

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР "КУРЧАТОВСКИЙ
ИНСТИТУТ" ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ ИМ. Б.П.
КОНСТАНТИНОВА

На правах рукописи

РОДИН Дмитрий Игоревич

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

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Саранцева С.В.

Санкт-Петербург
2014

Список сокращений	5
Введение	6
1. Обзор литературы	12
1.1 Нейродегенеративные заболевания.....	12
1.2 Болезнь Альцгеймера (БА): клиническая и патоморфологическая симптоматика, диагностика и лечение.....	12
1.2.1 Патоморфологические и патогистологические признаки БА.....	14
1.2.2 Семейные и спорадические формы БА.....	18
1.2.3 Участники патологических процессов при БА.....	22
1.3 Эпигенетика и БА.....	25
1.3.1 Эпигенетическая модификация гистонов при БА.....	26
1.3.2 Метилирование ДНК при БА.....	26
1.3.3 Роль микроРНК в БА.....	27
1.4 Лечение БА: существующие лекарственные препараты и препараты, находящиеся в разработке.....	28
1.5 Моделирование основных признаков БА на животных.....	36
2. Материалы и методы	40
2.1 Линии мух, использованные в работе, и условия их содержания...	40
2.2 Анализ выживаемости трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i> на стадии куколки.....	42
2.3 Приготовление образцов для микроскопии морфологических изменений внешних органов и ротового аппарата трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i> на стадии имаго.....	43
2.4 Оценка количества морфологических аномалий в трансгенных особях <i>Drosophila melanogaster</i>	43
2.5 Выделение РНК.....	44
2.6 Обратная транскрипция.....	44

2.7 Проведение ПЦР в реальном времени.....	44
2.8 Определение статуса метилирования промоторной области генов <i>syt1</i> и <i>n-syb</i>	47
2.9 Анализ выживаемости трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i> на стадии имаго.....	48
2.10 Определение и анализ уровня нейродегенерации в мозге взрослых трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i>	48
2.11 Подготовка образцов и проведение конфокальной микроскопии для детекции амилоида в мозге имаго <i>Drosophila melanogaster</i>	49
2.12 Оценка изменения локомоторной активности, способности к обучению и формированию памяти трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i> на стадии имаго.....	59
2.13 Измерение уровня белков в мозге трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i>	51
2.14 Статистическая обработка данных.....	53
3. Результаты и обсуждение.....	54
3.1 Аномалии развития <i>Drosophila</i> с гиперэкспрессией гена <i>APP</i> и с образованием А β	54
3.1.1 Выживаемость на стадии куколки трансгенных особей <i>Drosophila</i> с гиперэкспрессией гена <i>APP</i> человека и образованием А β	54
3.1.2 Морфологические изменения имаго <i>Drosophila</i> с гиперэкспрессией гена <i>APP</i> человека и образованием А β	55
3.1.3 Распределение морфологических аномалий имаго <i>Drosophila</i> в зависимости от генотипа исследуемых мух.....	59
3.2 Транскрипционные изменения генов синаптических белков в мозге взрослых мух при гиперэкспрессии <i>APP</i> и образовании А β	63
3.2.1 Изменение уровня мРНК генов <i>syt1</i> и <i>n-syb</i> в мозге взрослых трансгенных особей <i>Drosophila</i>	65
3.3 Метилирование ДНК как один из факторов, регулирующих	

активность генов синаптических белков в трансгенных особях <i>Drosophila</i>	72
3.4 Изучение влияния содержания взрослых особей <i>Drosophila melanogaster</i> с экспрессией последовательности, кодирующей пептид A β ₄₂ , на среде с дрожжами-продуцентами красного пигмента на амилоидогенез и нейродегенеративные процессы в мозге мух.....	74
3.4.1 Изучение влияния потребления красного штамма дрожжей трансгенными особями <i>Drosophila melanogaster</i> на амилоидогенез в мозге взрослых мух.....	76
3.4.2 Изучение влияния потребления красного штамма дрожжей трансгенными особями <i>Drosophila melanogaster</i> на нейродегенерацию в мозге взрослых мух.....	80
3.4.3 Анализ влияния потребления красного штамма дрожжей трансгенными особями <i>Drosophila melanogaster</i> на выживаемость взрослых мух.....	82
3.4.4 Анализ влияния потребления красного штамма дрожжей на локомоторные функции, способность к обучению и память трансгенных особей <i>Drosophila melanogaster</i>	83
Выводы	85
Список литературы	86
Благодарности	104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БА – болезнь Альцгеймера

APP – белок предшественник амилоида

PSEN – пресенилин человека

psn – дрозофильный гомолог PSEN человека

A β – амилоидный пептид β

НЗ – нейродегенеративные заболевания

NMDA – N-метил-D-аспартат

AMPA – альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота

APOE – аполипопротеин E

BACE – бета-секретаза

GWAS – полногеномный поиск ассоциаций

SMSSE – Standardized Mini-Mental State Examination – тест, направленный на выявление когнитивных расстройств

ADAS (Alzheimer Disease Assessment Scale – усовершенствованный аналог SMMSE)

GFP – зеленый флуоресцентный белок

RP-49 – рибосомальный протеин L32

GAPDH2 – глицеральдегид 3 фосфат дегидрогеназа 2

sytl – синаптотагмин-1

n-syb – нейрональный синаптобревин

tau – ассоциированный с микротрубочками белок тау

Введение

Актуальность проблемы. Белок-предшественник амилоида (APP) – крупный трансмембранный белок, в большом количестве обнаруживаемый в синапсах нейронов. Этот 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 функций нейронов [Breen et al., 1991; Neve et al., 2007; Stante et al., 2009].

Основным механизмом протеолиза APP является его расщепление тремя протеазами, получившими название α -, β - и γ -секретаз. Процессинг APP осуществляется по так называемому амилоидогенному (при участии β - и γ -секретазы) и неамилоидогенному пути (соответственно, при участии α - и γ -секретазы). Основным отличием амилоидогенного пути от неамилоидогенного является образование в результате расщепления APP небольшого по размерам амилоидного пептида–бета ($A\beta$). В свою очередь, нарушение метаболизма $A\beta$ приводит к его агрегированию и образованию так называемых сенильных бляшек - одного из главных маркеров широко распространённого старческого нейродегенеративного заболевания - болезни Альцгеймера (БА).

БА - одна из значимых медицинских проблем современного мира. Развитие классической альцгеймеровской симптоматики обычно начинается после 65 лет. После этого возраста риск заболевания удваивается каждые пять лет и уже к 80 годам частота заболевания достигает до 25%. Кроме того, существует и ранняя форма заболевания, поражающая людей в возрасте от 30 до 50 лет. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в мире около 30 миллионов человек страдает этим заболеванием.

БА характеризуется тяжелой и разнообразной симптоматикой, включающей амнезию, зрительно-пространственные и временные нарушения, алексию,

аграфию. Дальнейшее прогрессирование заболевания ведет к полной афазии, оральным и хватательным автоматизмам, насильственному смеху и плачу, общему физическому истощению и, в конечном итоге, к летальному исходу.

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 А β .

Диагностирование заболевания на сегодняшний момент осложнено в связи с отсутствием прижизненных маркеров и точная постановка диагноза возможна лишь в результате посмертной аутопсии мозга. Аутопат мозга пациентов обычно выявляет наличие классических маркеров БА – деградацию тканей мозга и наличие амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков.

Согласно гипотезе амилоидного каскада токсичные растворимые формы А β запускают множество разнообразных процессов, включающих нарушение энергообмена, разрушение структуры цитоскелета и воспаление, что в итоге приводит 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 А β каскад патологических изменений, но и ряд других не связанных или опосредованно связанных с А β 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].

БА с ранним началом в основном имеет семейный анамнез и обуславливается мутациями в генах, кодирующих APP, PSEN-1 (пресенилин-1) и PSEN-2 (пресенилин-2). В то же время причины спорадических случаев заболевания до сих пор неясны. Современные методы молекулярно-генетических исследований, например, полногеномный поиск ассоциаций, продемонстрировали многофакторность БА. Был выделен ряд генов, мутации в которых ассоциированы с заболеванием, однако роль кодируемых ими белков в нейродегенеративном процессе неочевидна. [Dreses-Werringloer et al., 2008; Kan et al., 2005; Liu et al., 2013].

Кроме того не до конца ясна функция полноразмерного белка APP и других его фрагментов в развитии нейродегенерации. Долгое время APP рассматривался исключительно как источник А β . В то же время ряд исследований показывает, что нарушение нормальной функции APP может также приводить к развитию разнообразных патологий нервной системы. Определение роли APP в развитии патологических процессов, наблюдаемых при БА – ключевой момент для понимания базисных молекулярных механизмов, ведущих к развитию заболевания, что крайне важно как для создания новых методик диагностирования БА, так и для разработки эффективных методов лечения.

Цель исследования. Цель работы – исследовать эффекты гиперэкспрессии гена *APP* в нервной системе *Drosophila melanogaster* и охарактеризовать влияние содержания трансгенных особей *Drosophila* на среде с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, мутантными по гену *ADE2* и продуцирующими красный пигмент, на нейродегенерацию и амилоидогенез.

Задачи исследования:

1. Проанализировать морфологические дефекты развития особей *Drosophila melanogaster* с гиперэкспрессией гена *APP*, *APP* с мутацией *Swedish*, а также с образованием А β ₄₂ в нервных клетках.
2. Используя трансгенные линии *Drosophila melanogaster* изучить влияние экспрессии *APP*, *APP* с мутацией *Swedish*, последовательностей,

продуцирующих укороченные формы *APP*, а также образования $A\beta_{42}$ на транскрипционную активность генов пресинаптических белков.

3. Определить влияние содержания особей *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид $A\beta_{42}$, на среде с дрожжами-продуцентами красного пигмента на уровень растворимого и агрегированного $A\beta_{42}$ в мозге мух.

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

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Нарушение нормальных функций белка *APP* ведет к активации иммунного ответа и соответствующей воспалительной реакции, вызывая тем самым патоморфологические дефекты развития и функционирования организмов.

2. Нарушение метаболизма *APP* независимо от $A\beta_{42}$ влияет на синаптическую плотность в мозге за счет негативной регуляции экспрессии генов синаптических белков. Определенный вклад в регуляцию транскрипции вносят эпигенетические факторы.

3. Содержание трансгенных линий дрозофилы на среде с мутантными дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, производящими красный пигмент, позитивно влияет на когнитивные функции и существенно снижает уровень $A\beta_{42}$ в мозге.

Научная новизна. В работе продемонстрировано влияние гиперэкспрессии гена *APP* на развитие *Drosophila melanogaster*. Показано, что нарушение экспрессии *APP* может независимо от $A\beta$ приводить к развитию воспалительной реакции. Кроме того, оценено влияние как *APP* и его форм, так и $A\beta_{42}$ на транскрипционные изменения генов пресинаптических белков синаптотагмина и нейронального синаптобревина в мозге *Drosophila melanogaster*. Впервые *in vivo* продемонстрировано позитивное влияние потребления дрожжей-продуцентов красного пигмента на содержание растворимой и нерастворимой фракции $A\beta_{42}$, а

также на когнитивные функции *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид A β ₄₂.

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 важный практический смысл, так как понимание механизмов, вызывающих начальные нейродегенеративные изменения – ключевое условие как для разработки новых методов диагностирования, так и для создания эффективных способов лечения заболевания.

Личный вклад автора. Большая часть работы выполнена автором самостоятельно. Выведение необходимых трансгенных животных, оценка уровня экспрессии и статуса метилирования генов, кодирующих пресинаптические белки, определение уровня A β ₄₂ в эксперименте с дрожжами-продуцентами красного пигмента проведены автором лично. Анализ поведения трансгенных особей *Drosophila* и изучение распределения морфологических аномалий проведены совместно с С.В. Саранцевой и О.И. Большаковой. Описание собственных исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором самостоятельно. Автор выражает благодарность за помощь в работе Г.А. Кислик и Н.А. Ткаченко.

Апробация работы. Результаты, предложенные к защите были представлены на следующих отечественных и международных конференциях: пятой международной научной конференции для студентов и аспирантов (Львов, 2009, 2011); European Human Genetics Conference (Готенбург, 2010); IX курчатовской молодежной научной школе (Москва, 2011); конференции “Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция” (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации. Результаты исследовательской работы опубликованы в 9 печатных работах, в том числе 4 статьи опубликованы в журналах, включенных в список ВАК, 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 источников. Работа изложена на 104 страницах.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нейродегенеративные заболевания

Нейрон - сложная, высокоспециализированная единица нервной системы, основная функция которой заключается в обработке, хранении и передаче информации. Происходящие в нейроне молекулярные процессы многообразны и различны, поэтому даже незначительные нарушения метаболизма этих клеток могут вызвать их дисфункцию и гибель, что, в конечном итоге, приводит к развитию разнообразных нейродегенеративных заболеваний (НЗ). Наиболее распространенными НЗ являются болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и хорея Гентингтона.

Большинство НЗ развиваются в пожилом возрасте и являются спорадическими, но приблизительно 5-10% случаев имеют генетическую основу и могут проявляться в раннем возрасте. Причины возникновения спорадических форм НЗ до конца не ясны, но есть данные, что факторами риска развития этих заболеваний являются перенесенные инфекционно-воспалительные заболевания центральной нервной системы, сосудистые патологии, нарушения клеточного метаболизма и травмы [Patterson et al., 2008]. НЗ имеют долгий латентный период, и к моменту диагностирования симптомов болезнь обычно находится в конечной стадии развития.

Последние годы наблюдается неуклонный рост числа больных. По прогнозам к 2050 году число пациентов с НЗ, нуждающихся в уходе в связи с инвалидизацией может достигнуть 277 млн человек. Мировые затраты на лечение и поддержку пациентов с дегенеративными изменениями мозга уже сейчас превышает \$600 млрд [Prince et al., 2013; Brookmeyer et al., 2007]. Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор недостаточно изучены механизмы, лежащие в основе НЗ и не существует препаратов, способных замедлить или полностью остановить развитие этих болезней.

1.2 БА: клиническая и патоморфологическая симптоматика, диагностика и лечение

Наиболее распространенным заболеванием, ассоциированным с нейродегенерацией, является БА, впервые описанная немецким психиатром и неврологом Алоисом Альцгеймером в 1906 году как старческое слабоумие с ранним началом. Первым пациентом, которому диагностировали новое заболевание, является Августа Д. Пациентка впервые обратилась к Альцгеймеру в 1901 году после того, как её семья заметила существенные изменения личностных черт, сопровождаемые проблемами с памятью, речью и восприятием. Альцгеймер в дальнейшем описал больную как пациента с агрессивной формой деменции, проявляющейся в виде расстройства поведения, памяти и языковых способностей. Он также отметил сильную возбудимость пациентки на грани с агрессией, спутанность сознания и временную дезориентацию. После смерти пациентки в 1906 году Альцгеймером была произведена аутопсия, в результате которой он обнаружил сильное уменьшение размеров коры головного мозга и жировые отложения в сосудах мозга. Именно Альцгеймером были впервые описаны классические гистопатологические маркеры заболевания – нейрофибриллярные клубки и сенильные бляшки [Hirpius et al., 2003]

БА развивается медленно и на начальной стадии практически незаметна. Первыми симптомами заболевания являются нарушения кратковременной памяти и рассеянное внимание. Больному тяжело усваивать новую информацию, возникает дезориентация во времени и пространстве. Часто подобные изменения сопровождаются усилением характеристических черт или, наоборот, их нивелированием [БМЭ, 1974, т 1, стр. 322]. Затяжные депрессии также могут указывать на развитие заболевания [Green et al., 2003]. Кроме того, у больных могут проявляться и физиологические симптомы, например, недержание мочи [Alcorn et al., 2013].

К сожалению, характеристические изменения и проблемы с памятью чаще всего воспринимаются близкими как старческие проявления, поэтому больные обращаются к врачу уже на поздних стадиях развития заболевания, в то время как наиболее эффективное лечение возможно именно на раннем этапе.

Другой проблемой является отсутствие специфических тестов для диагностики БА. Для постановки диагноза врач изучает семейный анамнез и проводит тестирование психологического и психического состояния пациентов. Также проводят рутинные анализы мочи, крови, магнитно-резонансную томографию и компьютерную томографию мозга для выявления классической для БА клинической картины, а также для исключения других заболеваний, способных вызывать альцгеймероподобную симптоматику. Кроме того, пациенту проводят люмбальную пункцию для оценки концентрации основных белковых маркеров БА в спинномозговой жидкости. К сожалению, этот метод диагностирования неточен и сопряжен с определенными трудностями при анализе результатов. Несмотря на разнообразие тестов и анализов для выявления БА, окончательный диагноз можно поставить лишь *post mortem* при исследовании мозга пациентов на наличие характерных гистопатологических маркеров [Emilien et al., 2004].

На финальной стадии БА пациентам требуется постоянный профессиональный уход. Больные полностью теряют способность удовлетворять свои повседневные нужды, перестают говорить и передвигаться. Пациенты испытывают трудности при приёме пищи в связи с дисфагией. Чаще всего пациенты умирают от проблем с дыханием из-за неподвижного образа жизни.

1.2.1 Патоморфологические и патогистологические признаки БА

Течение БА сопровождается драматическими изменениями в структуре и ткани головного мозга. Одним из основных морфологических признаков БА является существенное уменьшение массы и объема мозга в основном за счет атрофии и «сжатия» коры и гиппокампа, что обуславливается гибелью нейронов. Уменьшение размера головного мозга можно определить с помощью магнитно-резонансной томографии. Однако этот признак нельзя использовать для раннего диагностирования БА, так как существенное изменение размера мозга обнаруживается только на поздних стадиях заболевания. Также предполагается, что для определения скорости развития заболевания можно использовать другой

признак БА – увеличение размеров желудочков головного мозга. Уже на ранних стадиях заболевания наблюдается еще один патоморфологический признак БА - дегенерация белого вещества в базальных ганглиях, височной коре и гиппокампе [Apostolova et al., 2012].

Кроме того было показано, что гибели нейронов предшествует падение числа синапсов, и именно этот признак ответственен за начало развития симптоматики БА [Scheff et al., 2006].

К гистопатологическим маркерам БА относятся экстраклеточные сенильные бляшки и цитоплазматические нейрофибриллярные клубки [Armstrong RA, 2009].

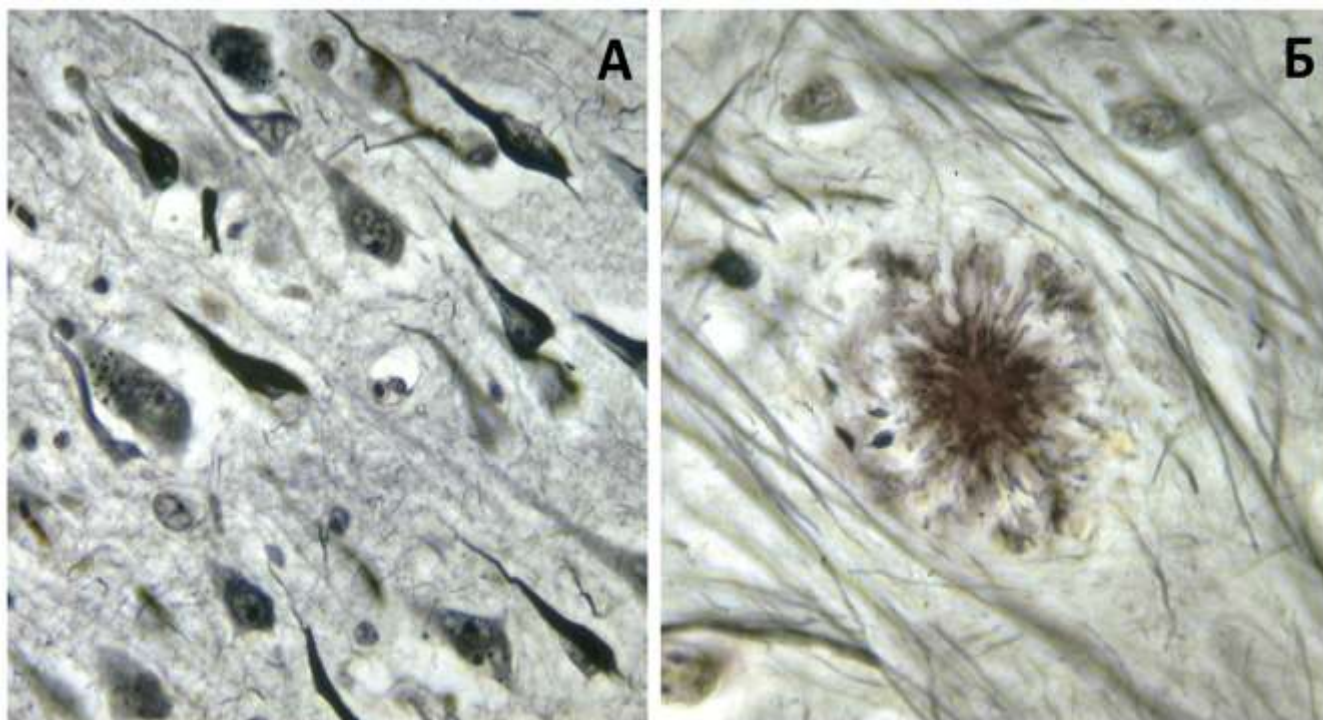


Рис. 1. Основные маркеры БА. А-нейрофибриллярные клубки, Б-сенильные бляшки [Perl, 2010]

Нейрофибриллярные клубки состоят в основном из гиперфосфорилированного тау-протеина – центрального компонента цитоскелета клетки, участвующего в полимеризации микротрубочек. В результате гиперфосфорилирования происходит изменение функционирования и агрегации протеина, что нарушает транспорт внутри клетки, приводя тем самым к ее дисфункции и гибели. На данный момент остается дискуссионным вопрос:

являются ли нейрофибрилярные клубки одной из причин или лишь следствием заболевания [Brion JP, 1998].

