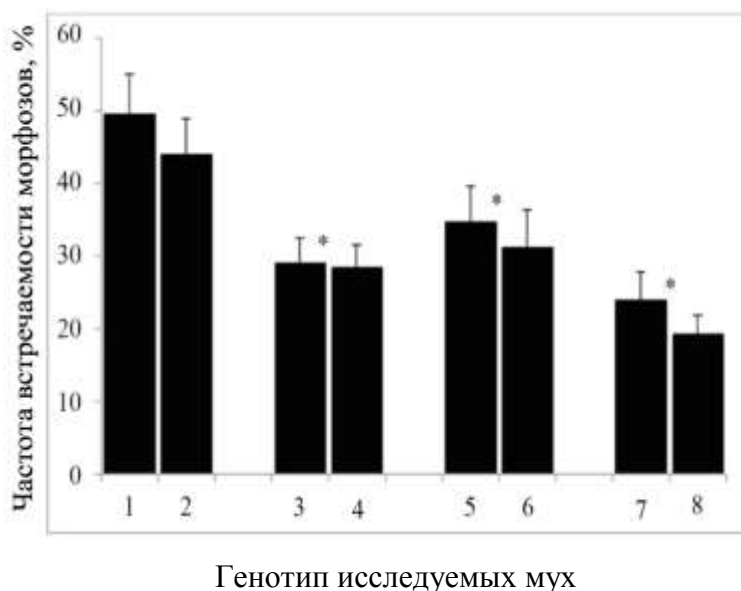


Рис. 4. Частота встречаемости морфозов (%):  
 1 – *elav;APP*,  
 2 – *elav;APP + м*,  
 3 – *elav;APP-Sw*,  
 4 – *elav;APP-Sw + м*,  
 5 – *elav;BACE/APP*,  
 6 – *elav;BACE/APP + м*,  
 7 – *elav;BACE/APP-Sw*,  
 8 – *elav;BACE/APP-Sw + м*



Как видно из приведенных выше графиков, частота проявления морфозов зависела от генотипа исследуемых мух. Наиболее часто морфозы встречались в линии с гиперэкспрессией *APP*. Мы наблюдали снижение их количества как у мух с гиперэкспрессией *APP-Sw*, так и с гиперэкспрессией *APP* и *BACE*. А для линии с одновременной гиперэкспрессией *APP-Sw* и *BACE* они были минимальны. Повышение питательности среды не оказало влияния на частоту возникновения морфологических аномалий.

Мы полагаем, что уменьшение количества морфозов при одновременной экспрессии *APP* и *BACE* объясняется падением уровня белка APP в нервных клетках *Drosophila*. Падение же количества морфозов при экспрессии гена *APP* с мутацией *Swedish*, возможно, объясняется ускорением процессинга APP.

Необходимо отметить, что экспрессия только последовательности, кодирующей A $\beta$ <sub>42</sub> в мозге трансгенных особей *Drosophila*, не приводила к описанным выше дефектам развития. Изучение трансгенных линий мух, несущих ген другого крупного трансмембранного белка человека *PSEN-1* или ген *BACE* также не выявило морфологических отклонений в развитии *Drosophila*. Полученные нами результаты показывают, что именно экспрессия *APP* в нервных клетках *Drosophila* приводит к наблюдаемым патологическим дефектам развития, что указывает на участие APP в процессах развития и морфогенеза. Кроме того, меланизация тканей и наполнение абдомена гемолимфой указывает на то, что гиперэкспрессия *APP* в мозге мух приводит к активации иммунного ответа организма.

## **2.2. Транскрипционные изменения генов *syt1* и *n-syb* в мозге взрослых мух при гиперэкспрессии *APP* и образовании A $\beta$**

Результаты многочисленных исследований показывают, что самым ранним проявлением БА является прогрессирующее падение синаптической плотности, сопровождаемое значительным снижением содержания основных пресинаптических белков в мозге больных БА [Davidsson *et al.*, 1998; Masliah and Terry, 1993]. Степень подобного падения коррелирует с тяжестью деменции и состоянием пациента.

В то же время изменение уровня белков, принимающих непосредственное участие в синаптической передаче и формировании синапсов, может идти разнонаправленно либо вообще не меняться. Так, Sze с соавт. показали, что уровни белков синапсин-1 и SNAP не менялись ни у пациентов с выраженной когнитивной дисфункцией, ни у пациентов с начальной стадией когнитивных изменений. В то же время уровень синаптоагмина значительно падал в областях, ответственных за формирование и консолидацию памяти – гиппокампе и энторинальной области коры головного мозга, а падение уровня синаптобревина наблюдалось независимо от исследуемого отдела [Sze *et al.*, 2000].

Анализ транскриптов на чипах Affymetrix HuFL, проведенный на аутоптатах мозга больных спорадической формой БА (средний возраст 82,7 года), показал снижение уровня транскриптов мРНК для основных классов синаптических белков [Yao *et al.*, 2003]. Параллельно с этим исследованием было показано значительное снижение уровня экспрессии гена *syt* [Mufson *et al.*, 2002] и генов

*VAMP1* и *VAMP2*, кодирующих две изоформы белка синаптобревина человека в мозге больных БА [Bossers *et al.*, 2009]. Следует заметить, что в этих экспериментах отсутствовали результаты для ранних стадий БА. Возможно, именно это обстоятельство не позволило отличить первичный эффект нарушения синаптогенеза от других эффектов нейропатологического процесса.

*Drosophila* содержит гомологи синаптических белков человека. Например, у *Drosophila* было выделено 7 различных изоформ белка *syt*, из которых только *sytl* обнаруживается в большом количестве в синапсах. Также было выделено 2 изоформы белка *syb*. Изоформа *n-syb* обнаруживается преимущественно в нейронах.

Ранее Sarantseva с соавт. показали существенное падение уровня белков *sytl* и *n-syb* при гиперэкспрессии *APP*, *APP-Sw* и при совместной их экспрессии с *BACE* в антеннальных долях и в грибовидном теле мозга *Drosophila* – структурах, отвечающих за формирование памяти и поведения, начиная с первых дней жизни животных. Подобные изменения плотности пресинаптических белков вызывали достоверное ухудшение памяти и способности к обучению, что было показано с помощью теста Тулли и Квина [Sarantseva *et al.*, 2009]. Оставалось, однако, неясным, какой механизм определяет снижение уровня синаптических белков в мозге трансгенных особей *Drosophila*.