Основным компонентом экстраклеточных сенильных бляшек является А β [Armstrong RA, 2009]. На сегодняшний день функциональная роль А β до конца не ясна. Согласно ряду работ, блокирование образования А β в мышцах не приводило к изменению фенотипа или изменению когнитивных функций организмов [Roberds et al. 2001]. Ингибирование же образования А β в первичных культурах нейронов коры головного мозга приводило к смерти клеток, не оказывая при этом существенного влияния на другие виды клеток [Plant et al., 2003].

Одной из функций А β может являться регулирование активности синапсов головного мозга. Было показано, что усиление активности нейронов гиппокампа приводило к увеличенному образованию А β путем ускоренного процессинга его предшественника. Это позволило сделать вывод о тормозящем влиянии А β на активность синапсов и его роли в препятствовании токсичности, вызываемой гиперактивацией NMDA- и AMPA-рецепторов [Kamenetz et al., 2003].

Также существует ряд свидетельств, демонстрирующих влияние А β на активность или формирование калиевых ионных каналов. Ранее было показано влияние активности калиевых каналов на выживаемость нейронов путем регулирования их возбудимости. Кроме того, ионы калия играют существенную роль в активации апоптоза. Было показано, что инактивация калиевых каналов подавляется ингибированием образования эндогенного А β [Plant et al., 2005].

Существует предположение, что рост уровня А β в клетке может происходить в ответ на увеличение концентрации холестерина. Согласно ряду работ, холестерин является дополнительным фактором риска для БА. Было показано, что образование А β приводило к существенному падению уровня холестерина в трансфицированных клетках путем ускорения его вывода [Umeda et al., 2010].

А β также может модулировать активность ряда ферментов, например фермента киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3), принимающего участие в фосфорилировании разнообразных протеинов. В случае БА активация этого

фермента приводит к гиперфосфорилированию тау-протеина, нарушая тем самым стабильность микротрубочек нейронов и приводя к образованию описанных выше нейрофибриллярных клубков [Hernández et al., 2010].

A β образуется путем протеолитического расщепления APP по амилоидогенному пути. В амилоидогенном расщеплении последовательно участвуют две протеазы: β - и γ -секретазы. В результате расщепления образуются пептиды переменной длины: от 38 до 43 аминокислотных остатков [Zheng et al., 2006]. Важно понимать, что амилоидогенное расщепление APP является нормальным процессом и образование A β само по себе не ведет к развитию БА [Abramov et al., 2009]. В норме образовавшийся A β успешно удаляется из головного мозга при помощи клеток микроглии, выполняющих роль фагоцитов [Lee, Landreth, 2010]. Нарушение же скорости образования A β и/или его клиренса и является отправной точкой для развития связанных с ним патологий. Кроме того, в процессинге APP принимает участие и третья протеаза, называемая α -секретазой, которая, конкурируя с β - и γ - протеазами за субстрат, расщепляет APP по неамилоидогенному пути, предотвращая образование A β [Zheng et al., 2006].

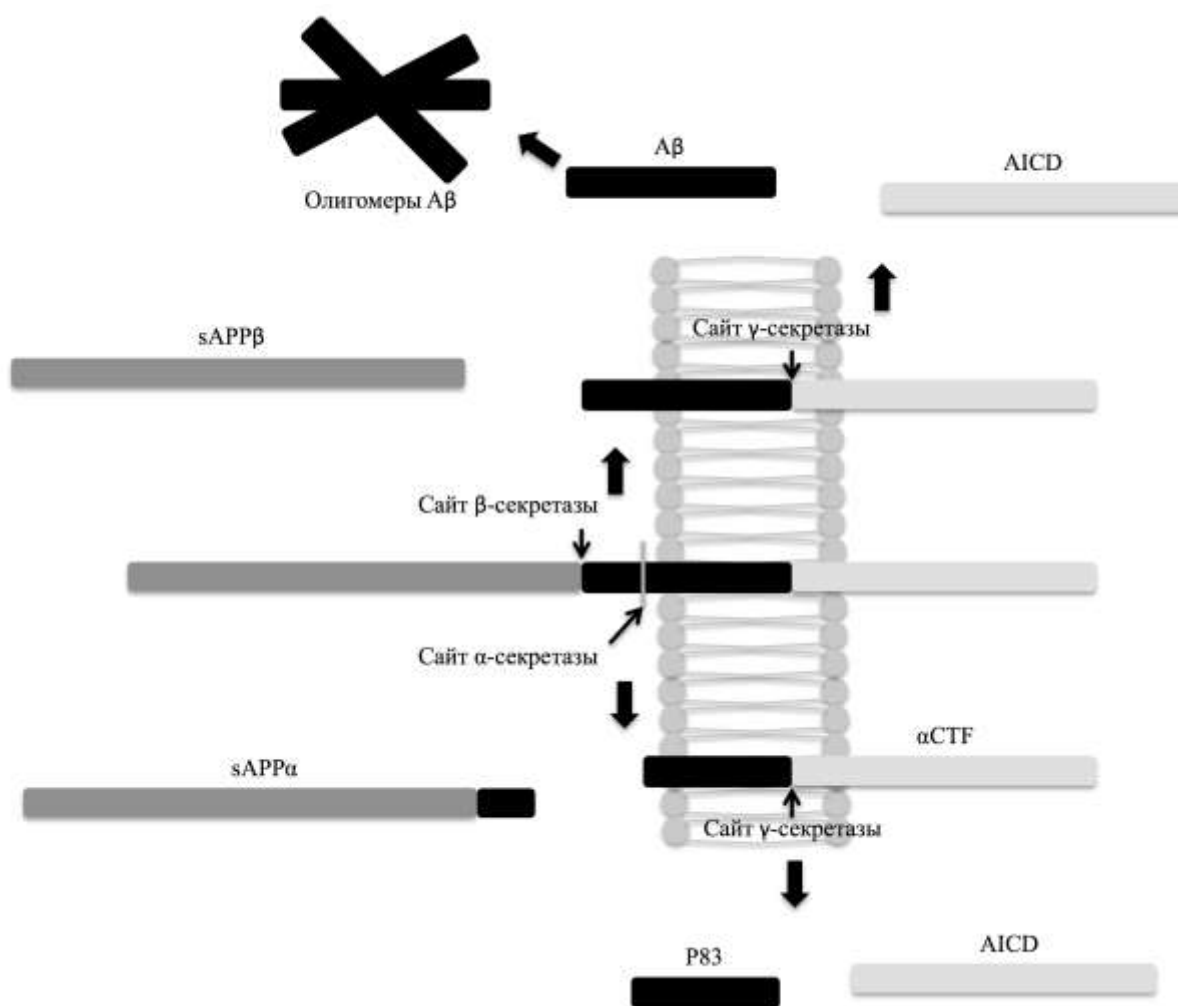


Рис. 2. Процессинг APP.

Наиболее токсичным является A β , состоящий из 42 аминокислотных остатков. Согласно гипотезе амилоидного каскада повышенное образование A β_{42} запускает процессы, приводящие, в конечном итоге, к развитию БА [Zheng et al., 2006]. Кроме A β в состав бляшек входят амилоид Р сыворотки, глюкозаминогликан, гиперансульфатпротеогликан, аполипопротеин E (APOE), α 2-макроглобулин, α 1-антихимотрипсин и др. [Alexandresku, 2005].

Свой вклад в патогенез БА вносят и другие формы A β . Например, A β , состоящий из 40 аминокислотных остатков, откладываясь в сосудах головного мозга, нарушает тонус сосудов, тем самым ухудшая кровоснабжение мозга и ускоряя развитие деменции [Kumar-Singh, 2008].

1.2.2 Семейные и спорадические формы БА

На сегодняшний день выделяют пресенильную форму БА (с началом до 65 лет) и сенильную форму (с началом после 65). БА с ранним началом диагностируется в 6-10% всех случаев. Несмотря на схожесть клинической картины, между двумя формами существуют значительные различия. Особенностью пресенильной формы заболевания является более быстрое и агрессивное развитие и наличие в большинстве случаев семейного анамнеза, что указывает на генетическую обусловленность возникновения заболевания [Xiong et al., 2005].

В настоящее время выделены 3 гена, мутации в которых приводят к возникновению семейной формы БА: *APP*, *PSEN-1* и *PSEN-2* [Xiong et al., 2005].

Пресенилины входят в состав γ -секретазного комплекса и таким образом ответственны за протеолиз APP внутри мембраны [Lai et al., 2003]. Мутации в генах, кодирующих пресенилины, способствуют ускоренному процессингу APP и образованию наиболее токсичной формы $A\beta$ [Scheuner et al., 1996]. На сегодняшний день выделено более 150 мутаций в гене *PSEN-1* и 10 мутаций в гене *PSEN-2*, вызывающих семейную форму БА. В основном это миссенс-мутации, приводящие к аминокислотным заменам. Интересно, что трансгенные мыши с нокаутом по гомологу *PSEN-1* демонстрировали сильные нейродегенеративные изменения мозга при полном отсутствии амилоидных отложений.

В гене *APP* был также выделен ряд мутаций, приводящих к ускоренному образованию $A\beta$ и возникновению семейной формы заболевания [Scheuner et al., 1996]. Эти мутации в основном сосредоточены либо в сайтах связывания APP с секретазами, что увеличивает скорость процессинга, либо непосредственно в последовательности, кодирующей $A\beta$. Основные мутации гена *APP* представлены в табл. 1.

Основные мутации гена *APP*

Мутация	Описание
KM670/671NL Swedish	Расположена около сайта β -секретазы. Приводит к увеличению образования $A\beta_{42}$ и $A\beta_{40}$
A673T	Расположена в последовательности $A\beta$. Обладает протективными свойствами, приводит к падению уровня $A\beta$
D678N Tottori	Расположена в последовательности $A\beta$. Ускоряет образование фибрилл.
E682K Leuven	Расположена около альтернативного сайта расщепления β -секретазы. Препятствует расщеплению APP по этому сайту. Ускоряет образование $A\beta$.
A692G Flemish	Расположена в последовательности $A\beta$. Ускоряет образование $A\beta_{42}$ и $A\beta_{40}$ в результате ослабления процессинга APP α -секретазой и усиление процессинга β -секретазой.
E693G Arctic	Расположена в последовательности $A\beta$. Характеризуется снижением уровня $A\beta$ в плазме и ускоренным образованием протофибрилл.
E693G Dutch	Расположена в последовательности $A\beta$. Ускоряет образованием фибрилл, модулирует процессинг APP
D694N Iowa	Расположена в последовательности $A\beta$. Ускоряет рост фибрилл и усиливает токсичность $A\beta$

T714I Austrian	Расположена в трансмембранном домене APP рядом с сайтом рестрикции γ -секретазы, влияет на процессинг APP γ -секретазой, многократно усиливая образование $A\beta_{42}$
V717I London	Расположена в трансмембранном домене APP рядом с сайтом рестрикции γ -секретазы, увеличивает количество $A\beta_{42}$, подавляя образование $A\beta_{40}$
K724N Belgian	Расположена в цитоплазматическом конце APP, усиливает выработку $A\beta_{42}$, подавляет образование $A\beta_{40}$

Большинство случаев сенильных форм БА имеют спорадический характер и могут возникать вне зависимости от наличия мутаций в описанных выше генах. Необходимо отметить, что на данный момент причины, приводящие к развитию спорадической формы БА, до сих пор неясны. Существует предположение, что БА может провоцироваться наличием совокупного полиморфизма различных генов [Bali et al., 2012]. На сегодняшний день проводится множество работ по определению генов, вовлеченных в патологию БА [Kan et al., 2005; Dreses-Werringloer et al., 2008; Carrasquillo et al., 2011; Thambisetty et al., 2013].

Кроме того, существует ряд факторов, повышающих вероятность манифестации заболевания. Среди них: атеросклеротические изменения сосудов мозга, избыточная масса тела, слабая подвижность, артериальная гипертензия, сахарный диабет, хроническая гипоксия, нарушения антиоксидантных систем мозга [Kroner, 2009; Peers et al., 2007; Su et al., 2008, Vermejo-Pareja et al., 2010].

На рис. 3 приведена схема, объединяющая основные патологические процессы, ведущие к развитию БА.

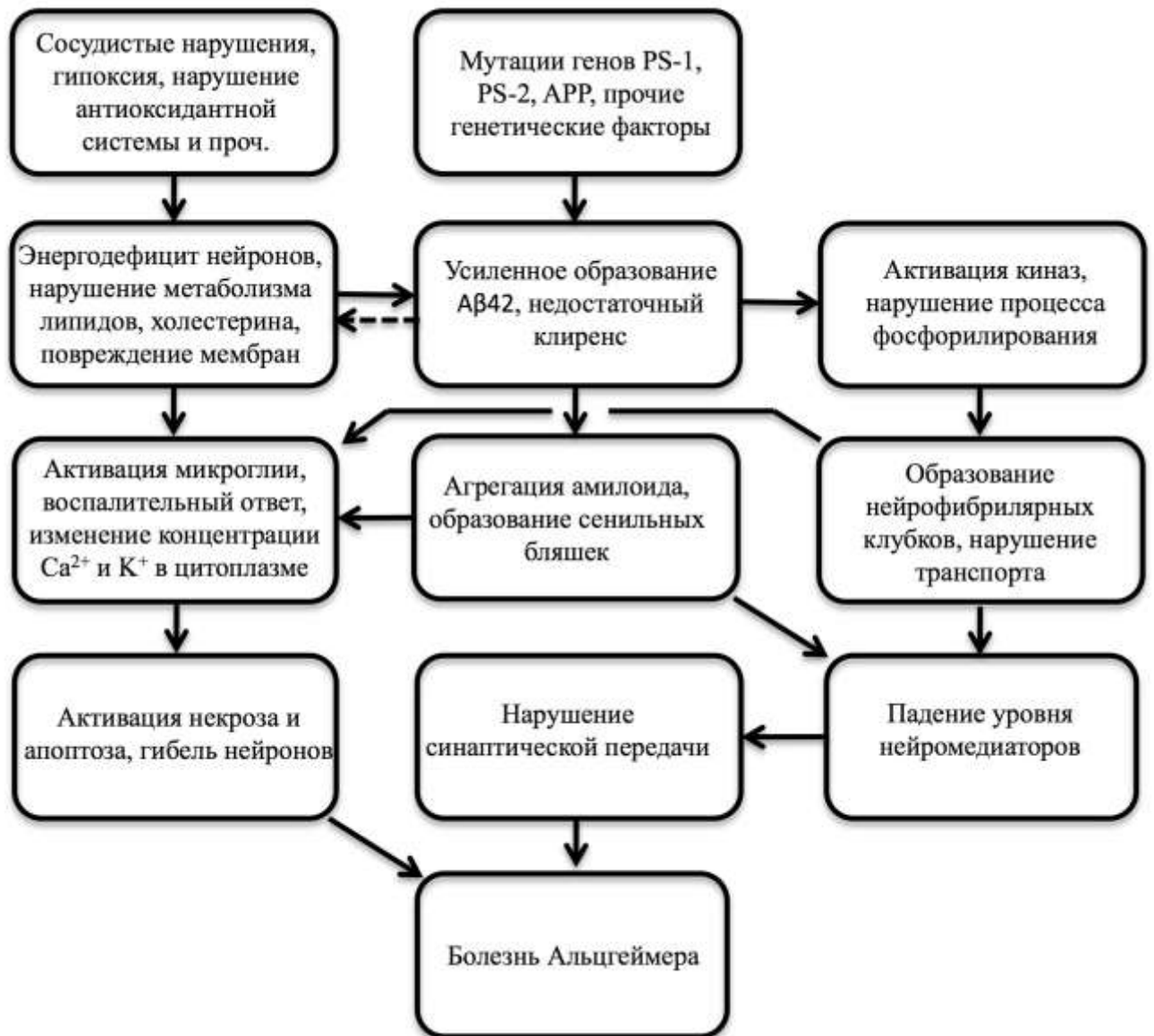


Рис. 3. Основные патологические процессы, ведущие к развитию БА.

1.2.3 Участники патологических процессов при БА

Существующие в настоящее время теории возникновения БА не в состоянии каждая в отдельности объяснить и структурировать всё разнообразие механизмов и патологических процессов, наблюдаемых при БА.

Генетическим фактором риска, повышающим вероятность развития БА, является наличие определенного аллеля гена, кодирующего аполипопротеин E (APOE). APOE участвует в транспорте липидов, включая холестерин, и клеточном метаболизме. Кроме того, он принимает участие в росте и дифференцировке нейронов, регенерации поврежденных тканей и определенных

нейродегенеративных процессах. Ген *APOE* представлен тремя основными аллелями: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$, которые кодируют три изоформы белка (E2, E3 и E4 соответственно). Данные изоформы имеют различные конформации и липидосвязывающие свойства. Изоформа E4 значительно менее эффективна при транспорте холестерина по сравнению с другими изоформами. С учетом того, что холестерин модулирует расщепление APP, наличие изоформы E4 способствуют ускоренному образованию A β [Liu et al., 2013].

Генетическая вариабельность гена, кодирующего бета-секретазу (BACE), возможно, также влияет на скорость образования A β . В 5 экзоне гена BACE был обнаружен однонуклеотидный полиморфизм (C786G), но данные по влиянию этого полиморфизма на развитие БА противоречивы [Kan et al., 2005].

В патологии БА может также принимать участие ген *CALMH1*, кодирующий белок модулятор кальциевого гомеостаза. Аллель гена, приводящая к аминокислотной замене Pro86Leu, уменьшает кальциевую проницаемость и приводит к падению уровня ионов кальция в цитоплазме. Было продемонстрировано, что внутриклеточная концентрация ионов кальция может влиять на метаболизм APP, а, следовательно, и на уровень A β [Dreses-Werringloer et al., 2008].

В результате полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) был выделен ген *BIN1*, кодирующий адапторный белок, экспрессия которого была повышена в мозге пациентов с БА. Предполагается, что этот белок можно рассматривать наравне с APOE4 как фактор риска развития БА. Было показано участие BIN1 в нарушении нормального функционирования тау-протеина [Carrasquillo et al., 2011].

Еще одним геном, ассоциированным с БА является ген *CLU*, кодирующий белок-шаперон кластерин. В результате GWAS было показано, что наличие однонуклеотидного полиморфизма гена связано с повышенным риском развития БА. Функциональная роль CLU в патогенезе БА на данный момент до конца не ясна, но предполагается, что он, связываясь с A β , облегчает его полимеризацию и агрегацию [Thambisetty et al., 2013].

С помощью GWAS была также показана связь повышенного риска развития БА с определенными аллелями гена *CRI*, кодирующего рецептор комплемента второго типа, что в свою очередь позволяет предположить важную роль системы комплемента в этиологии БА [Crehan et al., 2012].