Мы оценили изменение транскрипции генов синаптических белков *sytl* и *n-syb* как при образовании  $A\beta$ , так и при экспрессии полноразмерного *APP* и различных его форм. Это позволило нам разделить патологический эффект, оказываемый  $A\beta$  от эффекта, оказываемого непосредственно *APP* или его формами. Необходимо отметить, что в линиях с экспрессией генов, кодирующих укороченные формы *APP*, не происходит образования  $A\beta$  (из-за отсутствия бета-секретазы), но образуются C-концевые фрагменты *APP*.

Мы экспрессировали *APP*, его мутантную форму *APP-Swedish*, приводящую к семейной форме заболевания, его укороченные формы, а также ген *BACE* в нервных клетках *Dr. melanogaster*. Уровень мРНК генов *sytl*, *n-syb* анализировали у 2- и 30-дневных мух следующих генотипов: *elav* (в качестве контроля), *elav;APP*, *elav;APP-Swedish*, *elav;APP $\Delta$ CT*, *elav;APP $\Delta$ NT*, *elav;APP/BACE* и *elav;BACE;APP-Swedish*. Полученные данные были нормированы относительно контрольной линии с экспрессией гена *elav*.

Мы наблюдали падение уровня мРНК гена *sytl*, нормированного на соответствующие показатели для референсных генов *RP-49* и *GAPDH2*, на 2-й и на 30-й день (рис. 5).

Мы также наблюдали падение уровня мРНК гена *n-syb* (рис. 6).

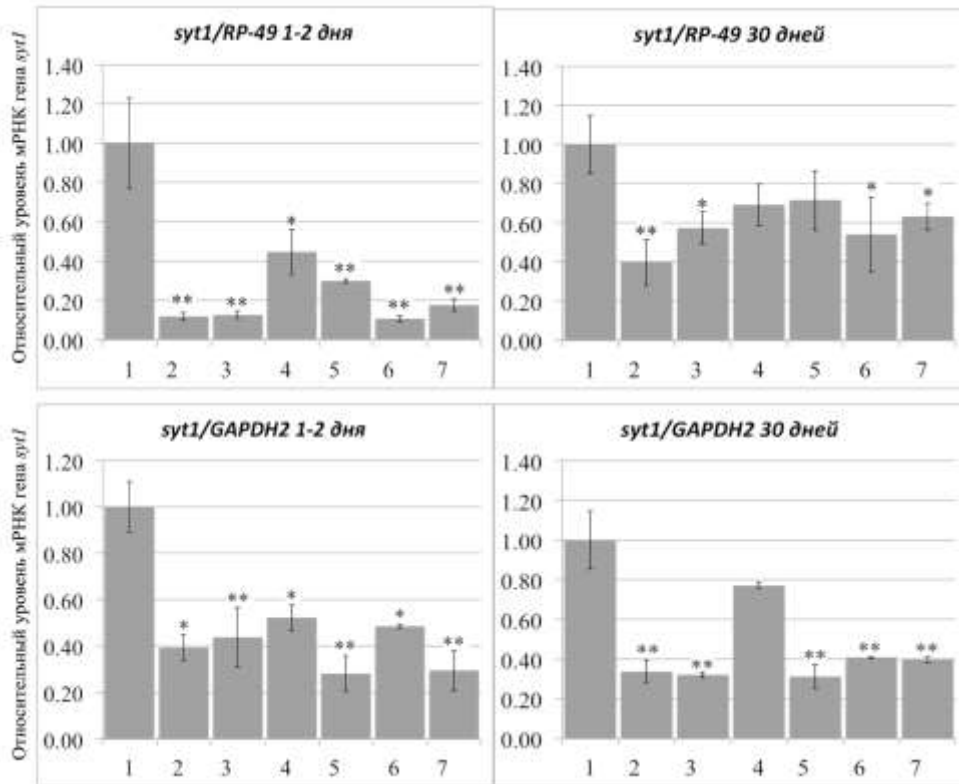


Рис. 5. Относительный уровень мРНК гена *syt1*:  
 1 – *elav*, 2 – *elav;APP*, 3 – *elav;APP-Swedish*, 4 – *elav;APPΔCT*, 5 – *elav;APPΔNT*,  
 6 – *elav;APP/BACE*, 7 – *elav;BACE;APP-Sw*. \* – статистически достоверное  
 отличие  $p \leq 0,05$ ; \*\* – статистически достоверное отличие  $p \leq 0,001$

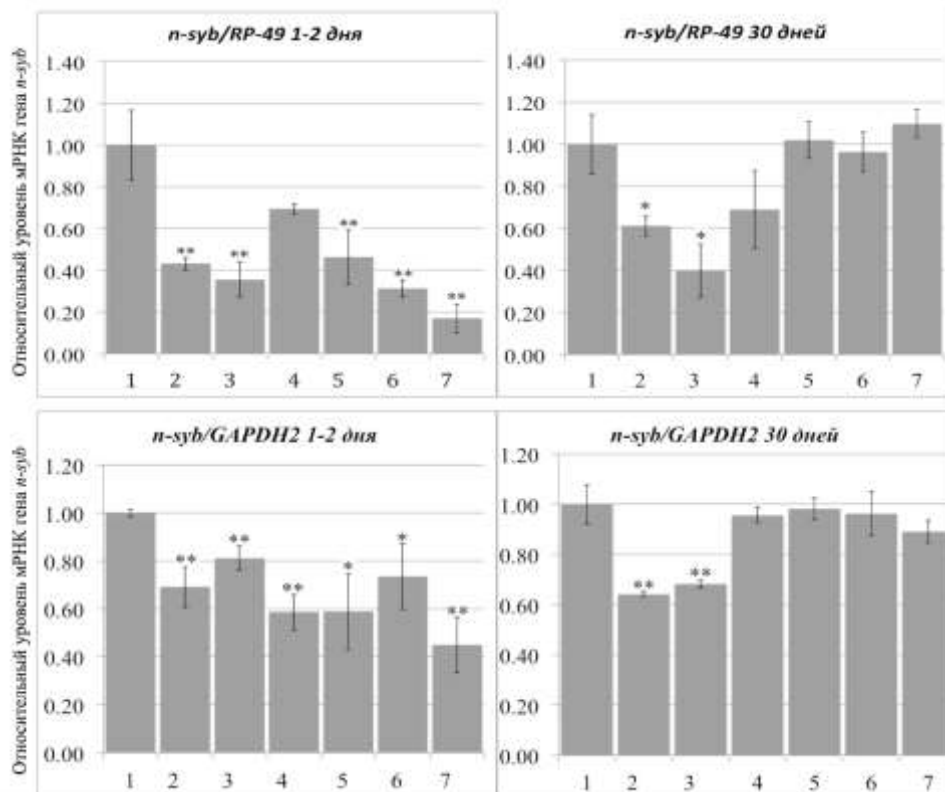


Рис. 6. Относительный уровень мРНК гена *n-syb*:  
 1 – *elav*, 2 – *elav;APP*, 3 – *elav;APP-Swedish*, 4 – *elav;APPΔCT*, 5 – *elav;APPΔNT*,  
 6 – *elav;APP/BACE*, 7 – *elav;BACE;APP-Sw*. \* – статистически достоверное  
 отличие  $p \leq 0,05$ ; \*\* – статистически достоверное отличие  $p \leq 0,001$