Мутации в гене *PLAU*, кодирующем белок-активатор предшественника плазмина также может вносить вклад в развитие БА. Плазмин входит в семейство сериновых протеаз и вовлечен в процессы деградации разнообразных белков, включая Аβ. Мутация *PLAU C1788T* в шестом экзоне приводит к падению активности белка-активатора, а следовательно и уровня плазмина, что замедляет клиренс Аβ и, возможно, инициирует его агрегацию [Finckh et al. 2003].

В патофизиологии БА могут также играть определенную роль и воспалительные процессы. Наблюдаемая при БА активация микроглии вызывает высвобождение разнообразных воспалительных медиаторов, таких как цитокины и простагландины. Вариабельность генов, которые кодируют белки, ответственные за воспалительные реакции, может существенно ускорять патологические изменения при БА. Например, было показано, что у ряда больных обнаруживается редкая аллель гена, кодирующего цитокин интерферон γ (T874A). В результате мутации происходило усиление образования арахидоновой кислоты и, как следствие, увеличение уровня простогландинов [Bate et al., 2006].

Как было сказано выше, депрессия – один из факторов риска при БА. Было показано изменение уровня серотонина в спинномозговой жидкости пациентов с БА. Был выделен ген *HTR2A*, кодирующий рецептор серотонина типа 2A (5HT2A), одна из аллелей которого (однонуклеотидный полиморфизм T102C) ассоциирована с БА и является фактором риска развития заболевания [Thome et al., 2001].

Не до конца ясна роль APP в патогенезе БА. Долгое время APP рассматривался исключительно как источник Аβ. В то же время степень нейродегенерации и состояние пациентов не всегда коррелируют или слабо коррелируют с количеством амилоидных отложений, что связано с наличием альтернативных механизмов развития заболевания, не связанных исключительно с агрегацией пептида [Lee et al., 2004; Terry et al., 1996]. Ряд исследований

показывает, что гиперэкспрессия гена *APP* или нарушение функций белка приводит к развитию нейропатологии независимо от $A\beta$ [Zheng et al., 2006; Nizzari et al., 2012]. В то же время функции самого белка изучены недостаточно. Было показано, что *APP* участвует в разнообразных процессах. Breen et al., используя клетки нейробластомы Neuro-2A, показал, что обработка клеток антителами, специфичными к *APP*, нарушает связь между нейронами или нейроном и глией. Stante et al., исследуя функции адапторного белка FE65 на культурах клеток мышей, показал, что *APP* необходим для перехода FE65, участвующего в работе ацетилтрансферазы TIP60 и регуляции экспрессии ряда генов, в активное конформационное состояние. Neve et al., используя первичную культуру нейронов коры головного мозга мышей, показал, что *APP* можно рассматривать как сигнальный белок-рецептор, изменение функции которого может вести к нарушению клеточного цикла и апоптозу.

В настоящее время активно исследуется и другой продукт протеолитического расщепления *APP* - внутриклеточный C-концевой фрагмент AICD, способный согласно ряду исследований изменять профили экспрессии генов разнообразных белков, участвующих в развитии патогенеза БА [Müller et al., 2008].

Последние исследования показывают, что наряду с генетическими основами развития БА необходимо учитывать и разнообразные эпигенетические модификации ДНК. Наличие даже нескольких генетических факторов риска не всегда приводит к развитию БА. Подтверждением этого может служить различный исход заболевания у однояйцевых близнецов [Mastroeni et al, 2009].

1.3 Эпигенетика и БА

В отличие от генетических модификаций, которые основываются на определенных изменениях последовательности нуклеотидов в ДНК, эпигенетические модификации не меняют структуру гена. Эпигенетические вариации осуществляются с помощью разнообразных модификаций гистонов, метилирования ДНК, а также при помощи микроРНК. Конечным результатом

подобных модификаций обычно является изменение уровня экспрессии гена [Portela, Esteller, 2010].

1.3.1 Эпигенетическая модификация гистонов при БА.

Самым распространенным способом эпигенетической модификации гистонов является их ацетилирование – перенос ацетильной группы с ацетил-коэнзима А на лизиновый остаток N-конца гистонов. Ацетилирование гистона вызывает ослабление связи ДНК-гистон, что приводит к релаксации комплекса и облегчению доступа транскрипционного аппарата к ДНК.

К другим эпигенетическим модификациям гистона можно отнести метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование и пр.

Было обнаружено, что гистон H3 гиперфосфорилирован в нейронах гиппокампа головного мозга у пациентов с БА [Ogawa et al., 2003]. Также было показано увеличение полиАДФ-рибозилирования гистона H1 в областях мозга пациентов с ишемическим повреждением мозга [Love et al., 1999]. В то же время гиперэкспрессия *APP* в культуре нейронов гиппокампа приводила к падению уровня ацетилирования гистонов H3 и H4 [Lonze and Ginty, 2002; Rouaux et al., 2003].

1.3.2 Метилирование ДНК при БА

Наиболее распространенная форма метилирования ДНК – это реакция превращения цитозина в 5-метилцитозин в последовательности CpG, катализируемая ДНК-метилтрансферазами. Метильная группа, переносимая на цитозин обычно образуется в результате ее отщепления при взаимодействии метилтетрагидрофолата и S-аденозилметионина во время фолатного цикла [Niculescu, Zeisel, 2002].

В первых работах по исследованию статуса метилирования CpG динуклеотидов ДНК нейронов коры головного мозга статистически значимые изменения обнаружены не были. Но в дальнейшем было показано, что ряд генов,

принимающих участие в развитии БА, имеет измененный уровень метилирования [Wang et al., 2008].

Как было сказано выше, в метилировании ДНК принимает участие метилтетрагидрофолат. Недостаток фолата обычно приводит к общему гипометилированию. Падение уровня фолата и нарушение фолатного цикла было зафиксировано у пациентов с БА. Также при БА было показано увеличение уровня ингибитора метилирования ДНК – гомоцистеина [Smith, 2008].

При БА также наблюдается изменение статуса метилирования генов, кодирующих ассоциированный с микротрубочками белок тау (tau) и APP. Было обнаружено, что ген *MAPT*, кодирующий белок tau, гиперметилирован по сайту связывания с активатором транскрипции и гипометилирован по сайту связывания с репрессором, что приводит к общему угнетению уровня его транскрипции [Toghi et al, 1999]. Также было показано сильное падение уровня метилирования промотора гена *APP* в образцах коры головного мозга пациентов с БА, взятых *post mortem* [Toghi et al, 1999].

1.3.3 Роль микроРНК в БА

Нельзя не отметить роль микроРНК в развитии патологии БА. Сравнительный анализ уровня микроРНК в мозге здоровых людей и мозге больных показал изменение уровня miR-29a/b-1 и miR-107, регулирующих экспрессию гена, кодирующего β -секретазу, результатом чего является увеличение секреции A β [Hébert et al., 2008; Wang et al., 2008].

В патогенез БА могут также быть вовлечены микроРНК, взаимодействующие с геном *APP*: miR-20a, miR-17-5p и miR-106b. Эксперименты на трансгенных мышах показали взаимосвязь между падением уровня этих микро-РНК и усилением экспрессии *APP*. В то же время анализ нейронов коры головного мозга пациентов не выявил подобной корреляции [Hébert et al., 2009].

1.4 Лечение БА: существующие лекарственные препараты и препараты, находящиеся в разработке

Несмотря на продолжительную историю исследования БА этиология заболевания остается неясной. В данный момент не существует эффективных фармакологических препаратов, способных предотвратить или, по крайней мере, замедлить развитие болезни, которая обычно кончается смертельным исходом в течение 5-9 лет после постановки диагноза [Doody, 1999]. В настоящее время единственным подходом к лечению БА является стабилизация и замедление падения когнитивных функций. Для этих целей часто в клинической практике используются следующие препараты:

1) Арицепт (Aricept, donepezil) – ацетилхолинэстеразный ингибитор, препятствующий деградации ацетилхолина в мозге пациентов с БА. Арицепт оказывал благоприятное влияние на когнитивную деятельность и мышление пациентов с БА. Показатель SMSSE (Standardized Mini-Mental State Examination – тест, направленный на выявление когнитивных расстройств) пациентов, принимавших донепезил был выше, чем у контрольной группы, принимавшей плацебо. Кроме того, пациенты дольше сохраняли способность удовлетворять свои повседневные нужды [Howard et al., 2012].

2) Когнекс (Cognex, tacrine) – препарат, также относящийся к группе ацетилхолинэстеразных ингибиторов. Такрин – один из первых препаратов, одобренных для лечения пациентов с БА – показал незначительное улучшение когнитивных функций у пациентов с начальной и средней стадией БА. Пациенты, принимавшие такрин, имели более высокий показатель SMSSE. В связи со слабой эффективностью и обширными побочными эффектами препарат используется редко, а в некоторых странах (например, в США и Англии) полностью снят с использования [Yoshida et al., 1993].

3) Экселон (Exelon, rivastigmine) – ацетилхолинэстеразный и бутилхолинэстеразный ингибитор, препятствующий разложению ацетилхолина и бутирилхолина. Один из первых препаратов, одобренных на мировом уровне для лечения пациентов с БА начальной и средней тяжести. Показал свою

эффективность в большом количестве клинических испытаний. У пациентов, принимавших ривастигмин, наблюдалось повышение показателя ADAS (Alzheimer Disease Assessment Scale – усовершенствованный аналог SMMSE), стабилизировалось мышление и память [Bartorelle et al., 2005; Onor et al, 2007].

4) Реминил (Reminyl, galantamine) – еще один ацетилхолинэстеразный ингибитор, разработанный в Советском Союзе. В настоящий момент галантамин достаточно широко используется в практике лечения БА. Особенностью галантамина является то, что он не только предотвращает распад ацетилхолина, но и стимулирует никотиновые рецепторы вырабатывать больше ацетилхолина в целом. Препарат улучшал когнитивные функции, стабилизировал психическое состояние пациентов. В долгосрочной перспективе препарат замедлял развитие симптомов и поддерживал когнитивные функции больных. В то же время было замечено повышение смертности у пациентов, принимавших препарат. Это связывают с тем, что препарат может вызывать брадикардию, а в редких случаях – атриовентрикулярную блокаду [Wilcock et al., 2000; Hernandez et al., 2009].

5) Мемантин (Memantine) – одно из наиболее современных и перспективных средств для лечения БА. Основным возбуждающим нейротрансмиттером в мозге человека является глутамат. Глутаматэргическая гиперстимуляция может приводить к повреждению нейрона, а в дальнейшем и к нейродегенерации. Глутамат стимулирует ряд постсинаптических рецепторов, включающих рецепторы NMDA. Было показано участие этих рецепторов в развитии деменции и патологии БА. Мемантин – антагонист NMDA-рецепторов и тем самым может предотвращать гиперстимуляцию нейронов, а значит и нейродегенерацию. Было показано, что у пациентов, принимавших мемантин, наблюдалось значительное замедление развития заболевания, улучшение памяти и мышления по сравнению с контрольной группой, принимавшей плацебо, также улучшался общий прогноз заболевания [Howard et al., 2012; Reisberg et al., 2003].

Помимо поиска препаратов, направленных на улучшение когнитивного состояния пациентов, ведутся активные исследования лекарственных средств, препятствующих развитию первичных нейродегенеративных изменений. В связи с

неполным пониманием молекулярных основ БА, текущие разработки ограничиваются двумя стратегиями:

1) поиск препаратов, препятствующих образованию амилоидных отложений в мозге пациентов. Данная стратегия включает в себя предотвращение образования $A\beta$, препятствование его агрегации, а также усиление клиренса.

2) предотвращение агрегации тау-протеина или разрушение уже образовавшихся фибрилл.

Наиболее прямым и перспективным подходом в антиамилоидогенной терапии долгое время считался поиск соединений, которые могли бы ингибировать протеолитический процессинг APP, в который вовлечены три мембранные протеазы, получившие название α -, β - и γ -секретазы. Так как в генерации $A\beta$ непосредственно участвуют β - и γ -секретазы, большинство исследовательских групп было сконцентрировано на поиске нетоксических ингибиторов именно этих секретаз [Leung et al., 2000; Huang et al., 2008; Choi et al., 2008; Shimmyo et al., 2008; Laras et al., 2009]. Таренфлурбил (tarenflurbil, MPC-7869; Myriad Pharmaceuticals; Flurizan™) представляет собой R-оптический изомер флубипрофена (flurbiprofen). Он модулирует действие γ -секретазы, сдвигая расщепление APP в сторону образования более коротких нетоксичных фрагментов [Behr et al. 2004]. Таренфлурбил не был токсичен для желудочно-кишечного тракта [Townsend and Pratico, 2005] и у мышей снижал образование амилоидных бляшек и предотвращал ухудшение обучения и поведения [Kukar et al. 2007]. Однако, несмотря на то, что таренфлурбил снижал уровень $A\beta_{42}$ в плазме и спинномозговой жидкости у здоровых людей, его клинический эффект у пациентов с умеренной БА не был обнаружен во время проведения III фазы исследований [Xia et al., 2012]. Низкая активность препарата и его ограниченная способность проходить через гематоэнцефалический барьер привели к прекращению дальнейших исследований. Другой γ -ингибитор семагастат (semagacestat, LY450139, компания Eli Lilly) заметно снижал когнитивные навыки у пациентов, в сравнении с пациентами, принимающими плацебо, несмотря на наблюдаемое снижение уровня $A\beta$ в плазме и спинномозговой жидкости [Henley et al., 2009; Eli Lilly and Company, 2010].

Существуют вполне обоснованные сомнения в том, что реальные терапевтические ингибиторы γ -секретазы вообще могут быть когда-либо созданы. Это объясняется тем, что помимо APP идентифицированы и другие субстраты γ -секретазы, ингибирование процессинга которых может приводить как к необратимым эмбриональным дефектам, так и к выраженному токсическому действию. В их число входят Notch1-рецептор, Delta 1-протеин, рецептор ERBB4 и другие клеточные белки [De Strooper, 2003]. Более того, оказалось, что продукция А β является важным фактором для функционирования и жизнедеятельности нейронов [Plant et al., 2003]. Возможно, именно в силу этого обстоятельства до сих пор нет никаких подтвержденных данных об успешных клинических испытаниях ингибиторов β - и γ -секретаз [alzforum.org].

Стимуляция α -секретазы является еще одним способом уменьшить образование А β . В результате разрезания APP α -секретазой между 16 и 17 аминокислотными остатками последовательности А β образуется фрагмент sAPP α , который, как полагают, обладает нейрозащитными функциями [Müller, Zheng, 2012]. В экспериментах *in vitro* этазолат (Etazolate, ЕНТ 0202, ExonHit Therapeutics) усиливал образование sAPP α и показал нейрозащитный эффект от А β ₄₂ [Marcade et al., 2008]. Клинические исследования в фазе I и II, проведенные на здоровых добровольцах и больных БА показали эффективность препарата в отношении когнитивных функций и поведения больных БА, а также увеличение sAPP α в крови [alzforum.org].

Блокирование агрегации А β основано на применении соединений, которые могут ингибировать как полимеризацию А β , так и взаимодействие промежуточных амилоидных структур. В экспериментах *in vitro* описано значительное количество таких соединений, но в экспериментах *in vivo* их антиамилоидогенный эффект был крайне незначителен, в следствие быстрого распада в крови или невозможности проникнуть через гематоэнцефалический барьер [Hardy, 2002]. Тем не менее, поиск этих соединений продолжается. Наиболее изученными агентами этого класса являются трамипросат (tramiprosate, AlzhemedTM, Neurochem Inc.) и миметики гликозаминогликанов (glycosaminoglycan (GAG) mimetic, Neurochem Incorporated).

Гликозаминогликаны связываются с растворимым А β , активируя образование фибрилл и амилоидных отложений. Миметики гликозаминогликанов, конкурируя за сайты связывания, блокируют образование фибрилл и уменьшают уровень растворимого А β [Gervias et al., 2001]. Несмотря на хорошую переносимость трамипросата клинические исследования (фаза II и III), проведенные в разных странах не выявили изменения когнитивных функций у пациентов, его принимавших [Aisen et al., 2006]. Испытания хелатов цинка, меди и железа, проведенной на трансгенных мышях показало улучшение когнитивных функций животных, однако подобный эффект не наблюдался у больных БА с ранней стадией заболевания при проведении стадии II клинических исследований, несмотря на дозозависимое снижение концентрации А β в спинномозговой жидкости по сравнению с группой, принимающей плацебо [Lannfelt, L. et al., 2008].

Способность стабилизировать агрегацию олигомеров А β и ингибировать его токсичность была показана для сцилло-инозитола (scyllo-inositol) [Townsend et al., 2006]. Клиническое исследование (фаза II) сцилло-инозитола (ELND005, AZD-103) с участием пациентов с мягкой и умеренной деменцией не выявило клинического эффекта и было прекращено в связи с внезапной смертью пациентов и инфекционными заболеваниями [Salloway, et al., 2011].

Антиамилоидогенная иммунотерапия для БА привлекла большое внимание после сообщения о снижении содержания амилоидных отложений в мозге APP-трансгенных мышей после их вакцинации агрегированным А β [Schenk et al., 1999]. Аналогичный эффект был отмечен и при пассивной иммунизации животных антителами к А β [Gelinas et al., 2004]. Три возможных механизма были предложены для объяснения эффекта А β -антител: 1) активация микроглиальных клеток и последующий фагоцитоз А β ; 2) прямая дезагрегация амилоидных бляшек антителами; 3) разрушение антителами циркулирующего растворимого А β [Citron, 2004]. Большинство исследователей склоняются к тому, что основной антиамилоидогенный эффект антителами к А β связан с активацией микроглиальных клеток [Gelinas et al., 2004]. К сожалению, клинические испытания (фаза II) с антителами к А β AN1792, проводимые компаниями «Elan» и

«Wyeth», были приостановлены ввиду развития у 6% пациентов симптомов менингоэнцефалита [Gilman et al., 2005]. Кроме того, анализ мозга, проведенный *post mortem*, показал снижение отложения А β , что указывает на удаление амилоидных бляшек, но при этом не наблюдалось позитивного эффекта на синаптическую плотность и улучшения когнитивных способностей, по сравнению с группой, принимающей плацебо [Voche et al., 2010]. Таким образом, основываясь на результатах этого анализа, можно предположить, что удаление А β не является достаточным условием для восстановления когнитивных нарушений [Voche et al., 2010]. Несмотря на неудачу первых клинических испытаний многие научные центры и фармацевтические компании продолжают работы по созданию новых А β -вакцин. Бапинеузумаб (Bapineuzumab) – моноклональное антитело, которое связывается как с растворимым, так и с фибриллярным А β и снижает уровень А β в мозге трансгенных мышей [Bard, et al., 2000]. Однако, наблюдаемое в ходе фазы II снижение на 30% отложений кортикального фибриллярного А β не приводило к улучшению когнитивных функций [Blennow, K. et al., 2012]. Более того, были выявлены тяжелые побочные эффекты от приема препарата. С 2012 года бапинеузумаб снят с клинических испытаний [Business Wire, 2012].

Внутривенный иммуноглобулин IVIG – это смесь антител, полученных из плазмы здоровых доноров. Препарат обладает противовоспалительным и противоинфекционным действием, кроме того он стимулирует иммунную систему человека. В то же время, механизм его действия до сих пор неясен. Препарат используется при лечении различных заболеваний, включающих разнообразные виды рака, аутоиммунные заболевания, инфекции. Идея использования IVIG для лечения БА принадлежит доктору Релкину (Dr. Relkin) и коллегам, которые отметили понижение концентрации свободных антител против А β в крови больных БА [Relkin et al., 2009]. Фаза I клинических испытаний препарата дала обнадеживающие результаты. Было отмечено увеличение антиамилоидных антител в крови больных, замедление падения когнитивных функций и общая стабилизация состояния пациентов [Relkin et al., 2009]. К сожалению, проведенная вторая фаза

испытаний не выявила статистически значимых в долгосрочном плане улучшений в состоянии пациентов [Dodel R. et al, 2013].

Соланезумаб (Solanezumab) – новый экспериментальный препарат, разрабатываемый «Eli Lilly & Company». Препарат представляет собой моноклональные антитела, которые способны связываться с растворимыми мономерными формами А β , активируя его клиренс на ранней стадии до начала олигомеризации, препятствуя, таким образом, формированию токсичных амилоидных отложений. В 2012 была завершена третья фаза клинических испытаний препарата. К сожалению, полученные результаты не показали ожидаемого улучшения когнитивных функций при лечении пациентов с БА средней тяжести [«Eli Lilly & Company», 2012]. В то же время, анализ полученных в результате испытаний данных показал, что препарат замедляет нарушение когнитивных способностей пациентов с ранней стадией БА. В связи с этим «Eli Lilly & Company» объявили о начале дополнительных клинических испытаний препарата, в которое будут вовлечены 2100 пациентов с начальной формой БА. Испытания должны завершиться в 2016 году.

Несмотря на негативные результаты, четыре новых антитела – гантенерумаб (gantenerumab), кренезумаб (crenezumab), понезумаб (ponezumab) и GSK933776A, и шесть А β вакцин проходят клинические испытания в различных фазах [Mullane, Williams, 2013].

Стационарная концентрация А β представляет собой баланс между его биосинтезом, катализируемым β - и γ -секретазами, и деградацией, осуществляемой рядом протеолитических ферментов, из которых основным является неприлизин, представитель семейства цинковых металлопротеаз [Iwata et al., 2000]. Интересно, что неприлизин может расщеплять не только мономеры, но и олигомеры А β и поэтому является важнейшим эндогенным ингибитором токсических эффектов амилоидоза при БА [Kanemitsu et al., 2003].

Внутривенные инъекции неприлизина, который мог деградировать А β *in vitro*, трансгенным мышам с экспрессией мутантного *APP* человека

(Lys670Asp/Met671Leu) вызывали дозозависимое уменьшение уровня А β в плазме, но не влияли на его концентрацию в мозге [Walker, J. R. et al., 2013].

Примером лекарственного средства, способного препятствовать развитию таупатии, может служить препарат «Рембер» – препарат, разработанный совместно университетом Абердина и компанией «TauRx Therapeutics». Гиперфосфорилиция и агрегация белка tau – один из ключевых признаков БА. Первичные испытания препарата на модельных организмах показали, что препарат способен останавливать таупатию, не только препятствуя агрегации белка, но и способствуя распаду агрегатов белка тау на мономеры. На сегодняшний день успешно завершена фаза II клинических испытаний препарата. В большинстве случаев отмечалось существенное замедление умственной и личностной деградации пациентов.

В настоящее время в мире проводятся многочисленные преклинические исследования разнообразных препаратов для лечения БА. Например, препарат лираглутид – лекарственное средство широко используемое при лечении диабета. Было показано, что лираглутид способен проходить через гематоэнцефалический барьер и оказывать протективное действие на клетки мозга. Испытание препарата на мышах показало улучшение памяти и уменьшение на 30% количества агрегированного А β [McClean, Hölscher, 2014].

Еще один пример – препарат фенофибрат. Изначально этот препарат использовался для понижения уровня холестерина у пациентов с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний. Использование этого препарата для лечения БА обусловлено появлением большого количества свидетельств, связывающий метаболизм холестерина и формирование А β [Abdul-Nay et al., 2009].

В нашей лаборатории на трансгенных мухах *Drosophila melanogaster*, моделирующих патологию БА, были успешно протестированы несколько препаратов. Например, исследование миметиков аполипопротеина Е показало, что препараты успешно подавляли нейродегенерацию и восстанавливали когнитивные функции в *Drosophila*. Еще одним протестированным препаратом

является никотиновая кислота. Мы продемонстрировали, что потребление никотиновой кислоты трансгенными мухами увеличивало продолжительность жизни мух, а также существенно повышало 50%-ю выживаемость. Кроме того, мы показали, что никотиновая кислота способна замедлять нейродегенерацию, т.е. имеет нейропротективные свойства.

Из приведенного выше видно, что эффективность всех разрабатываемых и тестируемых препаратов недостаточна. Несмотря на множество позитивных фактов, ни один препарат полностью не решает поставленную задачу. Исходя из гетерогенности заболевания можно утверждать, что вероятность найти единственное лекарство, способное остановить или предотвратить развитие заболевания, достаточно мала. Создание комплексного терапевтического подхода для лечения БА с использованием максимально эффективных лекарственных средств – задача будущих исследований.

1.5 Моделирование основных признаков БА на животных

Поиск эффективных лекарственных препаратов для лечения БА невозможен без понимания полной картины всех молекулярных процессов, характерных для патогенеза БА. Редкие наследственные генетически обусловленные формы заболевания позволяют глубже проникнуть в суть молекулярных механизмов, ведущих к развитию нейродегенерации. Тот факт, что в большинстве случаев семейных форм заболевания наблюдались мутации в определенных генах, позволил предположить ведущую роль кодируемых ими белков в патогенезе и привел к созданию разнообразных трансгенных организмов, дающих возможность изучить роль этих белков и их мутантных форм в нейродегенеративных процессах.

В настоящее время созданы разнообразные трансгенные организмы, моделирующие основные признаки БА. Первые опыты по моделированию заболевания заключались в гиперэкспрессии *APP* в мышцах в попытке воспроизведения одного из основных признаков БА – амилоидогенеза. На сегодняшний день описано множество моделей трансгенных мышей, несущих в

своем геноме разнообразные мутации гена *APP*. Первые попытки создания моделей не принесли ожидаемых результатов. Однако в 1995 году Games et al удалось разработать трансгенную линию мыши *PDAPP*, экспрессировавших кДНК гена *APP* с мутацией *V117F*, ассоциированной с семейной формой БА, под промотором фактора роста β . В модельных мышах наблюдался крайне высокий уровень экспрессии *APP*, в результате чего у особей развивалась сильная альцгеймероподобная симптоматика, включающая экстраклеточное отложение А β , дегенерацию аксонов, разрастание астроцитарной нейроглии и потерю синаптической плотности. Интересно, что у мышей образование сенильных бляшек сначала происходило в гиппокампе, и только затем – в коре и лимбической доле головного мозга, что соответствует развитию БА у человека. У особей также фиксировались изменения поведенческих реакций, но, в отличие от человека, у мышей не происходила интенсивная потеря нейронов.

В качестве еще одного успешного примера моделирования БА можно рассмотреть линию *APP23*, разработанную компанией «Novartis». Мыши этого типа экспрессировали кДНК гена *APP* с мутацией *Swedish* под промотором *Thy1.2*, что приводило к отложению амилоидных бляшек и развитию амилоидной вазопатии. В отличие от предыдущей модели, к 18 месяцам у трансгенных мышей развивался дефицит поведенческих реакций и потеря 14% нейронов мозга [Van Dam et al., 2005].

Кроме того, трансгенные линии мышей используются для изучения таупатии, связанной с агрегацией белка тау. В 1995 году была разработана первая линия *ALZ7*, экспрессировавшая в своем геноме самую длинную изоформу тау-белка человека дикого типа. В мышах данного типа наблюдалось нарушение нормального функционирования протеина тау и его гиперфосфорилирование. Однако, формирование нейрофибриллярных клубков замечено не было [Gotz et al., 1995].

В дальнейшем было создано еще несколько моделей мышей, экспрессировавших гены различных изоформ тау-протеина человека дикого типа,

но ни в одной из них так и не удалось добиться образования нейрофибриллярных клубков, поэтому была создана линия, несущая в своем геноме ген *MAPT* с мутацией P301L, приводившей к агрегации протеина в спинном мозге, стволе головного мозга, мозжечке и промежуточном мозге. У этих мышей наблюдалась моторная дисфункция и потеря клеток спинного мозга [Gotz et al., 2001].

Благодаря модельным линиям мышей было обнаружено, что даже небольшое повышение уровня тау увеличивает риск развития БА. При скрещивании мыши, несущей в геноме ген *APP* человека, с мышью с нокаутом по *tau* не наблюдалось изменений поведенческих реакций или дефицита памяти, даже несмотря на высокий уровень $A\beta$ в мозге [Roberson et al., 2007].

Одним из основных отрицательных моментов моделирования патогенеза БА на мышах является достаточно продолжительное время, требуемое для манифестации ассоциированного с БА фенотипа. Поэтому для изучения БА используются также нематоды. Например, экспрессия гена дикого и мутантного типа тау приводила к поведенческим и синаптическим нарушениям в нематодах [Kraemer et al., 2003]. Благодаря исследования на нематодах было подтверждено участие белков *aph-1* и *rep-2* в формировании гамма-секретазного комплекса. Кроме того, на нематодах проводятся исследования по изучению мутаций PSEN-1 [Francis et al., 2002].

Распространенным модельным организмом является *Drosophila melanogaster*. В последнее время генетически хорошо изученные плодовые мушки стали использоваться как экспериментальная модель для изучения механизмов, лежащих в основе развития нейродегенеративных заболеваний человека, в частности, БА [Greeve et al., 2004; Finelli et al., 2004; Bilen and Bonini. 2005]. Большим преимуществом *Drosophila* является возможность направленной экспрессии генов в *Drosophila* благодаря системе GAL4/UAS [Brand and Perrimon, 1993]. Использование моделей БА на *Drosophila* позволяет одновременно измерить самые ранние изменения уровня синаптических белков и показатели когнитивных функций.

Экспрессия дикого и мутантного *tau* в *Drosophila* приводила к прогрессирующей нейродегенерации и преждевременной гибели мух и ускоряла отложение белка в холинэргических нейронах. В то же время, как и в мышцах, образование нейрофибриллярных клубков не происходило [Wittmann et al., 2001].

В *Drosophila* был обнаружен активный γ -секретазный комплекс, активность же β -секретазы либо полностью отсутствует, либо сведена к минимуму [Fossgreen et al., 1998]. Было показано, что дрозофильный гомолог β -секретазы человека может участвовать в процессинге APP человека, но расщепление происходит по сайту, отличному от сайта действия человеческой β -секретазы, в результате чего не происходит образование $A\beta$ [Greeve et al., 2004; Carmine-Simmen et al., 2009]. У *Drosophila* также есть гомолог APP человека – белок APPL, который не содержит последовательности $A\beta$. Было показано, что экспрессия человеческого APP в *Drosophila* совместно с геном β -секретазы (*BACE*) человека приводит к отложению $A\beta$ и сопутствующей этому патологии.

Экспрессия APP в *Drosophila* вызывала целый спектр нарушений, начиная от частичной смерти клеток мозга на стадии личинки [Fossgreen et al., 1998], до нейродегенерации в мозге имаго, ухудшению памяти и способности к обучению, нарушению клеточной адгезии и сигнальных механизмов [Sarantseva et al., 2009].

Прямая экспрессия в *Drosophila* последовательностей, кодирующих $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ приводила к появлению сильных, но различных фенотипов. Образование $A\beta_{42}$ приводило к отложению $A\beta$, изменению когнитивных функций и нейродегенерации, в то время как при образовании $A\beta_{40}$ при схожих когнитивных изменениях не обнаруживалась ни дегенерация нейронов, ни формирование агрегатов. Любопытно, что средняя продолжительность жизни мух с $A\beta_{42}$, составляла 24 дня. В то же время мухи с $A\beta_{40}$ жили более 30 дней, что, возможно, указывает на слабую токсичность или полное отсутствие токсичности данной формы $A\beta$ [Iijima et al., 2004].

Приведенные выше литературные данные показывают, что в настоящее время не существует единой теории, объясняющей весь патогенез БА. Выработка подобной теории невозможна без 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 приоритетных 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 кратчайшие сроки оценить влияние интересующих объектов исследования на биохимические процессы, происходящие в организме. В данной работе, используя *Drosophila*, мы проанализировали функции основного «источника» Аβ – белка APP, что крайне важно для разработки новых лекарственных препаратов, так как именно антиамилоидогенная терапия на сегодняшний день считается наиболее перспективным способом лечения БА. Кроме того хорошо развитая центральная нервная система и наличие гематоэнцефалического барьера, являющегося структурным и функциональным гомологом гематоэнцефалического барьера млекопитающих, делают *Drosophila* крайне удобным инструментом для быстрого анализа разнообразных веществ на их потенциальное позитивное влияние на нейродегенеративные процессы, наблюдаемые при БА. Подобный быстрый скрининг крайне важен для поиска новых эффективных препаратов для лечения заболевания.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Линии мух, использованные в работе, и условия их содержания

Были использованы следующие линии *Drosophila melanogaster* с экспрессией человеческого APP и его форм:

UAS-APP (далее в тексте *APP*) - содержит ген *APP* человека;

UAS-APP-Swedish (далее в тексте *APP-Swedish*) - содержит ген *APP* человека с мутацией Swedish;

UAS-APP Δ NT (далее в тексте *APP Δ NT*) - содержит укороченную форму гена *APP695*, в которой последовательность сигнального пептида соединена напрямую с последовательностью, кодирующей A β , трансмембранным доменом и цитоплазматическим хвостом;

UAS-APP Δ CT (далее в тексте *APP Δ CT*) - содержит укороченную форму гена *APP695*, в которой удалена большая часть цитоплазматического конца, за исключение короткого мембранного якоря (KKKR-stop).

Схематично это линии представлены на рис. 4

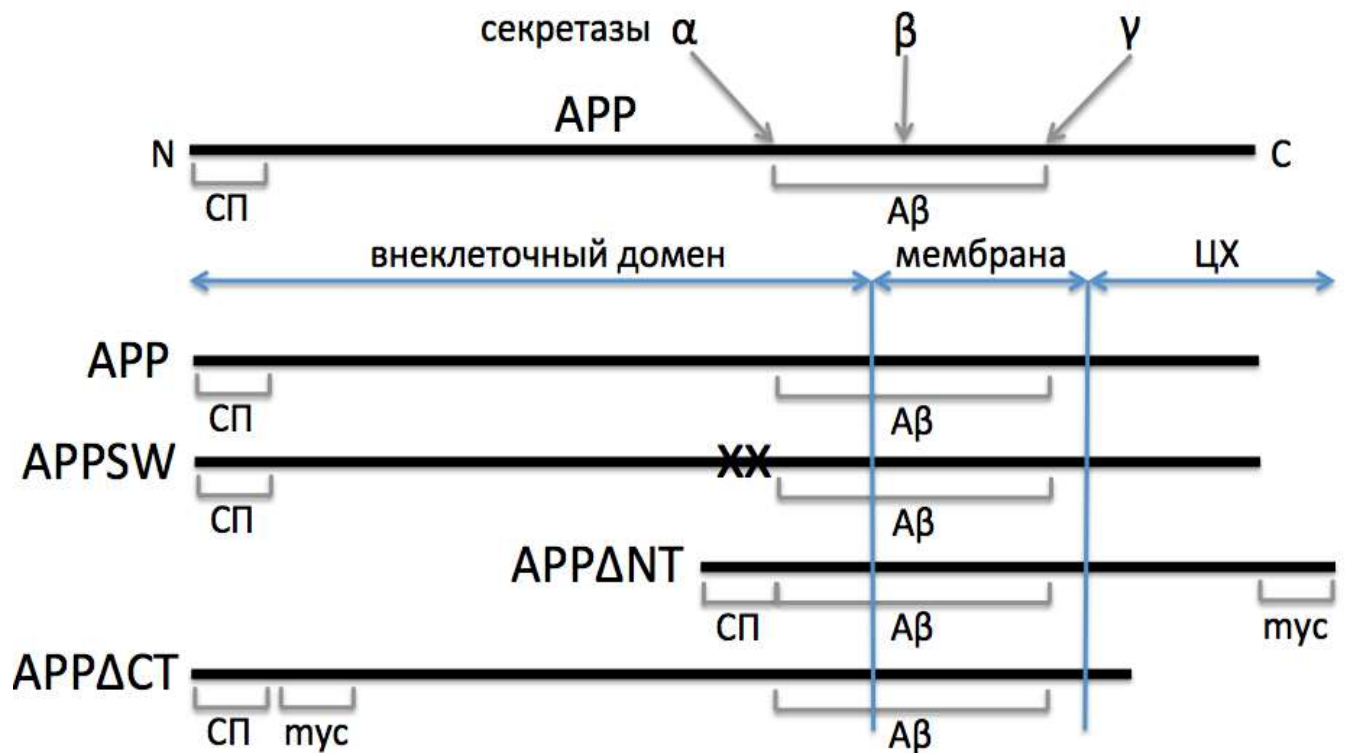


Рис. 4. APP и его формы, использованные в работе. Стрелками показаны сайты расщепления соответствующих секретаз, СП – сигнальный пептид, ЦХ – цитоплазматический хвост, хх - мутация Swedish, мус - мус-tag

Также в работе были использованы следующие линии:

UAS-APP.Abeta42 (далее в тексте *Abeta*) - содержит последовательность, кодирующую A β_{42} ;

UAS-BACE (далее в тексте *BACE*) - содержит ген бета-секретазы человека;

UAS-PSEN1 (далее в тексте *PSEN1*) - содержит ген пресенилина 1 человека;

UAS-PSEN1.M146V (далее в тексте *PSEN1-M146V*) - содержит ген пресенилина 1 человека с мутацией, приводящей к одноаминокислотному замещению M146V;

UAS-PSEN1.P267S (далее в тексте *PSEN1-P267S*) - содержит ген пресенилина 1 человека с мутацией, приводящей к одноаминокислотному замещению P267S;

UAS-GFP – содержит последовательность, кодирующую белок GFP (green fluorescence protein – далее в тексте *GFP*).

Линии *Drosophila melanogaster*, использованные в работе, были получены из коллекции *Drosophila* Bloomington Stock Center.

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

Мушки содержались на стандартной дрожжевой среде при температуре 25°C при 12 часовом световом дне.

В опыте по оценке морфологических аномалий в трансгенных мушках также использовалась среда обогащенная мелассой. Для этого к стандартной дрожжевой среде добавлялось 10% мелассы.

В опыте с белым и красным пигментом дрожжей до достижения возраста в 25 дней мушки содержались на агаре с дрожжами, как образующими, так и не образующими красный пигмент.

2.2 Анализ выживаемости куколок трансгенных особей *Drosophila melanogaster*

Для оценки выживаемости куколок необходимые для скрещивания мушки помещались в емкости со стандартной дрожжевой средой на срок до 1 дня, после чего удалялись. На 12 день после удаления родителей фиксировалось количество

вылупившихся мух. После чего определялось процентное отношение числа вылупившихся мух к общему количеству образовавшихся куколок.

2.3 Подготовка образцов для микроскопии морфологических изменений внешних органов и ротового аппарата трансгенных особей *Drosophila melanogaster* на стадии имаго

Анализ морфологических изменений ротового аппарата трансгенных особей *Drosophila melanogaster* на стадии имаго проводили у 1-дневных мух. После обработки эфиром животных с удаленными крыльями на 30 минут помещали в 10% КОН, нагретый до 95°C, после чего промывали водой и инкубировали в смеси глицерина и 1М Tris-HCl pH 7.5 (соотношение 9:1) в течение 12 часов. Затем головы отделяли от тела и фотографировали.

Для исследования изменений морфологии крыльев, abdomена и головы использовали стереомикроскоп.

2.4 Оценка количества морфологических аномалий в трансгенных особях *Drosophila melanogaster*

Частота появления морфологических аномалий определенного типа в трансгенных мухах высчитывалась следующим образом: для каждого опыта определялось число мух с морфологическими аномалиями определенного типа, после чего вычислялось процентное отношение получившегося значения к общему количеству аномалий.

Для оценки распределения частоты морфологических аномалий по генотипам, определяли общее число мух с любым количеством и типом аномалий относительно общего числа вылупившихся мух.

Среднее число морфологических аномалий на муху с дефектами развития определялось следующим образом: в каждом опыте для каждой мухи высчитывалось количество морфологических аномалий, проявившихся в данной мухе, после чего получившиеся значения суммировались и итоговое значение делилось на общее число мух с любым дефектом развития.

Для оценки распределения морфологических аномалий относительно пола определялось процентное отношение как самцов, так и самок с дефектами развития к общему количеству имаго с морфологическими аномалиями.

2.5 Выделение РНК

Для выделение РНК использовали 40 голов мух нужного генотипа. Выделение проводили с помощью набора фирмы-производителя «Zymo Research ZR Tissue & Insect RNA MicroPrep™» согласно протоколу. В процессе выделения, согласно дополнительному протоколу, образцы обрабатывали ферментом ДНКазой (ООО "БиолоТ") для предотвращения контаминации РНК.

Целостность фракций РНК проверяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле.