Мы также исследовали изменение уровня мРНК гена *psn* *Drosophila* при гиперэкспрессии *APP*, его форм и образовании  $A\beta$  (рис. 7). Мы показали отсутствие статистически значимого падения уровня м-РНК гена *psn* у 2-дневных мух и увеличение уровня экспрессии у 30-дневных, что демонстрирует избирательный негативный эффект *APP* и  $A\beta$  на экспрессию генов *syt1* и *n-syb*.

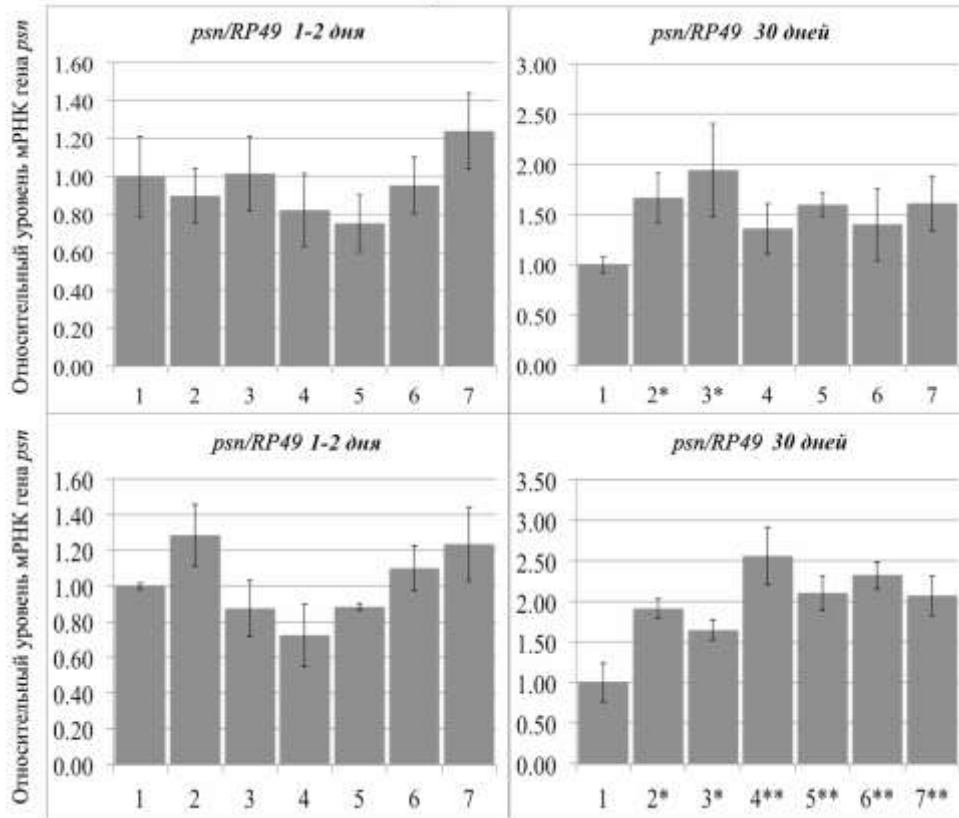


Рис. 7. Относительный уровень мРНК гена *psn*:

1 – *elav*, 2 – *elav;APP*, 3 – *elav;APP-Swedish*, 4 – *elav;APPΔCT*, 5 – *elav;APPΔNT*, 6 – *elav;APP/BACE*, 7 – *elav;BACE;APP-Sw*. \* – статистически достоверное отличие  $p \leq 0,05$ ; \*\* – статистически достоверное отличие  $p \leq 0,001$

Любопытно, что экспрессия другого гена трансмембранного белка человека пресенилина 1 (*PSEN-1*) и его мутантных форм в мозге мух не вызывала падение транскрипционной активности исследуемых генов синаптических белков (данные не показаны).

Таким образом, мы установили, что гиперэкспрессия *APP* изменяет уровень мРНК *syt1* и *n-syb*. Полученные данные указывают на его существенное падение уже на 2-й день жизни мух во всех исследованных трансгенных линиях с экспрессией как *APP* и его форм, так и в линиях с образованием  $A\beta$  (совместная экспрессия *APP* и *BACE*). Подобная картина сохранялась и на 30-й день для *syt1*, за исключением линий с экспрессией укороченных форм *APPΔCT* и *APPΔNT*. Интересно, что на 30-й день уровень мРНК *n-syb* снижался только в линиях с экспрессией полноразмерного *APP* (*APP* и *APP-Sw*). Как было отмечено ранее, трансгенные линии *Drosophila* позволяют разделить эффекты *APP* и  $A\beta$ . Мы полагаем, что наблюдаемое снижение уровня мРНК *syt1* и *n-syb* обусловлено экспрессией именно гена *APP* и независимо от секреции  $A\beta$ . Хотя наши эксперименты были проведены на трансгенных организмах, в литературе

представлены данные о том, что дупликации гена *APP* может приводить к развитию БА [Rovelet-Lecruх *et al.*, 2006].

Можно предположить, что важную роль в изменении уровня экспрессии пресинаптических генов может играть C-концевой фрагмент белка APP – AICD – небольшой пептид размером в 6-kDa, отщепляющийся в результате действия гамма-секретазы. Показано, что AICD может проникать в ядро, связываться с различными внутриклеточными адапторными белками, влияя через них на многие клеточные процессы, в частности генную экспрессию, синаптическую пластичность и память [Kim *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2007; Cao, Sudhof, 2001; Gao, Pimplikar, 2001]. С другой стороны, не только фрагменты APP, но и он сам может участвовать в регуляции транскрипции. Так гиперэкспрессия APP в нейронах уменьшала уровень мРНК белков, участвующих в обороте холестерина (SREBP, HMGCR, cholesterol 24-hydroxylase) [Pierrot *et al.*, 2013].