2.6 Обратная транскрипция

Все манипуляции с РНК и реактивами для реакции обратной транскрипции проводились на льду. В стерильную пробирку были добавлены следующие компоненты: 1мкг выделенной РНК, 0.5мкг праймеров Fermentas Oligo(dT) 18 Primer (100пМ), 6 мкл воды двойной дистилляции. Полученную смесь инкубировали 5 минут при температуре 70°C после чего пробирку помещали на лёд. Затем к смеси добавили Fermentas RiboLock RNase Inhibitor (конечная концентрация - 20ЕА), 4мкл буфера Fermentas 5X Reaction Buffer for RT (конечные концентрации компонентов: 4мМ MgCl₂, 50мМ Tris-HCl [pH8.3 при 25оС], 50мМ KCl, 10мМ DTT) и смесь 10mM dNTP Mix (Fermentas) (конечная концентрация каждого нуклеотида - 1мМ). Полученную смесь инкубировали 5 минут при 37оС, после чего добавили обратную транскриптазу Fermentas RevertAid M-MuLV RT (40ЕА) и продолжили инкубировать при 37°C в течение часа. По истечении часа смесь инкубировали 10 минут при 70°C для остановки процесса.

2.7 Проведение ПЦР в реальном времени

Для определение уровня транскрипции мРНК исследуемых генов использовался метод Taqman® real-time PCR - количественной ПЦР в режиме

реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan. Используемые в методе праймеры и пробы были разработаны в программе PrimerExpress. Для нормирования результатов в качестве референс-генов были использованы гены *RP-49* (рибосомальный протеин L32) и *GAPDH2* (глицеральдегид 3 фосфат дегидрогеназа 2) *Drosophila*. В качестве флуоресцентной метки зондов для кДНК генов *RP-49* и *GAPDH2* использовался краситель R6G, зондов для кДНК генов *sytl*, *n-syb*, *psn* и – FAM. По возможности пробы подбирались таким образом, чтобы их отжиг происходил в местах соединения экзонов. Этим предотвращалось возможное искажение получаемых результатов геномной ДНК. Подобранные праймеры и пробы были произведены фирмами «Бигль» (Санкт-Петербург) и «Синтол» (Москва).

Таблица 2.

Нуклеотидные последовательности используемых праймеров и проб

<i>sytl</i>	Прямой праймер	5'- CCTGGTCAGCGTTGAAGGA -3'
	Обратный праймер	5'- GCAGCGAGAAGCAGATATCT -3'
	Проба	FAM-AGGGCGGACAGGAAA-RTQ1
<i>n-syb</i>	Прямой праймер	5'- GGCGGCGTGTAAGCAATC -3'
	Обратный праймер	5'- CCCGCTGAAGGAGCACACTA -3'
	Проба	FAM-CGCTGCCAGGACGAAAGTTTCTCGA-RTQ1
<i>psn</i>	Прямой праймер	5'- TGGACTGCCTGGGCTGTA -3'
	Обратный праймер	5'- TCCTCTTGGCGAAAGGACA -3'
	Проба	FAM-CTGCCATTTCTATTTGGGATCTT-RTQ1
<i>RP49</i>	Прямой праймер	5'- AGCACTTCATCCGCCACC -3'
	Обратный праймер	5'- CGACGCACTCTGTTGTCG -3'
	Проба	R6G-CTAAGCTGTCGCACAAATGGCG-BHQ1
<i>GAPDH2</i>	Прямой праймер	5'- TGGCCAAGGTGATCAACGACAA -3'
<i>GAPDH2</i>	Обратный праймер	5'- ACAACTTGCCGGAAGGTCCAT -3'

	Проба	R6G-TGATGACCACCGTTCATGCCACCACCGCT- BHQ1
--	-------	--

Реакционная смесь для проведения амплификации состояла из следующих компонентов: 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Triton X-100, 2,5 мМ MgCl_2 , 5 мкл смеси четырех dNTP, по 1,5 пмоль каждого праймера и 2,5 пмоль флуорогенного зонда, 5 ед. термостабильной высокопроцессивной рекомбинантной Taq ДНК полимеразы и 1 мкл кДНК. Перед амплификацией реакционная смесь инкубировалась при 50°C в течение 2-х минут, после чего следовала денатурация при 95°C в течение 10 мин. 1 цикл амплификации состоял из двух этапов: денатурации при 95°C в течение 15 сек и отжига при 60°C в течение 1 мин. Цикл повторялся 50 раз. Для минимизации возможных отклонений каждый образец был амплифицирован в трех экземплярах.

Пример получаемых в результате амплификации кинетических кривых представлен на рис. 5.

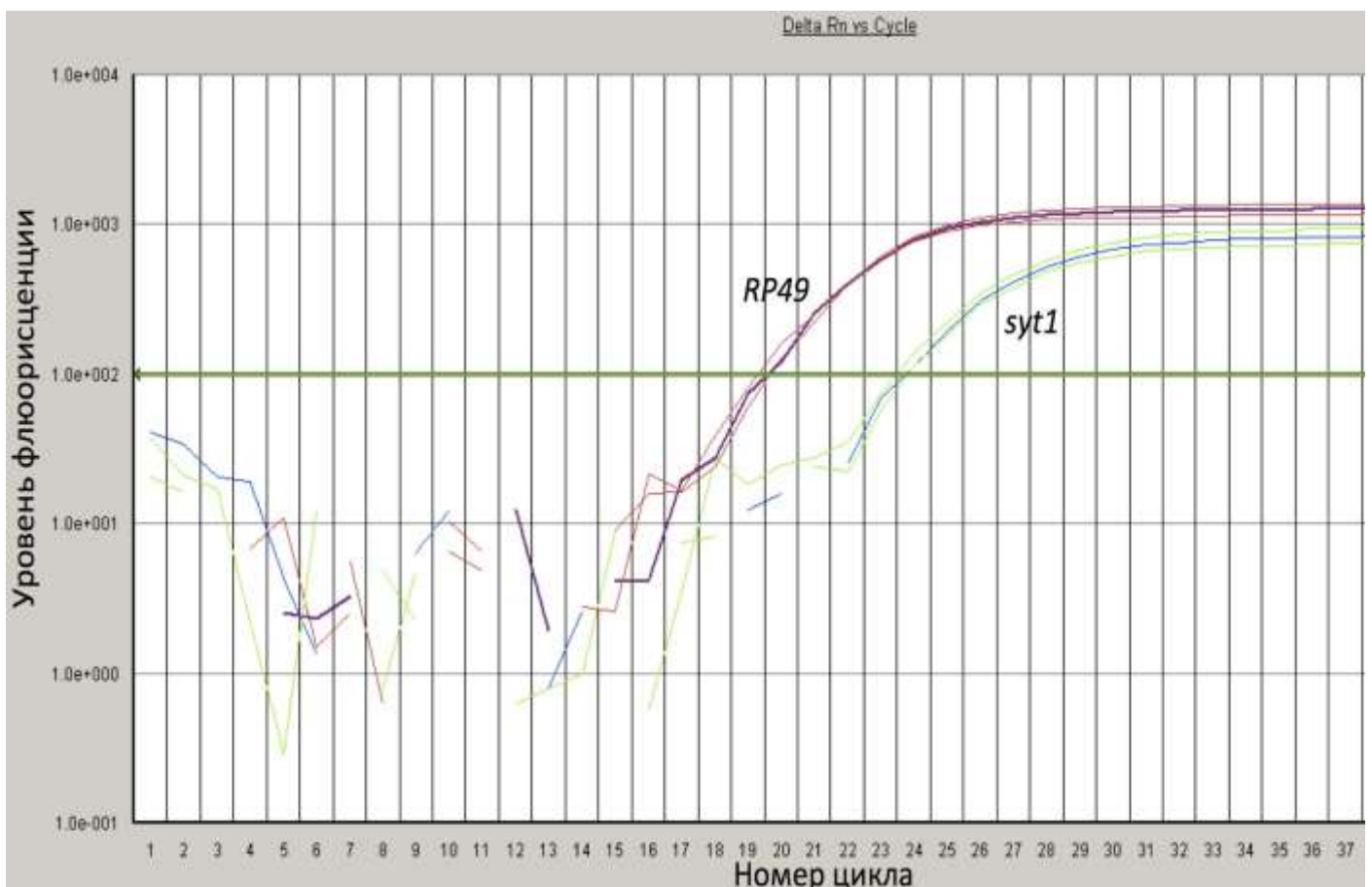


Рис. 5. Кинетические кривые кДНК генов *syt1* и *RP49*.

Для всех исследуемых и референсных генов строилась стандартная кривая, используя следующие разведения контрольной кДНК: 1, 1/8, 1/16.

На рис. 6 представлен пример стандартных кривых для генов *syt1* и *RP49*

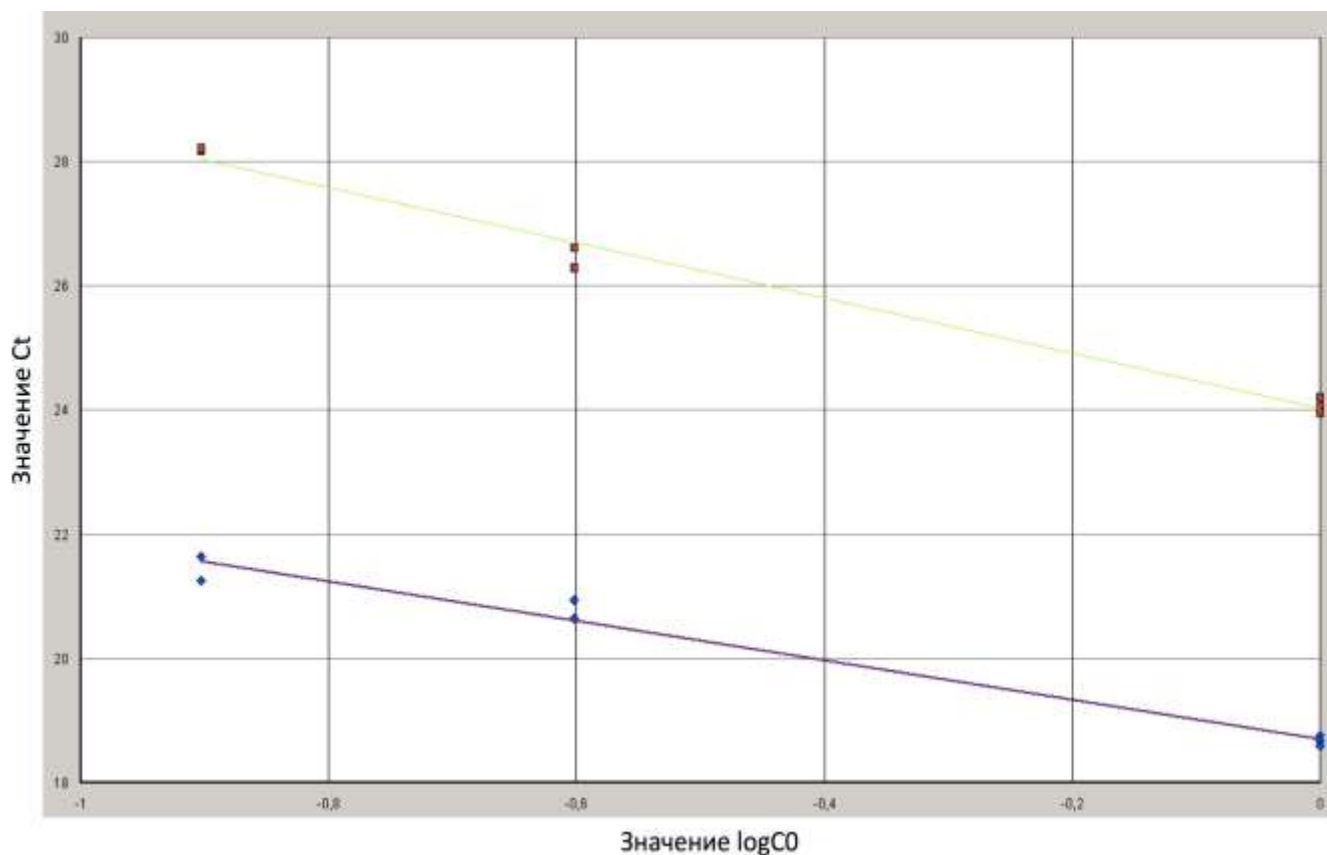


Рис. 6. Стандартные кривые для генов *syt1* и *RP49*

Использование различных флуорогенных меток (FAM и RG6) позволило проводить амплификацию исследуемого и референсного гена в одной пробирке.

2.8 Определение статуса метилирования промоторной области генов *syt1* и *n-syb*

Определение статуса метилирования промоторной области гена проводилось при помощи набора фирмы-производителя Zymo Research OneStep qMethyl™ согласно протоколу. Для амплификации фрагментов промоторных областей исследуемых генов были подобраны следующие праймеры:

syt1: fwd – GTACGCATGCACCAAAAAC, rev – ACACGCTCCAGGAGCAGC;

n-syb: fwd – GATCAAACCAAATGTCAACCA, rev –
CCCCGTCGTCAATGAAAAT;

В наборе используются рестриктазы AccII, HpaII, HpyCH4IV, разрезающие опытную ДНК около CG-пары только при отсутствии метилирования цитозина в CG-паре.

Промоторная область составляла: 396 пар нуклеотидов до старт-кодона для *sytl* и 634 пары нуклеотидов до старт-кодона для *n-syb*

2.9 Анализ выживаемости трансгенных особей *Drosophila melanogaster* на стадии имаго

Для анализа выживаемости использовали имаго *Drosophila melanogaster*. После вылета трансгенные мухи помещались в пробирки с агаром, содержащие штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, продуцирующие красный пигмент. Равное количество мух помещалось в пробирки с агаром, содержащие изогенный штамм *Saccharomyces cerevisiae*, не являющийся продуцентом красного пигмента. В каждую пробирку помещалось 30 имаго, на каждый эксперимент бралось не менее 300 мух. Каждый эксперимент проводили в 3-х повторностях. Мухи содержались при 29°C. Обновление корма проводили каждые два дня. Параллельно с этим фиксировали количество умерших имаго. Каждый эксперимент продолжался до момента гибели последней мухи. В конце эксперимента определяли показатель средней продолжительности жизни и показатель 50% гибели мух.

2.10 Определение и анализ уровня нейродегенерации в мозге взрослых трансгенных особей *Drosophila melanogaster*

Головы мух отделяли от тела и помещали в свежеприготовленный фиксатор Карнуа на 24 часа при температуре 4°C. Далее проводили обезвоживание препарата в 100%-ом этаноле и метиловом эфире бензойной кислоты и заливку объектов в парафин. Полученные препараты использовали для приготовления парафиновых срезов, толщиной 6 мкм. Далее срезы окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали на световом микроскопе Leica DM 2500. Оценка

степени нейродегенерации проводилась с помощью программы ImageJ, определяли соотношение площади вакуолей ко всей площади мозга. Анализировали серии из 16-18 срезов головного мозга 6 мух каждого генотипа.

2.11 Подготовка образцов и проведение конфокальной микроскопии для детекции амилоида в мозге имаго *Drosophila melanogaster*

Для проведения конфокальной микроскопии головы мух отделяли от тела и помещали в свежеприготовленный раствор фосфатно-солевого буфера (PBS). Затем фиксировали в растворе 4% параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) 7 минут при комнатной температуре. После фиксации промывали в PBS и выделяли мозг. Подготовленный мозг заключали в раствор PBS с глицерином в соотношении 1:1.

Для детекции A β ₄₂ использовали моноклональные антитела 6E10 («Covance», Catalog Number: SIG-39320). И в том и в другом случае использовали вторичные антитела Cy3 («JacksonImmunoResearch», USA). Конфокальная микроскопия была проведена с помощью микроскопа Leica TCS SP5 («Leica», Германия) со встроенным 35-мВт аргонным лазером.

2.12 Оценка изменения локомоторной активности, способности к обучению и формированию памяти трансгенных особей *Drosophila melanogaster* на стадии имаго

Оценку изменения локомоторной активности трансгенных мух проводили в пластиковом флаконе с нанесенной на расстоянии 9 см от дна отметкой. 20 особей помещалось во флакон, флакон встряхивался, в результате чего мухи оказывались на дне. Через 15 секунд подсчитывали количество мух, пересекших отметку в 9 сантиметров. Каждый эксперимент проводился в 3х повторностях. В каждом эксперименте использовали не менее 300 мух.

Оценку способности мух к обучению и формированию памяти проводили по методике, предложенной Тулли и Квином (Tully, Quinn, 1985). *Drosophila* обладает хорошо развитой нервной системой и способна обучаться, т.е.

вырабатывать условные рефлексy на те или иные раздражители. В данном опыте мух помещали в трубку, через которую прокачивали воздух с одним из двух нейтральных пахучих веществ (3'-октанол и 4-метилциклогексанол). Трубка изнутри была покрыта металлической сеткой, способной проводить электрических ток. «Обучение» проводилось в три этапа. На первом этапе мухи в течение 1 минуты получали слабые удары электрическим током в присутствие первого нейтрального запаха. Затем следовал минутный перерыв. На последнем этапе мухи подвергались воздействию второго нейтрального запаха, но уже без электрического тока. После этого оценивали способность мух к обучению. Для этого мухи помещались в центр трубки, в которой на равном расстоянии от центра находились перечисленные выше источники запахов. Воздух, нагнетаемый с обеих сторон выходил через отверстие в центре трубки. Таким образом мухи оказывались между встречными потоками двух запахов. Оценивалось количество мух, сделавших правильный выбор (переместившихся в сторону запаха, который не сочетался с электрическим током) и сделавших неверный выбор (соответственно, в сторону запаха, сочетавшегося с током). Для оценки памяти мух подобный эксперимент проводился через 1 час.

Используя полученные данные определялся индекс обучаемости и памяти: из числа мух, сделавших «правильный» выбор (т.е. выбравших обонятельный стимул, не совмещенный с электрическим током), вычитали число мух, сделавших «неправильный» выбор. Полученную разность делили на общее число мух и умножали на 100. Схема установки приведена на рис.7.

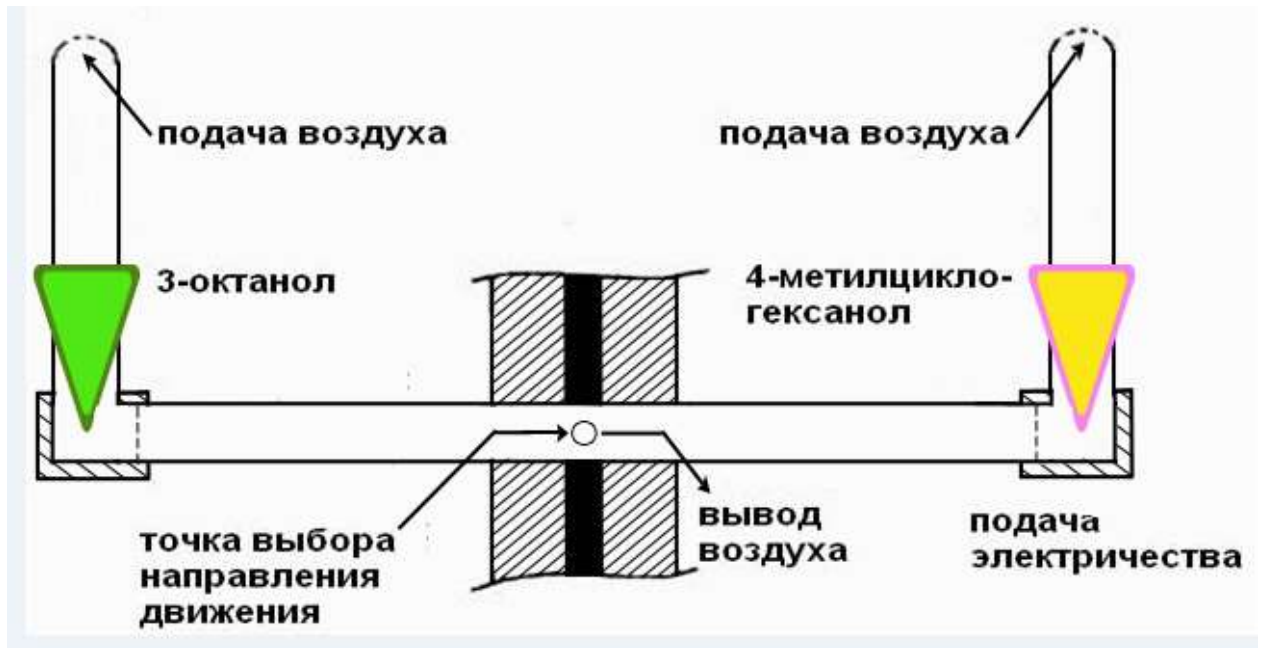


Рис. 7. Схема установки для тестирования мух на способность к обучению и формированию памяти

2.13 Измерение уровня белков в мозге трансгенных особей *Drosophila melanogaster*

Для выделения белка использовали 30 голов 20-дневных мух нужного генотипа. Мух замораживали в жидком азоте, после чего отделяли головы с помощью вортексирования. Головы гомогенировали в растворе, содержащем PBS, 1% SDS и ингибиторы протеаз (фирма Roche). Гомогенат центрифугировали при скорости 14000g в течение 2х минут, получившийся супернатант отделяли и использовали для измерения уровня растворимого A β . Осадок дополнительно растворяли в лизирующем буфере, содержащем мочевины (9M мочевины, 1% SDS, 25 mM Tris HCl, 1 mM EDTA), получившийся раствор выдерживали в течение 1 часа при 55°C. Затем раствор центрифугировали при 14000g в течение 2х минут и отбирали супернатант, который затем использовался для измерения уровня нерастворимого A β .

Количество общего белка определяли по методу Бредфорда с использованием специализированного набора («Силекс», Россия) на спектрофотометре («Hitachi», Japan).

Уровень Аβ в мозге мух определялся с помощью метода вестерн блоттинга. Подготовка проб для электрофореза производилась следующим образом: к белковым пробам добавлялся буфер Лаемли (200мМ Tris-HCl pH 6,8, 400 мМ β-меркаптоэтанол, 4% додецилсульфат, 0,01% бромфенол, 40% глицерол) в соотношении 1 объем буфера к 2 объемам белка. Получившийся раствор грели при 100°C в течение 5 минут. Для проведения электрофореза получившиеся пробы наносили на 12% полиакриламидный гель (SDS-PAGE) в объеме, содержащем равное количество общего белка. Электрофорез проводился в 1X трис-глициновом буфере (5мМ Tris-HCl pH 8,8, 50 мМ глицина (pH 8,3), 0,1 % додецилсульфата).

Перенос белков с полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Thermo Scientific, США) производился с помощью прибора для полусухого переноса белка (Bio-Rad, США). Для переноса использовался следующий буфер для переноса: 39 mM глицина, 48 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,037 % додецилсульфата, 20 % метанола. После переноса мембрана забивалась в 5% обезжиренном сухом молоке в течение 2 часов при температуре 25 °C. С помощью маркера молекулярного веса определялась линия разреза мембраны таким образом, что в первой части мембраны содержался альфа-тубулин (α -tub), а во второй – исследуемый белок. Фрагменты мембраны инкубировались в соответствующих первичных антителах в течение ночи при +4°C. Затем мембраны промывались в PBST (10% tween-20 в PBS) три раза по пять минут и помещались во вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой ab97040 («Abcam», Великобритания). Инкубация со вторичными антителами проводилась в течение 2-х часов при комнатной температуре. После этого повторялся этап промывки в PBST. Детекция белков проводилась при помощи набора SuperSignal® West Pico Rabbit IgG Detection Kit («Thermo Scientific», США) с использованием фотопленки. Для анализа результатов использовалась программа ImageJ (версия 1.48). Количество исследуемого белка было нормировано сравнением с α -tub.

2.14 Статистическая обработка данных

Статистический анализ был проведен с использованием программы KuPlot версии 2.0. Статистический анализ проводили с помощью критерия множественных сравнений Тьюки-Крамера. Статистическая значимость учитывалась при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего \pm ст. ошибка среднего.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Аномалии развития *Drosophila* с гиперэкспрессией гена *APP* и с образованием А β

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].

Трансгенные мыши с гиперэкспрессией *APP* человека демонстрировали разнообразные когнитивные и нейродегенеративные изменения, дефекты развития нервной системы, кроме того наблюдалось снижение продолжительности жизни. На клеточных культурах было показано участие *APP* в дифференциации нейронов и клеточной адгезии.

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 *Drosophila melanogaster*. Кроме того, мы провели совместную экспрессию этих генов с геном β -секретазы человека *BACE*. Так как у *Drosophila* есть все необходимые компоненты, ответственные за активность γ -секретазы, совместная экспрессия *APP* и *BACE* приводила к образованию А β и последующему его отложению.

3.1.1 Выживаемость на стадии куколки трансгенных особей *Drosophila* с гиперэкспрессией гена *APP* человека и образованием А β

В предыдущих работах было показано, что гиперэкспрессия *APP* как отдельно, так и совместно с *BACE* приводила к существенному падению продолжительности жизни имаго [Sarantseva et al., 2009]. В данной работе мы проанализировали выживаемость куколок трансгенных особей *Drosophila*. Мы показали, что как экспрессия *APP*, так и образование А β приводили к высокой летальности организмов на стадии куколки. На рис. 8 представлена зависимость выживаемости куколок от генотипа.

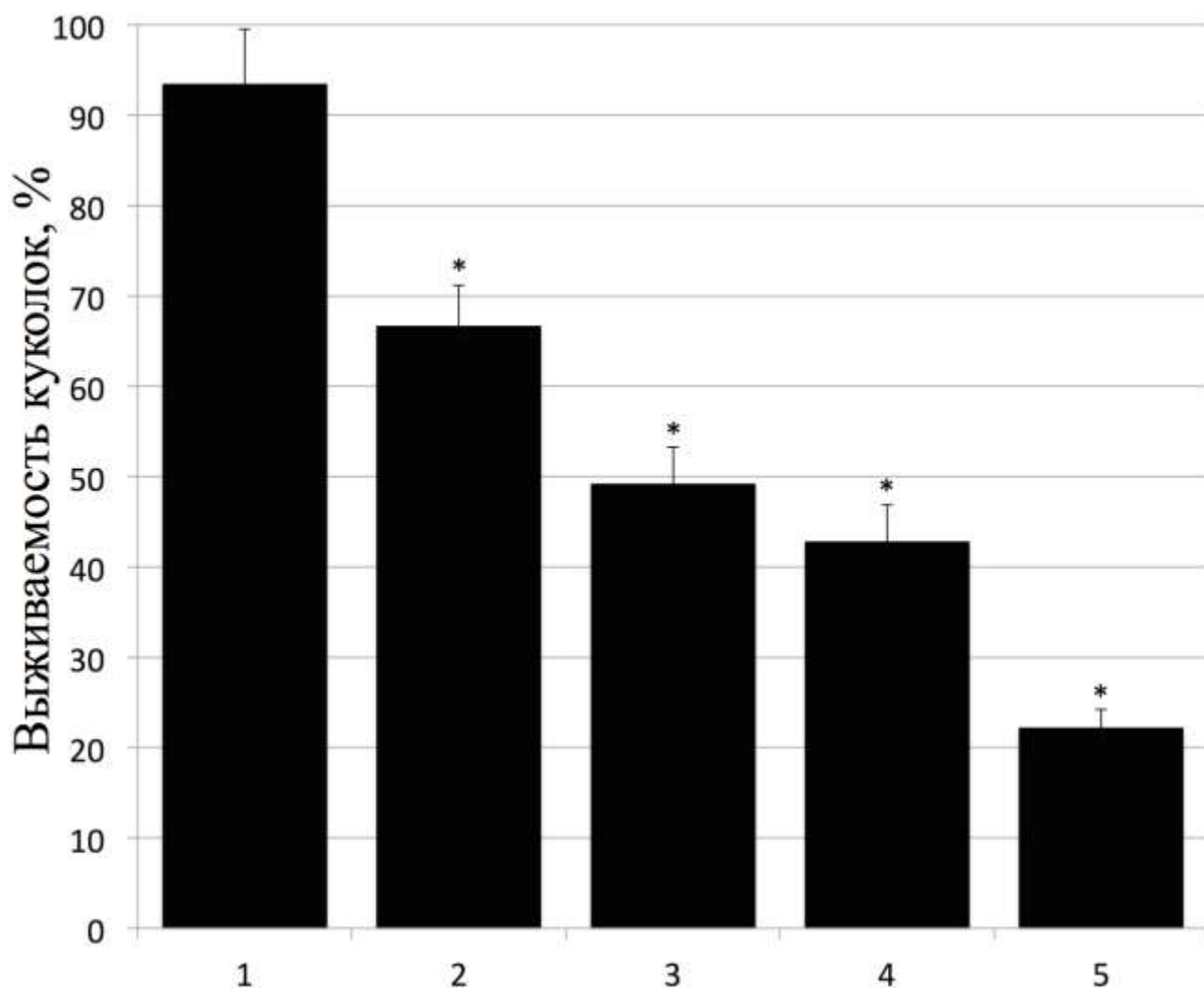


Рис. 8 Выживаемость куколок в зависимости от генотипа (%)

1-*elav*;+, 2-*elav*; *BACE*/*APP-SW*, 3-*elav*; *BACE*/*APP*, 4-*elav*; *APP-SW*, 5-*elav*; *APP*

Как видно из приведенных выше данных, экспрессия *APP* приводила к значительному снижению выживаемости куколок, что указывает на наличие дефектов развития уже на самых ранних этапах жизни *Drosophila*. В то же время экспрессия *APP-SW* или *APP* и *APP-SW* совместно с *BACE* приводила к заметному снижению смертности куколок у трансгенных мух.

3.1.2 Морфологические изменения имаго *Drosophila* с гиперэкспрессией гена *APP* человека и образованием A β

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 изменениях самого хоботка,

недоразвитых крыльев и раздутых абдоменов, заполненных гемолимфой, что говорит об активном воспалительном процессе. Пример морфологических аномалий, наблюдаемых при экспрессии *APP* представлен на рис. 4.

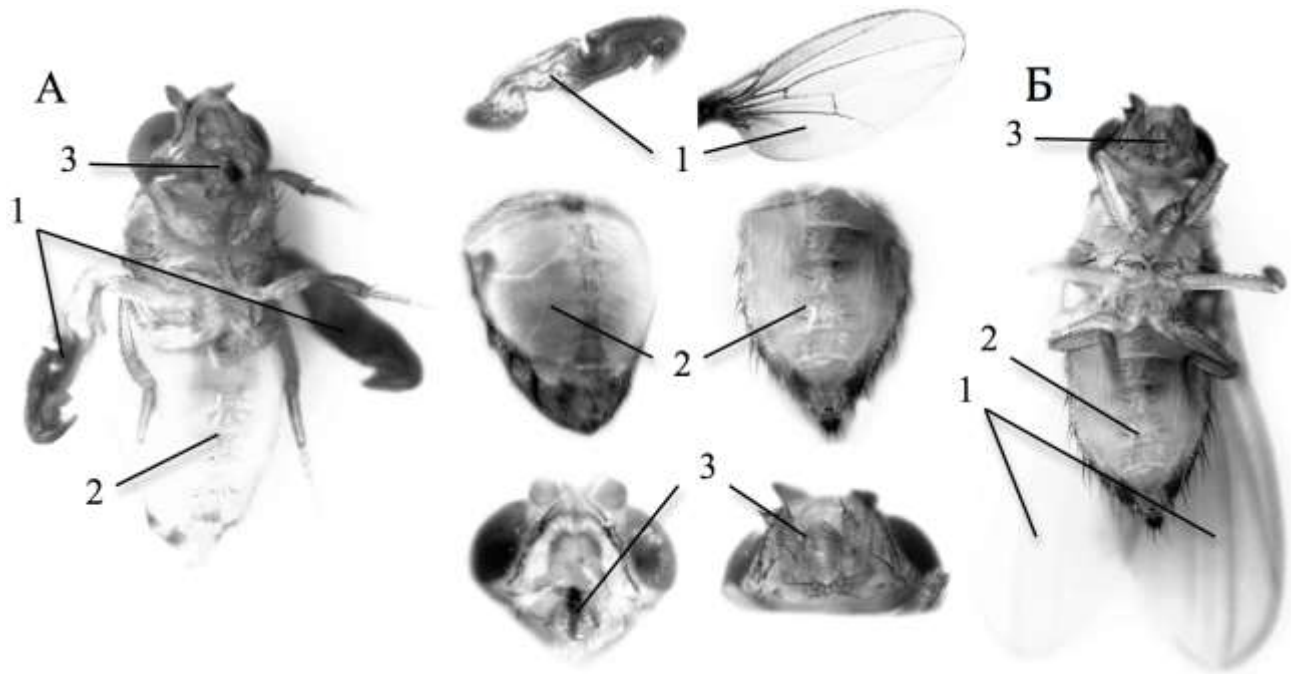


Рис. 9. Морфологические аномалии в мухах с гиперэкспрессией *APP*. А) Гиперэкспрессия *APP* вызывает сильную деформацию и некроз хоботка, неразвитые крылья и раздутый abdomen; Б) Мухи генотипа *elav;+;+* не обнаруживают морфологических аномалий. 1-крылья, 2-abdomen, 3-хоботок

Такие мухи были нежизнеспособны и погибали в течение первых дней после вылупления. Повышенная летальность, по-видимому, была вызвана изменениями ротового аппарата (рис. 11), что приводило к невозможности потребления мухами пищи.

Интересно, что наблюдаемые морфозы могли проявляться как совместно, так и отдельно друг от друга. Изменения же ротового аппарата в большинстве случаев сопровождалась меланизацией тканей.

Вне зависимости от исследуемого генотипа наиболее часто встречались дефекты развития ротового аппарата и меланизация хоботка, реже – недоразвитые крылья и раздутый abdomen.

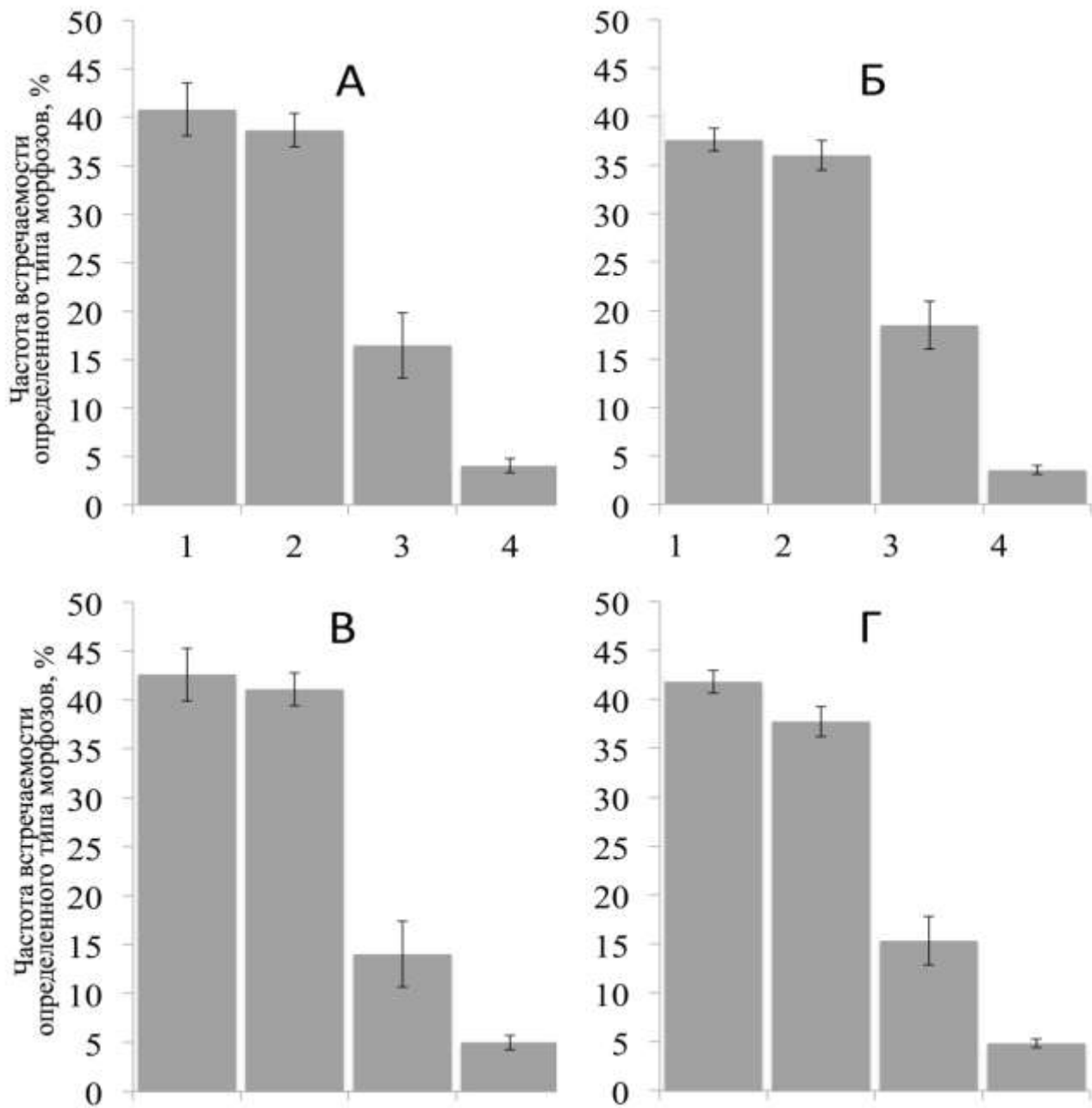


Рис. 10. Распределение типов морфозов по отношению к общему количеству морфозов.

А) Мухи генотипа *elav*; APP; Б) Мухи генотипа *elav*; BACE/APP; В) Мухи генотипа *elav*; APP-Swedish; Г) Мухи генотипа *elav*; BACE;APP-Swedish. 1-деформация хоботка; 2-некроз тканей; 3-недоразвитые крылья; 4-раздутые abdomены.

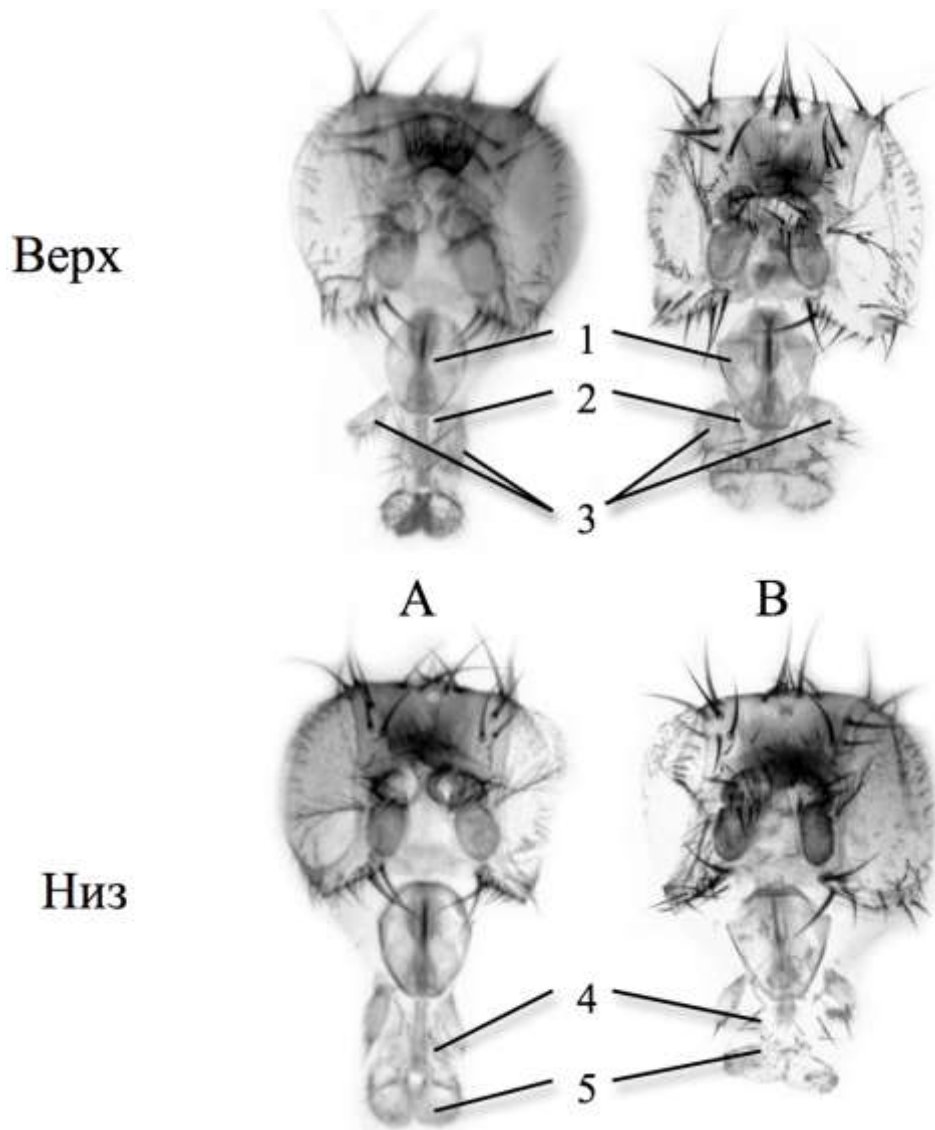


Рис. 11. Деформация хоботка в мухах с гиперэкспрессией *APP*.