Таким образом, нарушения процессов транскрипции генов синаптических белков могут лежать в основе изменения синаптической плотности, наблюдаемой при БА, и являются одним из ранних признаков заболевания. Изменение экспрессии гена *APP* или мутации в нем могут приводить к уменьшению уровня мРНК синаптических белков и вызывать синаптическую патологию при БА.

### **2.2.1. Метилирование ДНК как один из факторов, регулирующих активность генов синаптических белков в трансгенных особях *Drosophila***

Одной из причин изменения транскрипционной активности генов может быть изменение статуса метилирования промоторной области исследуемых генов. Эпигенетическая регуляция активности генома путем метилирования остатков цитозина – широко распространенное в природе явление, наблюдаемое у многих представителей эукариот. Долгое время считалось, что у *Drosophila* метилирование ДНК либо отсутствует полностью, либо не играет существенной роли в регуляции активности генов. В основном это объяснялось отсутствием у *Drosophila* гомологов канонических метилтрансфераз человека. Кроме того, не было показано наличие 5-метилцитозина в геноме *Drosophila* [Kunert *et al.*, 2003; Gowher *et al.*, 2000]. Однако последние исследования показали, что геном *Drosophila* содержит ген *MT-2*, который кодирует белок, обладающий метилтрансферазной активностью [Kunert *et al.*, 2003]. Более сложный анализ ДНК позволил также обнаружить метилированный цитозин в ДНК, полученный на разных этапах развития *Drosophila*, в том числе и на стадии имаго, где он обнаруживается в концентрации 1 метилированный цитозин на 1 000 – 2 000 неметилированных [Gowher *et al.*, 2000]. Таким образом, несмотря на не столь масштабный уровень метилирования генома *Drosophila* по сравнению с млекопитающими, данная эпигенетическая регуляция может влиять на транскрипционную активность генов.

Мы предположили, что именно изменение статуса метилирования генома *Drosophila* при гиперэкспрессии *APP* и образовании А $\beta$  ответственно за угнетение транскрипционной активности исследуемых генов.

Мы оценили изменение статуса метилирования промоторных областей исследуемых генов. Статус метилирования гена *syt1* на 2-й и 30-й день представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Статус метилирования гена *syt1***

Генотип	Кол-во дней, % метилирования	
	1–2 дня	30 дней
<i>elav</i> (контроль)	100 ± 3	100 ± 2
<i>elav;APP</i>	119 ± 5*	118 ± 3*
<i>elav;APP-Swedish</i>	116 ± 2*	119 ± 5*
<i>elav;APPΔCT</i>	109 ± 4	118 ± 9
<i>elav;APPΔNT</i>	114 ± 3*	106 ± 2
<i>elav;BACE/APP</i>	105 ± 3	108 ± 3
<i>elav;BACE;APP-Sw</i>	110 ± 4	101 ± 4

\* – статистически достоверное отличие  $p \leq 0,05$ .

Из таблицы 1 видно, что статус метилирования промоторной области гена *syt1* на 2-й день после вылупления имеет тенденцию к росту во всех исследуемых линиях со статистически значимыми изменениями в линиях с экспрессией *APP*, *APP-Swedish* и *APPΔNT*, что коррелирует с данными по экспрессии этого гена. Подобная тенденция сохраняется и на 30-й день жизни мух.

Несмотря на полученный в эксперименте незначительный рост уровня метилирования промоторной области гена *n-syb*, мы не наблюдали статистически значимых изменения ни на 2-й, ни на 30-й день.

**2.3. Изучение влияния содержания взрослых особей *Dr. melanogaster* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид Aβ<sub>42</sub>, на среде с дрожжами-продуцентами красного пигмента на амилоидогенез и нейродегенеративные процессы в мозге мух**

Согласно наиболее популярной сегодня «амилоидной гипотезе» [Hardy, Higgins, 1992], нарушение синаптических функций в мозге, лежащее в основе потери памяти при БА, является результатом действия растворимых олигомеров Aβ [Ferreira, Klein, 2011]. Несмотря на описание других механизмов, возможно перекрывающихся с образованием Aβ, основные стратегии разработки терапии для БА в последние годы были сконцентрированы на поиске соединений, снижающих уровень Aβ [Giacobini, Becker, 2007]. Следовательно, терапия при БА должна восстанавливать в мозге гомеостаз Aβ, который может быть нарушен в результате изменений в образовании и клиренсе Aβ [Hardy, Higgins, 1992; Hardy, 2002; Hardy, 2006].

Мы оценили влияние содержания взрослых особей *Dr. melanogaster* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид Aβ<sub>42</sub>, на среде с дрожжами-продуцентами красного пигмента на амилоидогенез и нейродегенеративные процессы в мозге мух.

Известно, что мутации в генах *ADE-1* и (или) *ADE-2* приводят к накоплению в цитоплазме клеток дрожжей *Sac. cerevisiae* 5'-аминоимидазолрибозида, который после полимеризации и присоединения некоторых аминокислот образует красный пигмент, в результате колонии мутантных дрожжей приобретают характерную красную окраску. Было обнаружено, что дрожжи красного штамма имеют значительно сниженный уровень общего амилоида по сравнению с «белыми» дрожжами. Интересно, что штамм дрожжей, изогенный красному штамму, несущий дополнительную мутацию в гене *ADE6*, блокирующую синтез аденина на ранней стадии и не образующий в результате этого красный пигмент, имел значительно более высокий уровень общего амилоида. Это позволяет сделать вывод об антиамилоидных свойствах красного пигмента. Было также показано, что добавление красного пигмента к разрушенным клеткам «белого» штамма снижало уровень общего амилоида, из чего можно сделать вывод об эффективности красного пигмента *in vitro*. В другом опыте антиамилоидный эффект красного пигмента был показан на фибриллах инсулина. В определенных условиях мономеры инсулина способны агрегировать и образовывать фибриллы. Осветленный дрожжевой лизат, содержащий красный пигмент, добавляли к фибриллам инсулина. Эффект анализировали путем определения уровня флуоресценции тиофлавина Т, способного связываться с амилоидизированными белками. Было выявлено значительное снижение уровня флуоресценции в пробах с добавленным красным пигментом по сравнению с пробами, в которые был добавлен лизат, полученный из изогенного «белого» штамма [Nevzglyadova *et al.*, 2011, Михайлова и др., 2011]. Кроме того, добавление чистого экзогенного красного пигмента к трансформированным дрожжам, в которых происходит образование Аβ, существенно снижало содержание Аβ в лизатах, что было показано как с помощью анализа уровня флуоресценции тиофлавина Т, так и с помощью вестерн-блоттинга [данные готовятся к публикации].

Приведенные выше данные, а также тот факт, что дрожжи служат природным кормом для плодовой мушки, стали основой эксперимента по оценке влияния потребления штамма-производителя красного пигмента дрозофилой на амилоидизацию.

Трансгенные *Drosophila melanogaster* с экспрессией последовательности человеческого Аβ<sub>42</sub> в нервных клетках – широко используемая модель для изучения патогенеза Аβ *in vivo*. Было показано, что экспрессия Аβ в нейронах мозга приводила к прогрессирующей с возрастом нейродегенерации, нарушениям локомоторных функций и преждевременной гибели мух. Так как дрожжи служат природным кормом для плодовой мушки, для проведения эксперимента было достаточно содержать трансгенных мух на среде с «красным» и «белым» изогенным штаммом дрожжей. По истечении необходимого для опыта времени содержащиеся на разных штаммах особи *Drosophila* сравнивались по проявлению перечисленных выше черт патогенеза.

Было оценено влияние потребления красного штамма дрожжей на содержание Аβ в мозге имаго трансгенных особей *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей Аβ<sub>42</sub>.

С помощью иммуногистохимии и конфокальной микроскопии было подтверждено отложение  $A\beta_{42}$  в мозге трансгенных мух. Пример опыта представлен на рис. 8.

Как видно из рисунка,  $A\beta_{42}$  детектировался только в особях *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей  $A\beta_{42}$ . В контрольной линии сигнал отсутствовал.

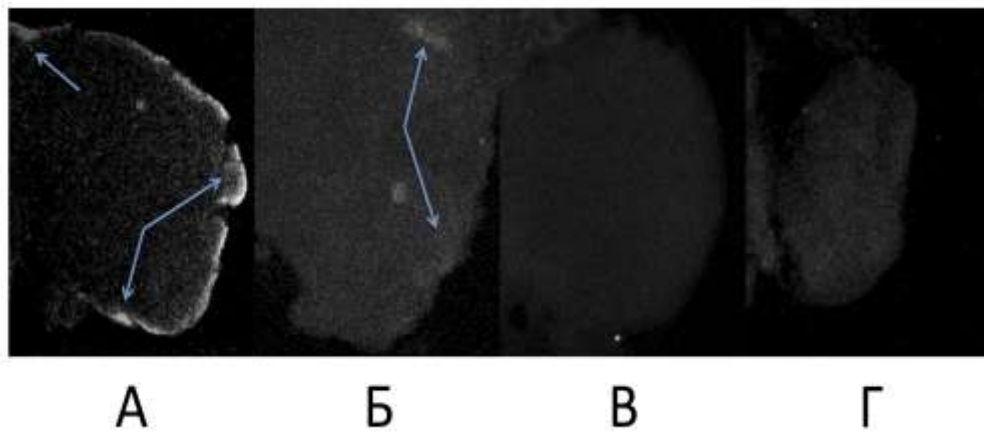


Рис. 8. Детекция отложения  $A\beta$  в мозге мух:  
 А – *elav;Aβ<sub>42</sub>* («белые» дрожжи); Б – *elav;Aβ<sub>42</sub>* («красные» дрожжи);  
 В – контроль *elav* («белые» дрожжи); Г – контроль *elav* («красные» дрожжи)

Для количественной оценки содержания  $A\beta_{42}$  методом вестерн-блота было проведено измерение его уровня в мозге мух, потреблявших в пищу как «красные», так и «белые», не продуцирующие красный пигмент дрожжи. Относительное содержание  $A\beta_{42}$  было нормировано на  $\alpha$ -tubulin. Пример эксперимента приведен на рис. 9.

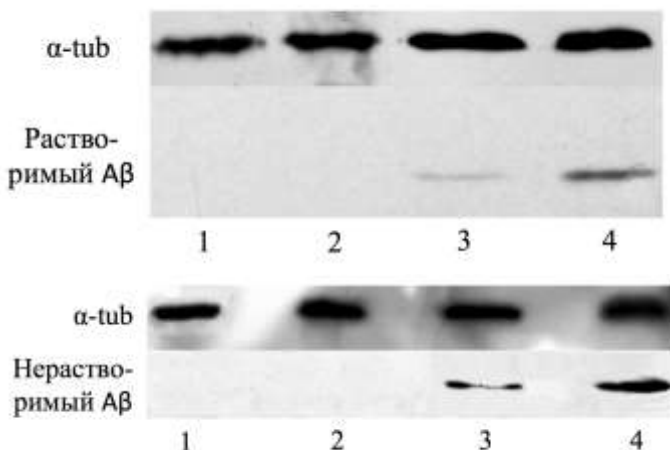


Рис. 9. Пример вестерн-блота по определению уровня  $A\beta_{42}$ :  
 1 – контроль *elav* («красные» дрожжи),  
 2 – контроль *elav* («белые» дрожжи),  
 3 – *elav;Aβ<sub>42</sub>* («красные» дрожжи),  
 4 – *elav;Aβ<sub>42</sub>* («белые» дрожжи)

В мухах, потреблявших в пищу «красные» и «белые» дрожжи, относительное содержание растворимой фракции  $A\beta_{42}$  составило  $0,095 \pm 0,04$  и  $0,31 \pm 0,04$  соответственно. Подобные результаты были получены и для нерастворимой фракции. В этом случае содержание нерастворимой фракции  $A\beta_{42}$  при содержании мух на среде с «красными» дрожжами составило  $0,16 \pm 0,06$ , с «белыми» –  $0,60 \pm 0,13$  (рис. 10).