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% утолщение верхней и нижней губ. 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.

3.1.3 Распределение морфологических аномалий имаго *Drosophila* в зависимости от генотипа исследуемых мух

Мы исследовали частоту встречаемости аномальных морфологических изменений или морфозов у взрослых мух различных генотипов, выращенных как на стандартной дрожжевой среде, так и на более питательной среде, содержащей мелассу. Среда с мелассой была использована в эксперименте для оценки влияния калорийности на частоту возникновения аномальных морфологических изменений. Результаты эксперимента представлены на рис. 12.

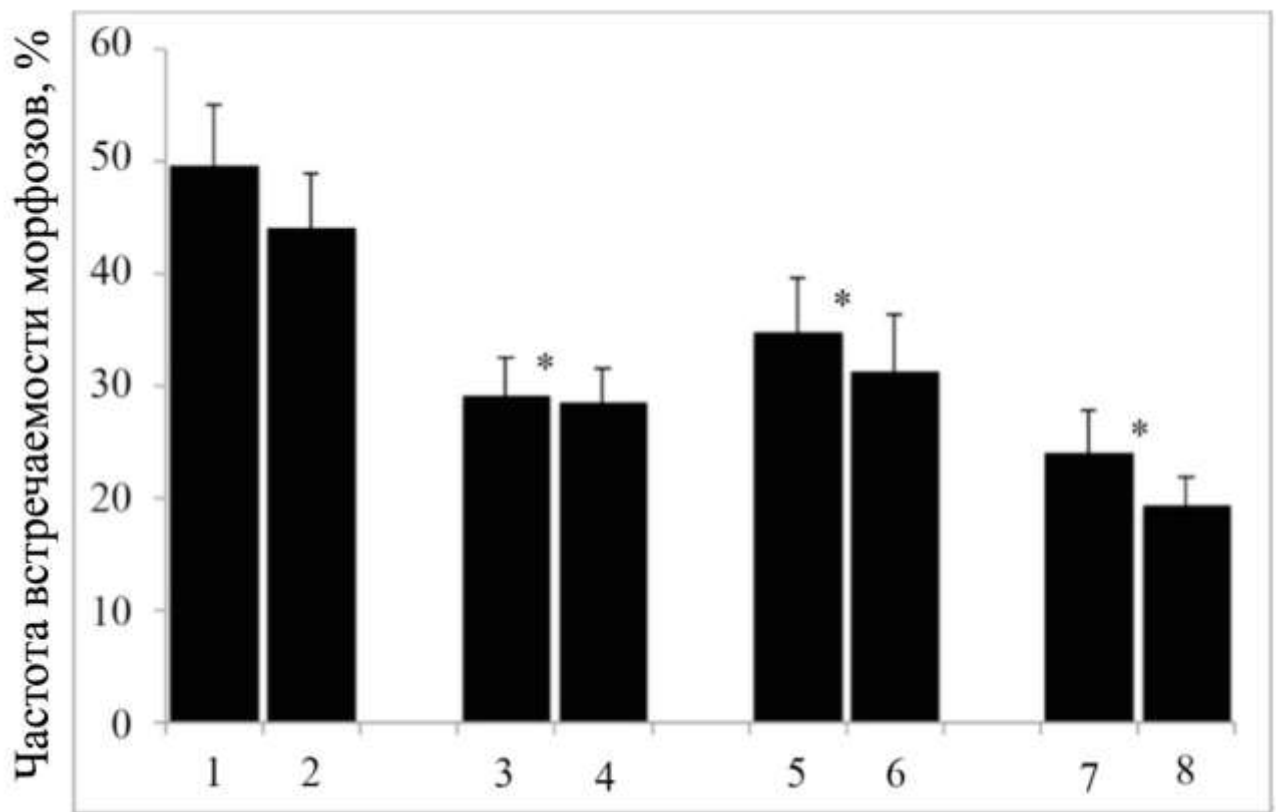


Рис. 12. Частота встречаемости морфозов (%)

1-elav;APP, 2-elav;APP + меласса, 3-elav;APP-SW, 4-elav;APP-SW + меласса, 5-elav;BACE/APP, 6-elav;BACE/APP + меласса, 7-elav;BACE/APP-SW, 8-elav;BACE/APP-SW + меласса.

Как видно из приведенных выше графиков, частота появления 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 $A\beta_{42}$ 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 мозге *Drosophila* приводит к наблюдаемым патологическим дефектам развития.

Chakraborty et al., исследуя те же трансгенные линии, связал морфологические аномалии развития *Drosophila* с отложением $A\beta$ и образованием амилоидных агрегатов. Было предположено, что подобные аномалии вызываются активацией воспалительного ответа в ответ на образование и олигомеризацию $A\beta$, что противоречит полученным нами данным. В нашем исследовании мы показали, что частота морфозов значительно падает именно в линиях, в которых происходит образование $A\beta$. Высокая смертность куколок и мух с экспрессией полноразмерного *APP* подтверждает, что именно экспрессия этих генов, а не образование $A\beta$ ответственна за наблюдаемые дефекты развития.

Подобные дефекты и в самом деле могут быть вызваны работой иммунной системы *Drosophila*. Однако мы полагаем, что за активацию иммунного ответа в данном случае ответственен именно полноразмерный *APP*.

Анализируя полученные данные, мы предположили, что наблюдаемые при экспрессии *APP* морфологические изменения вызываются активацией иммунного ответа через TLR (Toll-like receptors) рецепторы. Green et al. наблюдали схожие

аномалии развития *Drosophila*, а именно меланизацию, некротические изменения хоботка и увеличение абдоменов при активации сигнального пути TLR.

TLR – часть сигнального каскада врожденного иммунитета. Основная функция TLR – распознавание консервативных структур микроорганизма и активация иммунного ответа. Конечным этапом сигнального пути TLR у *Drosophila* является активация двух представителей семейства факторов транскрипции NF-κB – белков Dif и Dorsal. Интересным фактом является то, что, согласно Grilli et al., в 5'-регуляторной области гена *APP* содержатся две идентичные последовательности, являющиеся специфичными сайтами связывания белков активаторов транскрипции NF-κB. Они также показали, что активность этих сайтов коррелирует с уровнем экспрессии гена *APP*.

Более того, было показано усиление экспрессии гена *APP* при активном воспалительном процессе (например, в мозге пациентов с травмой мозга) [Murakami et al., 1998]. Подобные же результаты были получены и в экспериментах на крысах [Itoh et al., 2009].

Кроме того гиперэкспрессия *APP* может приводить к дестабилизации генома и нарушению репарационных процессов. Stante et. al. показали, что *APP* необходим для активации и переноса в ядро белка FE65, который обнаруживается повсеместно в геноме и принимает участие в конденсации хроматина. Кроме того, FE65 играет центральную роль в рекрутировании ацетилтрансферазы TIP60, принимающей участие в ацетилировании гистона H4 при репарации повреждений ДНК. В ряде работ показано увеличение транскрипции *APP* при развитии различных форм рака. Дестабилизация генома в свою очередь может приводить к дефектам развития *Drosophila*, что и обуславливает появление аномальных морфологических изменений.

Другим возможным механизмом является участие белка Notch в развитии *Drosophila*. Наблюдаемые нами патоморфологические изменения могут быть следствием конкуренции между полноразмерным *APP* и белком Notch при их взаимодействии с функциональными партнёрами. Notch принимает участие в

клеточной дифференциации и пролиферации путем регуляции генной экспрессии [Wolfe M.S., 2002]. Непосредственно в регуляции экспрессии участвует короткий пептид NICD, отщепляющийся от Notch в результате процессинга белка двумя протеазами, одной из которых является γ -секретаза [Hartmann et al., 2001]. В то же время, γ -секретаза участвует в процессинге APP. Гиперэкспрессия APP в трансгенных мухах приводит к возникновению конкуренции между APP и Notch за γ -секретазу, что в конечном итоге и приводит к аномальному развитию трансгенных мух. Также APP может выступать в роли лиганда Notch, тем самым активируя сигнальный путь Notch, что приводит к чрезмерному образованию NICD, что, в свою очередь, также может вызывать отклонения в развитии мух [Oh et al., 2005].

Подтверждением этой гипотезы может служить распределение морфологических аномалий в зависимости от пола, представленный на рис. 13.

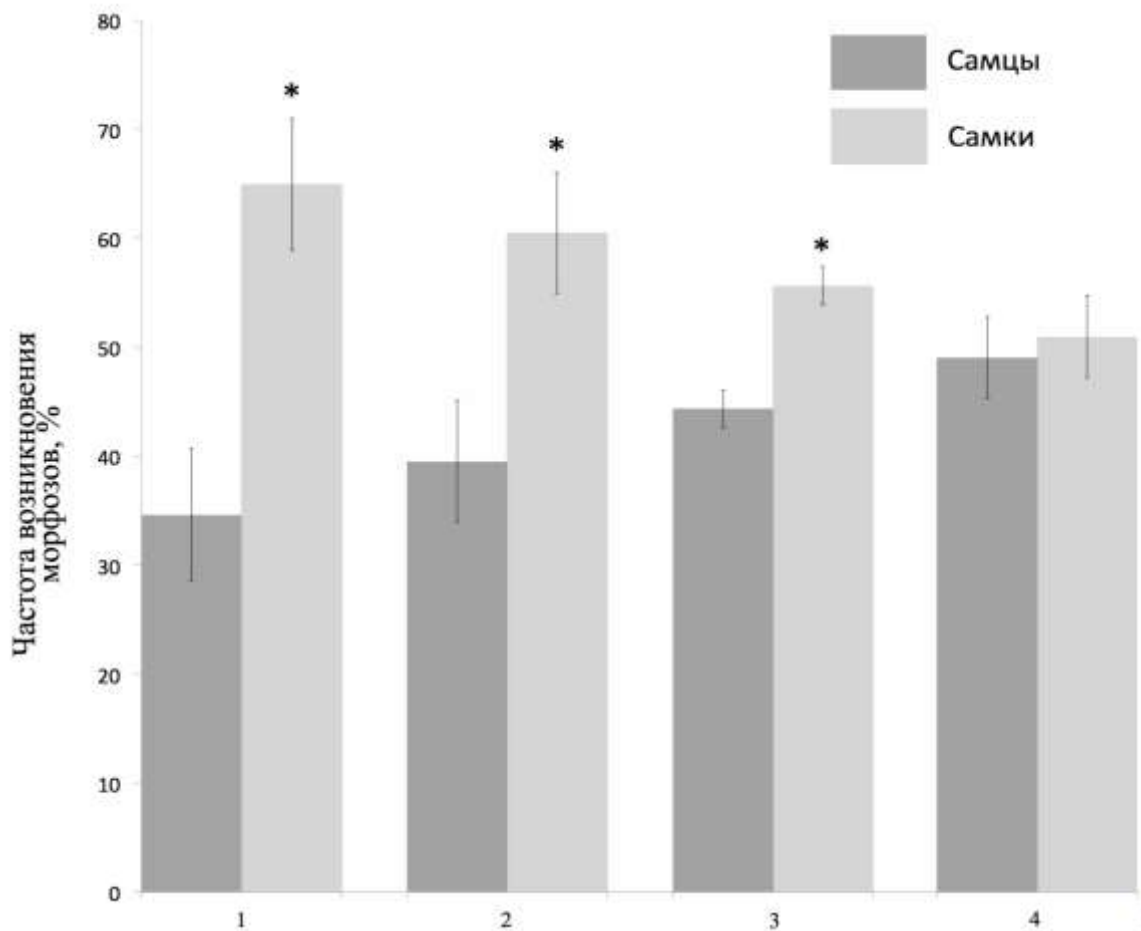


Рис. 13 Распределение аномалий в зависимости от пола (%)
1-elav;APP, 2-elav;APPSW, 3-elav;BACE/APP, 4-elav;BACE/APPSW

Ген белка Notch в *Drosophila* расположен на X хромосоме. Таким образом, у самок содержится две копии гена, в то время как у самцов – только одна. Несмотря на наличие у самцов *Drosophila* механизма компенсации дозы гена, в результате которого гены, кодируемые на X хромосоме, экспрессируются интенсивнее, у самок и самцов возможны различия в уровне белка Notch. Повышенный уровень Notch у самок может объяснить зависимое от пола распределение морфозов при гиперэкспрессии *APP*.

Таким образом, приведенные выше данные показывают, что нарушение функционирования и процессинга белка APP, наряду с типичными для БА нейродегенеративными процессами, может приводить к активации воспалительного ответа через TLR-рецепторы. Кроме того мы предполагаем, что подобные нарушения могут вести к дестабилизации хроматина и нарушению процесса репарации, а также нарушению в процессах дифференциации и пролиферации.

3.2 Транскрипционные изменения генов синаптических белков в мозге взрослых мух при гиперэкспрессии APP и образовании A β

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 et al. 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 синаптотагмина 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].

Подобные же результаты были получены также и на трансгенных мышах, с гиперэкспрессией *APP* человека, воспроизводящих основные признаки БА [Charman et al., 1999; Mucke et al., 2000]. Например, исследования синаптической плотности в мозге мышей с гиперэкспрессией *APP-Swedish* показали существенное уменьшение уровня *syt* в коре и гиппокампе трансгенных мышей [Wang et al., 2012]. Попытки объяснить этот эффект не дали однозначного результата. Анализ транскриптов на чипах Affymetrix HuFL, проведенный на аутоптатах мозга больных спорадической формой БА (средний возраст 82.7), показал снижение уровня транскриптов мРНК для основных классов синаптических белков [Yao et al., 2003]. В то же время эксперименты на трансгенных мышах (возраст 22 месяца) показали спектр изменений содержания синаптических белков, отличный от наблюдаемого у больных [Yao et al., 2003]. Также 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 *syt1* обнаруживается в большом количестве в синапсах. Также было выделено 2 изоформы белка *syb*. Первый, получивший название *synaptobrevin*, образуется в организме повсеместно. Мутации в гене этого белка приводят к летальности уже на стадии эмбрионального развития. Исходя из функций синаптобревинов у млекопитающих, можно предположить, что *syb* способствует перемещению белков к поверхности клеток, при нарушениях которого клетки не в состоянии расти и делиться. Второй изоформой синаптобревина является так называемый

нейрональный синаптобревин (*n-syb*) и он обнаруживается в больших количествах исключительно в синапсах.

Ранее Sarantseva et al. показали существенное падение уровня белков *syt1* 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*.

3.2.1 Изменение уровня мРНК генов *syt1* и *n-syb* в мозге взрослых трансгенных особей *Drosophila*

Мы оценили изменение транскрипции генов синаптических белков *syt1* и *n-syb* как при образовании Аβ, так и при экспрессии полноразмерного *APP* и различных его форм. Это позволило нам разделить патологический эффект, оказываемый Аβ от эффекта, оказываемого непосредственно *APP* или его формами. Необходимо отметить, что в линиях с экспрессией генов, кодирующих укороченные формы *APP*, не происходит образования Аβ (из-за отсутствия бета-секретазы), но образуются С-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 *Drosophila melanogaster*. Уровень мРНК генов *syt1*, *n-syb* анализировали у 2-дневных и 30-дневных мух следующих генотипов: *elav* (в качестве контроля), *elav;APP*, *elav;APP-Swedish*, *elav;APPΔCT*, *elav;APPΔNT*, *elav;APP/BACE* и *elav;BACE;APP-Swedish*. Полученные данные были нормированы относительно контрольной линии с экспрессией гена *elav*.

Значения уровня мРНК гена *syt1*, нормированного на соответствующие показатели для референсных генов *RP-49* и *GAPDH2*, на 2й и на 30й день представлены на рис. 14.

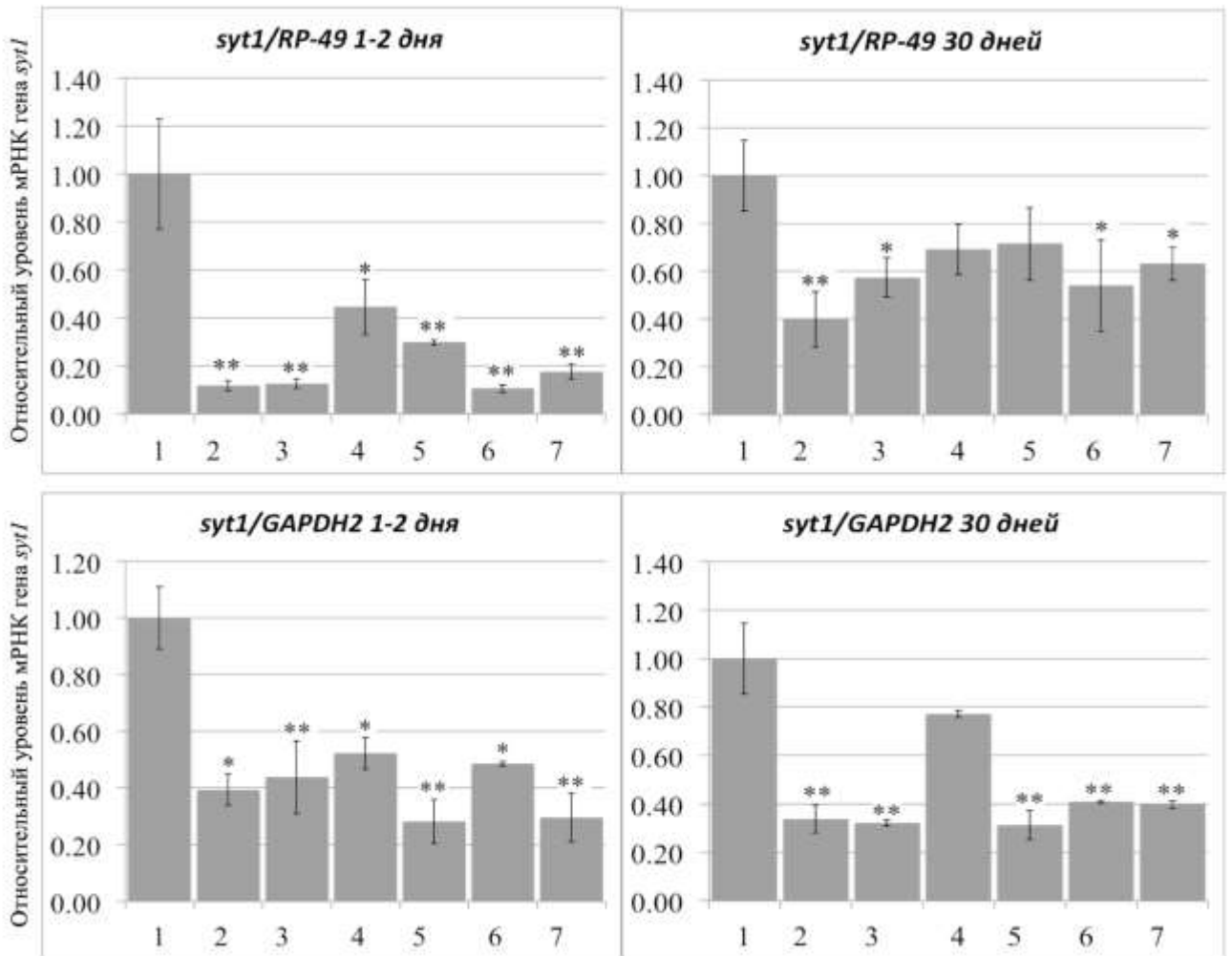


Рис. 14. Относительный уровень мРНК гена *syt1*. 1-*elav*; 2-*elav*; *APP*, 3-*elav*; *APP-Swedish*, 4-*elav*; *APPΔCT*, 5-*elav*; *APPΔNT*, 6-*elav*; *APP/BACE* и 7-*elav*; *BACE*; *APP-Swedish*; *-статистически достоверное отличие $P \leq 0.05$; ** - статистически достоверное отличие $P \leq 0.001$.