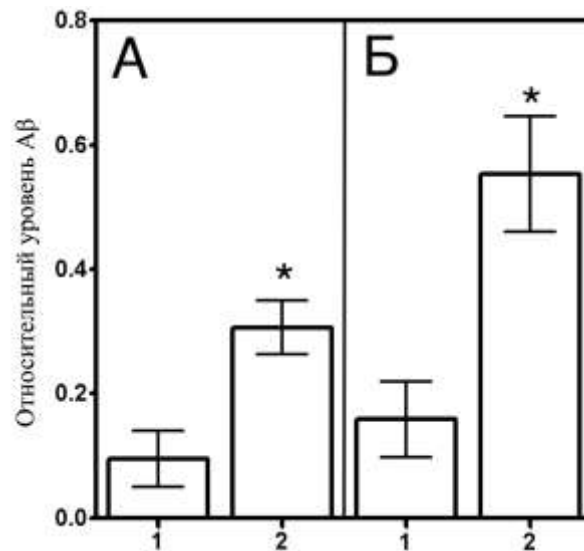


Рис. 10. Относительный уровень  $A\beta_{42}$  в мозге мух, содержащихся на «красных» и «белых» дрожжах: А – растворимая фракция  $A\beta_{42}$ ; Б – нерастворимая фракция  $A\beta_{42}$ : 1 – *elav;Aβ<sub>42</sub>* («красные» дрожжи), 2 – *elav;Aβ<sub>42</sub>* («белые» дрожжи)

Чтобы удостовериться, что наблюдаемый нами эффект не является следствием общего угнетения транскрипционной активности в результате потребления пигментобразующих дрожжей и (или) негативной регуляции системы *GAL4-UAS*, мы провели схожий эксперимент на трансгенных особях *Drosophila* с экспрессией гена белка GFP. В эксперименте использовались мухи, полученные в результате скрещивания линии *elav-GAL4* и линии *UAS-GFP*. Было показано, что уровень GFP в мозге 20-дневных мух, потреблявших в пищу «красные» дрожжи, не отличался от такового в мухах, развивавшихся на «белом» штамме (рис. 11). Относительное содержание GFP было нормировано на  $\alpha$ -tubulin.

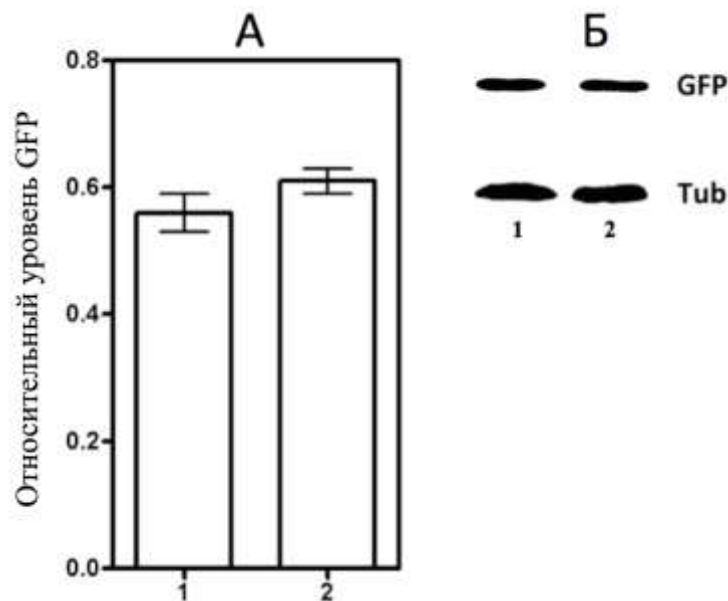


Рис. 11. Уровень GFP в мозге трансгенных особей *Drosophila* в зависимости от штамма дрожжей, на которых они развивались: А – относительное содержание GFP в мозге *Drosophila*; Б – пример вестерн-блота: 1 – *elav;GFP* («красные» дрожжи), 2 – *elav;GFP* («белые» дрожжи)

Таким образом, мы показали достоверное снижение уровня  $A\beta_{42}$  в мозге мух, потреблявших в пищу дрожжи-продуценты красного пигмента. Согласно работам Yerbury с соавт., в агрегировании олигомеров  $A\beta$  и стабилизации агрегатов существенную роль играют белки-шапероны. Например, одним из участников патологического процесса является белок кластерин, обнаруживаемый в существенном количестве в амилоидных бляшках. Этот белок-шаперон, связываясь с  $A\beta$ , усиливает агрегационный потенциал пептида. Любопытно, что подобный негативный эффект кластерина наблюдается только при аномально высоком образовании  $A\beta$ . Нарушение связи кластерина с  $A\beta$  замедляет дальнейшее отложение амилоида. Возможно, наблюдаемый нами позитивный эффект содержания трансгенных мух на «красных дрожжах» объясняется именно нарушением связи кластерина с  $A\beta$  за счет конкурентного связывания красного пигмента с  $A\beta$ , что было описано ранее в работе Nevzglyadova с соавт.

На следующем этапе мы оценили нейропротекторный эффект кормления трансгенных мух штаммом-продуцентом красного пигмента.

Нейродегенерация, вызываемая  $A\beta_{42}$ , проявляется в виде хаотично расположенных вакуолей округлой формы в нейропиле и в районе клеток Кеньона. Оценка уровня нейродегенерации проводилась на 30-й день жизни трансгенных особей (рис. 12).

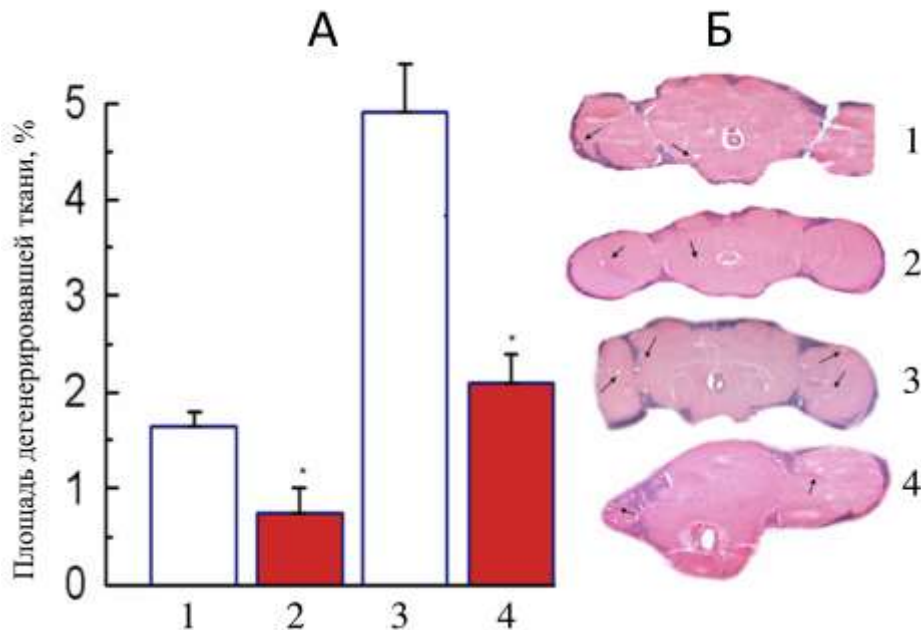


Рис. 12. Эффект содержания трансгенных особей *Drosophila* на среде с красным штаммом дрожжей на нейродегенерацию:

А – уровень нейродегенерации; Б – срезы мозга: 1 – контроль *elav* («белые» дрожжи), 2 – контроль *elav* («красные» дрожжи), 3 – *elav;A\beta\_{42}* («белые» дрожжи), 4 – *elav;A\beta\_{42}* («красные» дрожжи). Стрелками указаны места вакуолизации

Нейродегенерация – нормальный процесс старения мозга, что объясняет наличие вакуолей в мозге мух контрольных линий.

Из приведенных выше данных видно, что потребление трансгенными особями «красных» дрожжей эффективно снижало нейродегенеративные

процессы, вызываемые экспрессией последовательности, кодирующей  $A\beta_{42}$ , в мозге мух.

Оценка выживаемости проводилась на трансгенных мухах, в мозге которых происходит образование  $A\beta_{42}$ . Исследуемые мухи употребляли в пищу как «белые», так и «красные» дрожжи (рис. 13).

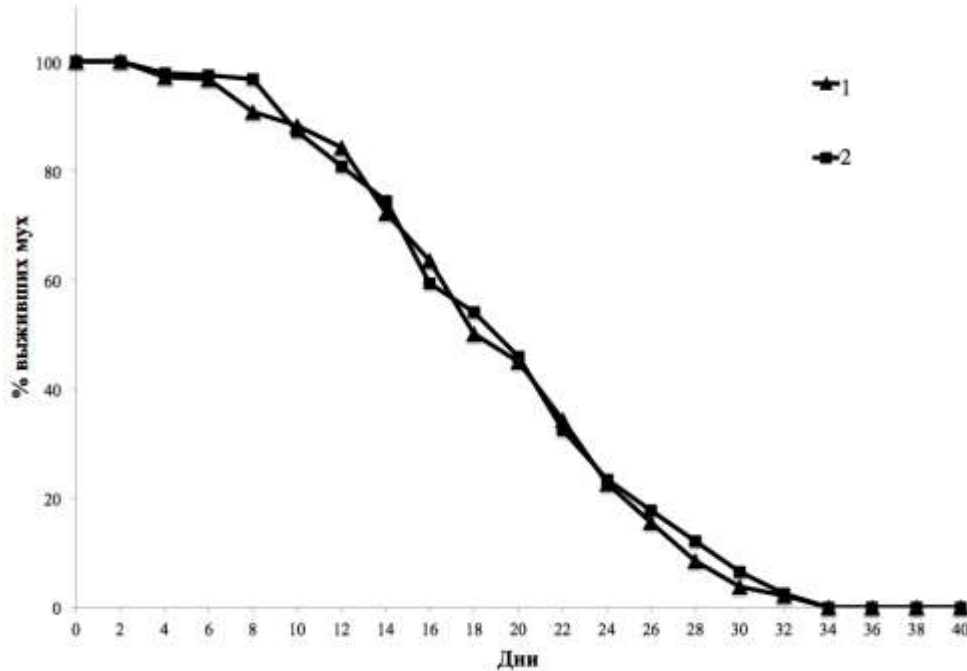


Рис. 13. Эффект потребления красных дрожжей трансгенными особями *Drosophila* на выживаемость: 1 – *elav; A\beta\_{42}* («белые» дрожжи), 2 – *elav; A\beta\_{42}* («красные» дрожжи)

Как видно из рис. 13, потребление красного штамма дрожжей не оказывало влияния на продолжительность жизни исследуемых трансгенных особей *Drosophila*.

Оценка локомоторной активности была проведена для взрослых мух, в клетках мозга которых образовывался  $A\beta_{42}$ . Личинок трансгенных особей *Drosophila* содержали на среде или с «белыми», или с «красными» дрожжами. В качестве контроля были использованы мухи генотипа *elav/+*. Полученные данные приведены в табл. 2.

Таблица 2

**Локомоторная активность мух различных генотипов на 10-й и 20-й день после вылупления**

Генотип	«Белые» дрожжи		«Красные» дрожжи	
	10 дней, %	20 дней, %	10 дней, %	20 дней, %
<i>elav</i> (контроль)	78,8 ± 2,8	56,5 ± 4,2	81,4 ± 2,7	60,2 ± 5,3
<i>elav; A\beta_{42}</i>	41,2 ± 3,1	1,3 ± 0,1	82,5 ± 2,2*	5,5 ± 1,4*

\* – процентное количество мух, обладающих нормальной локомоторной активностью, % (согласно методу измерения локомоторной активности плодовых мушек); статистически достоверное отличие  $p \leq 0,05$ .

Как видно из табл. 2, трансгенные животные с экспрессией последовательности, кодирующей  $A\beta_{42}$ , демонстрировали по сравнению с контролем значительное падение локомоторной активности уже на 10-й день жизни. В то же время наблюдаемое падение было частично компенсировано у мух, потреблявших «красные» дрожжи в пищу. Особенно ярко улучшение локомоторной активности проявлялось на 10-й день. Статистически значимого изменения локомоторной активности мух контрольной линии, потреблявших «красные» дрожжи, обнаружено не было.

Для анализа влияния когнитивного состояния исследуемых мух были оценены их память и способность к обучению на 10-й и 20-й день жизни. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

**Память и способность к обучению трансгенных мух с экспрессией  $A\beta_{42}$ , содержащихся на «красных» или «белых» дрожжах**

Генотип	Штамм дрожжей	Возраст животных			
		10 дней		20 дней	
		индекс обучаемости, %	индекс памяти, %	индекс обучаемости, %	индекс памяти, %
<i>elav</i> (контроль)	«белые» дрожжи	44,5 ± 3,6	55,1 ± 4,2	37,7 ± 2,6	25,8 ± 1,1
	«красные» дрожжи	53,1 ± 5,3	61,1 ± 3,7	25,7 ± 3,3	32,6 ± 2,6
<i>elav;A\beta_{42}</i>	«белые» дрожжи	14,5 ± 2,1	13,2 ± 2,3	3,6 ± 1,2	2,4 ± 0,8
	«красные» дрожжи	28,3 ± 3,2*	24,7 ± 2,1*	25,1 ± 5,4*	22,1 ± 4,6*

\* – статистически достоверное отличие  $p \leq 0,05$ .

«Красные» дрожжи не привели к статистически значимым изменениям индекса обучаемости и памяти у мух контрольной линии *elav/+* ни на 10-й, ни на 20-й день жизни. Иная картина наблюдалась у мух с экспрессией последовательности, кодирующей  $A\beta_{42}$ . Был обнаружен значительный рост обоих индексов у трансгенных мух, потреблявших «красные» дрожжи.

Как видно из приведенных данных, эффект от содержания трансгенных мух на красном штамме дрожжей возрастал по мере старения мух. Наблюдаемое улучшение когнитивных функций трансгенных мух согласуется со значительным падением уровня  $A\beta$  в мозге и снижением нейродегенерации. Максимальный эффект наблюдался на 20-й день жизни трансгенных мух.

Принимая во внимание антиамилоидогенные свойства красного пигмента, показанные как *in vivo* на дрожжах, так и *in vitro* на инсулиновых и амилоидных фибриллах, мы пришли к выводу, что именно красный пигмент ответственен за падение уровня  $A\beta_{42}$  в мозге *Drosophila*, а также за сопровождающее его улучшение когнитивного состояния трансгенных мух. Мы полагаем, что красный пигмент – интересное соединение, требующее более пристального изучения в

контексте его способности подавлять образование или агрегацию А $\beta$  и деградацию когнитивных функций.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На текущий момент очевидно, что простого ответа на вопрос о причинах возникновения БА не существует. Многофакторность заболевания требует понимания роли всех участников нейродегенеративных процессов. На сегодняшний день изучение таких белков, как APP, PSEN-1, APOE и др. и анализ их функций – одно из важных направлений в исследовании БА. Для этих целей широко используются разнообразные трансгенные линии *Drosophila*. Относительная простота манипуляции с геномом *Drosophila*, короткий жизненный цикл, небольшие размеры и стоимость содержания позволяет в короткие сроки оценить влияние интересующих объектов исследования на биохимические процессы, происходящие в организме. Используя разнообразные трансгенные линии *Drosophila*, мы показали важную роль APP в онтогенезе мух, в активации воспалительного ответа, а также в развитии нейродегенерации. С помощью *Drosophila* мы продемонстрировали антиамилоидогенный эффект содержания мух на среде с дрожжами-продуцентами красного пигмента. Мы также показали, что трансгенные мухи, содержащиеся на среде с «красными» дрожжами, имели более высокие когнитивные показатели, что объясняется падением уровня нейродегенерации мозга. Полученные данные представляют интерес для разработки нового метода лекарственной терапии БА.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена APP человека в нервных клетках *Dr. melanogaster* приводит к увеличению гибели куколок и морфологическим дефектам имаго дрозофилы, что говорит о влиянии APP как на жизнеспособность особей, так и на процессы развития и морфогенеза.
2. Уровень мРНК генов пресинаптических белков синаптоагмина-1 и нейронального синаптобревина снижается при экспрессии APP и его форм уже на ранних этапах жизни имаго *Dr. melanogaster*, что предполагает участие APP или его фрагментов в регуляции транскрипции определенных генов.
3. Наблюдаемые морфологические аномалии обусловлены именно гиперэкспрессией APP, а не образованием А $\beta$ .
4. При содержании мух на среде с мутантными по гену ADE-2 дрожжами происходит подавление процесса нейродегенерации, улучшаются локомоторные функции, обучаемость и память трансгенных особей *Dr. melanogaster*, воспроизводящих основные признаки болезни Альцгеймера, а также снижается содержание как растворимой, так и нерастворимой фракций А $\beta$ <sub>42</sub> в мозге трансгенных мух. Полученные данные представляют интерес при разработке новых методов антиамилоидогенной терапии.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O., Karaseva E., Rodin D., Schwarzman A., Vitek M. Apolipoprotein E-Mimetics Inhibit Neurodegeneration and Restore Cognitive Functions in a Transgenic *Drosophila* Model of Alzheimer's Disease // PLoS ONE. 2009. V. 4. No. 12. P. e8191.
2. Саранцева С. В., Родин Д. И., Шварцман А. Л. Экспрессия гена *APP* человека в нервных клетках *Drosophila melanogaster* вызывает снижение уровня мРНК синаптотактина // ДАН. 2012. Т. 442. № 2. С. 279–281.
3. Родин Д. И., Шварцман А. Л., Саранцева С. В. Современные подходы к терапии при болезни Альцгеймера: от амилоида к поиску новых мишеней // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2014. Т. XXI. № 1. С. 14–16.
4. Rodin D., Bolshakova O., Kislik G., Sarantseva S. Morphological Abnormalities in *Drosophila* with Overexpression of Human *APP* Gene // Open Journal of Animal Sciences. 2013. V. 3. No. 4B. P. 49–52.

### Публикации в других изданиях

1. Саранцева С.В., Большакова О.И., Кузовкова Е.Ф., Родин Д.И., Тимошенко С.И. Моделирование нейродегенеративных заболеваний человека на трансгенных животных // Сборник «Бреслеровские чтения II: молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня». С. 224-235.
2. Rodin D., Karaseva E., Kislik G. Neuropathological Processes Associated with Alzheimer's Disease, Their Modeling and Therapy Approaches in *Drosophila melanogaster* // Youth and Progress of Biology. Lviv, 2009. P. 285–286.
3. Rodin D., Kislik G., Vitek M., Sarantseva S. Overexpression of Human Amyloid Precursor Protein Causes Neurodegeneration and Impairment of Cognitive Functions in Transgenic *Drosophila melanogaster* // European Conference of Human Genetics. Gothenburg, 2010. P. 216.
4. Родин Д. И., Саранцева С. В. Моделирование и коррекция нейропатологических процессов при болезни Альцгеймера в *Drosophila melanogaster* // IX Курчатовская молодежная научная школа. Москва, 2011. С. 125.
5. Tkachenko N., Rodin D., Sarantseva S. Analysis of Synaptic Genes Expression in the Brain of Transgenic *Drosophila* with Overexpression of Human *APP* and Human *SNCA* Genes // 23<sup>rd</sup> European *Drosophila* Research Conference. Barcelona, 2013. P. 184.