Полученные данные по измерению уровня мРНК гена *syt1* демонстрируют его существенное статистически значимое падение уже на 2-й день жизни мух во всех использованных при исследовании трансгенных линиях как с экспрессией отдельно *APP* и его форм, так и образующих Аβ. Подобная же картина сохранялась и для мух на 30-й день их жизни, за исключением линии с экспрессией укороченной формы *APPΔCT* и *APPΔNT*, для которых, несмотря на

уменьшение значений уровня экспрессии, не наблюдалось статистически значимых изменений.

Мы также наблюдали падение уровня мРНК гена *n-syb* (рис. 15).

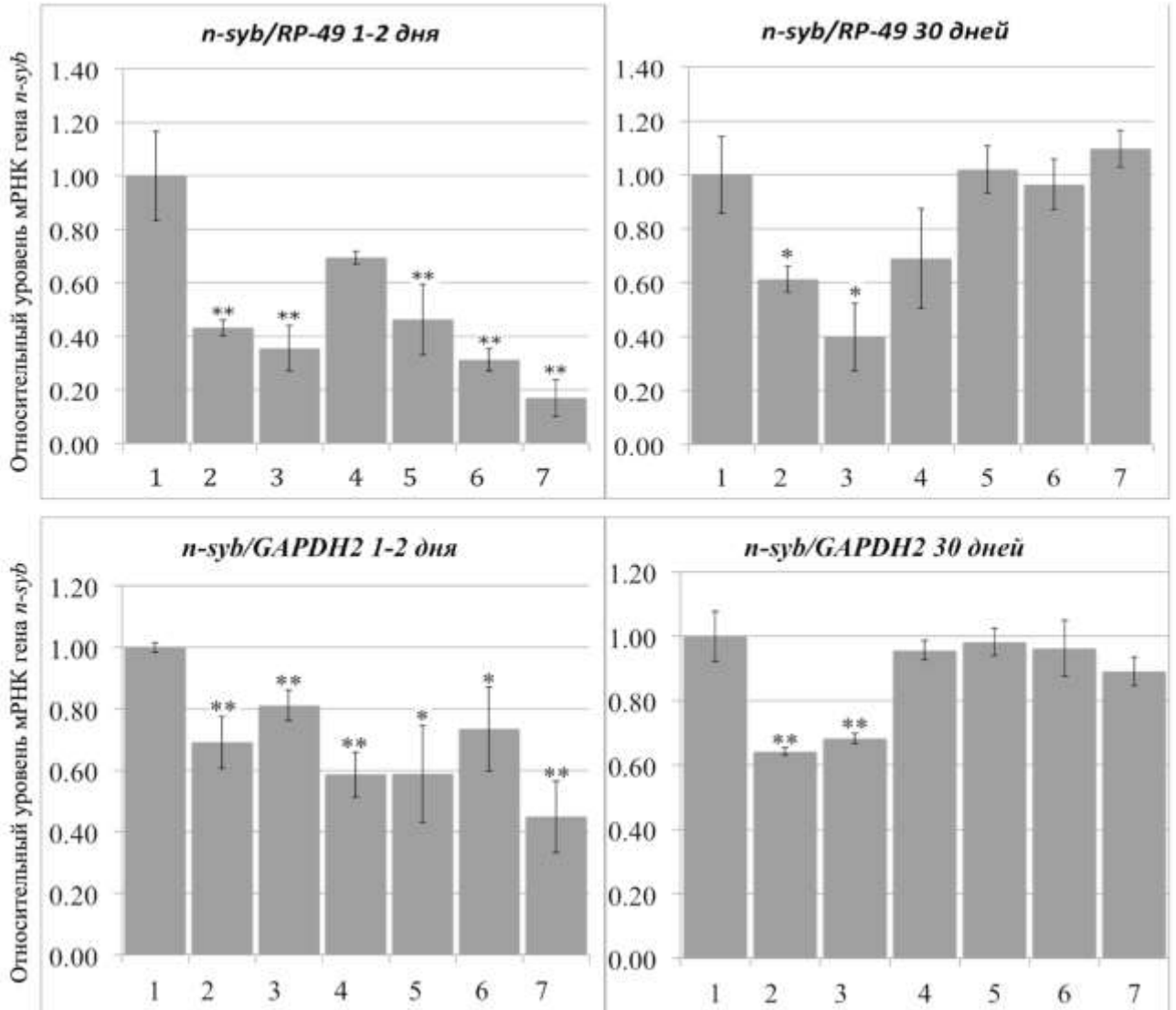


Рис. 15. Относительный уровень мРНК гена *n-syb*. 1-*elav*; 2-*elav*; *APP*, 3-*elav*; *APP-Swedish*, 4-*elav*; *APPΔCT*, 5-*elav*; *APPΔNT*, 6-*elav*; *APP/BACE* и 7-*elav*; *BACE*; *APP-Swedish*; *-статистически достоверное отличие $P \leq 0.05$; ** - статистически достоверное отличие $P \leq 0.001$.

На 2-й день статистически значимое уменьшение уровня экспрессии мы наблюдали для всех линий, однако на 30-й день жизни мух статистически значимое уменьшение было зафиксировано только для линий с экспрессией *APP* и его мутантной формы *APP-Swedish*. В линиях же, образующих A β либо укороченные формы *APP*, падение уровня мРНК гена *n-syb* не наблюдалось.

Для оценки влияния гиперэкспрессии исследуемых генов белков человека на профиль генной экспрессии мы исследовали изменения уровня мРНК гена *psn* *Drosophila* (рис. 16). Мы показали отсутствие статистически значимых изменений уровня м-РНК гена *psn* у 2-х-дневных мух и увеличение уровня экспрессии у 30-дневных, что демонстрирует отсутствие негативного эффекта от APP и A β на профиль экспрессии генов.

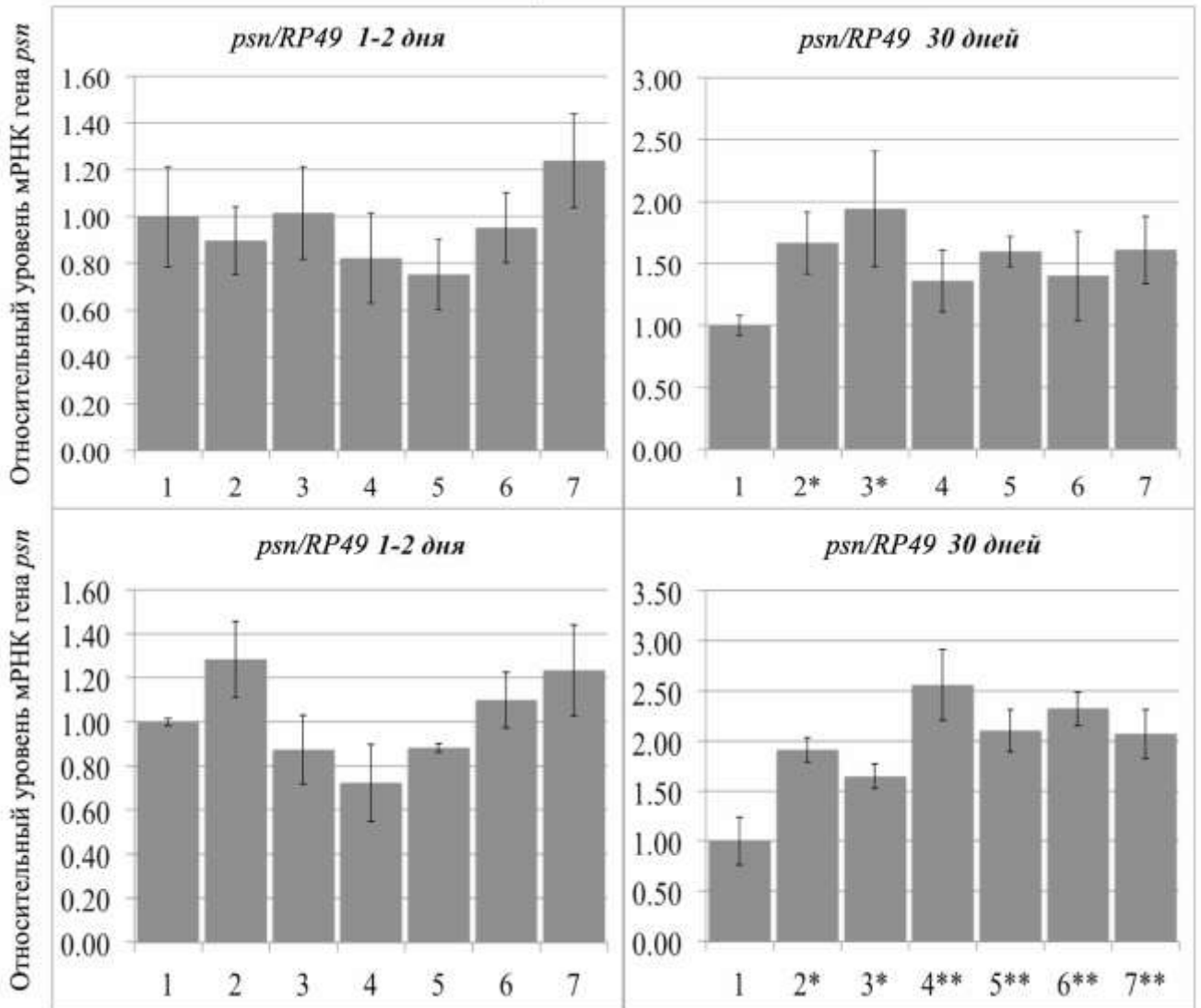


Рис. 16. Относительный уровень мРНК гена *psn*. 1-*elav*; 2-*elav*;APP, 3-*elav*;APP-Swedish, 4-*elav*;APPΔCT, 5-*elav*;APPΔNT, 6-*elav*;APP/BACE и 7-*elav*;BACE;APP-Swedish; *-статистически достоверное отличие $P \leq 0.05$; ** - статистически достоверное отличие $P \leq 0.001$.

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. Были

исследованы трансгенные *Drosophila* с экспрессией дикого типа *PSEN-1* и двух его мутантных вариантов, приводящих к развитию семейной формы БА (рис. 17, рис. 18).

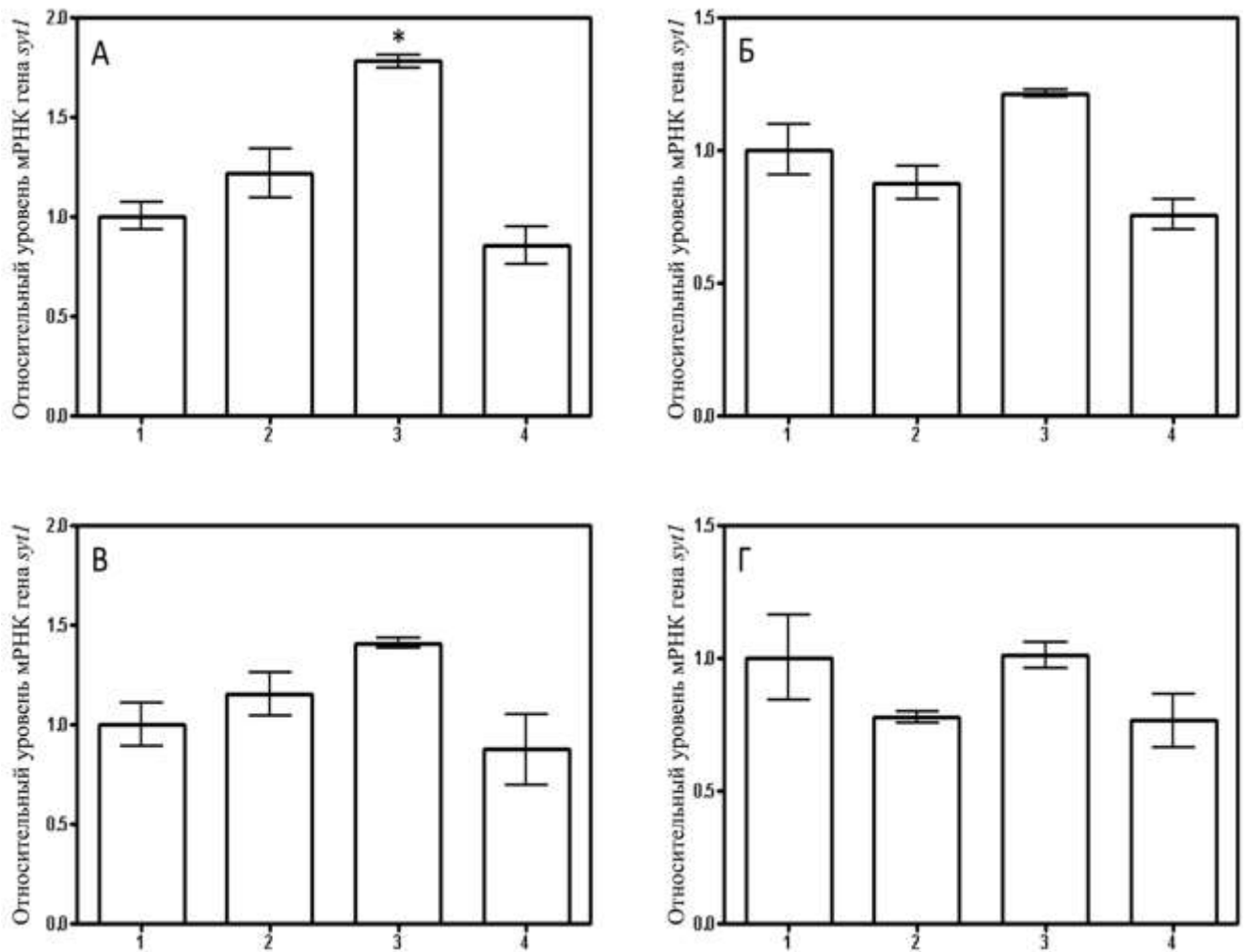


Рис. 17. Относительный уровень мРНК гена *syt1*. А – *syt1/RP49* 1-2д., Б – *syt1/RP49* 30д., В – *syt1/GAPDH2* 1-2д., Г – *syt1/GAPDH2* 30д.; 1-*elav*; 2-*elav*; *PSEN1*, 3-*elav*; *PSEN1-M146V*, 4-*elav*; *PSEN-P267S*; *-статистически достоверное отличие $P \leq 0,05$; ** - статистически достоверное отличие $P \leq 0,001$.

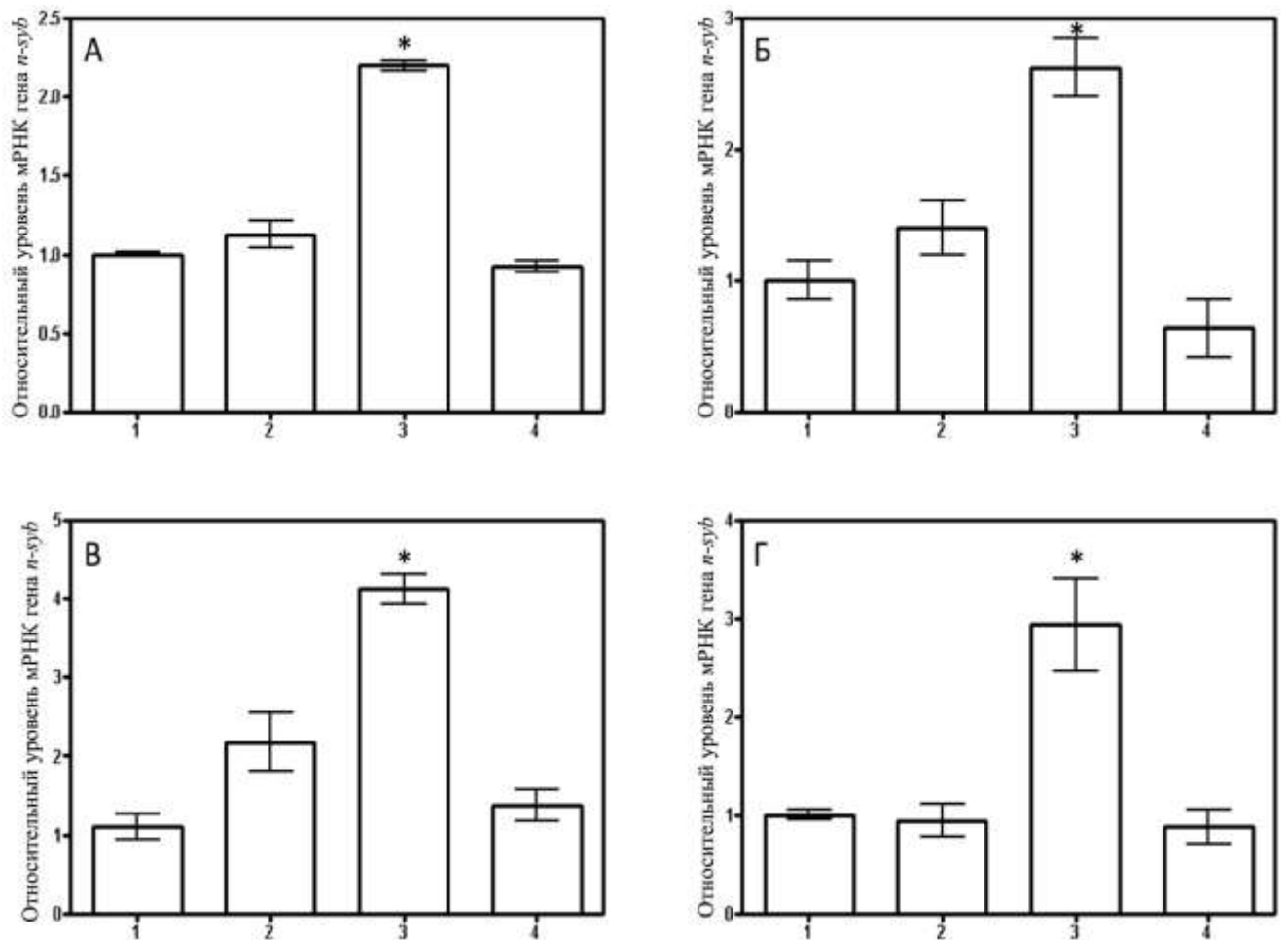


Рис. 18. Относительный уровень мРНК гена *n-syb*. А – *syt1/RP49* 1-2д., Б – *syt1/RP49* 30д., В – *syt1/GAPDH2* 1-2д., Г – *syt1/GAPDH2* 30д.; 1-*elav*; 2-*elav*; *PSEN1*, 3-*elav*; *PSEN1-M146V*, 4-*elav*; *PSEN-P267S*; *-статистически достоверное отличие $P \leq 0,05$; ** - статистически достоверное отличие $P \leq 0,001$.

Как видно из приведенных выше данных экспрессия *PSEN-1* и его форм не вызывала драматического изменения уровня мРНК исследуемых синаптических генов, обнаруживаемого при экспрессии *APP* и/или образовании А β . Более того, экспрессия *PSEN-1* с мутацией M146V приводила к увеличению мРНК пресинаптических белков. Тот факт, что экспрессия *PSEN-1* в мозге мух не сопровождалась изменениями экспрессионного паттерна синаптических белков, подтверждает «индивидуальность» эффекта гиперэкспрессии *APP* в мозге *Drosophila* и показывает многообразие процессов, ведущих к нейродегенеративным изменениям.

Таким образом, мы показали, 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 Аβ (совместная экспрессия *APP* и *BACE*), Подобная картина сохранялась и на 30-й день для *sytl*, 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 Аβ. Мы полагаем, что наблюдаемое снижение уровня мРНК *sytl* и *n-syb* обусловлено экспрессией именно гена *APP* независимо от секреции Аβ. Хотя наши эксперименты были проведены на трансгенных организмах, в литературе представлены данные о том, что дубликации гена *APP* может приводить к развитию БА [Rovelet-Lecrux et al., 2006].

Можно предположить, что важную роль в изменении уровня экспрессии пресинаптических генов может играть С-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 адпторными 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.

3.3 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, полученной на разных этапах развития *Drosophila*, в том числе и на стадии имаго, где он обнаруживается в концентрации 1 метилированный цитозин на 1000-2000 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 β 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 таблице 3.

Таблица 3

Статус метилирования гена *sytl*, %

Генотип \ Дни	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 табл. 3 видно, что статус метилирования промоторной области гена *sytl* 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 день жизни мух.

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

Необходимо отметить, что у *Drosophila* могут быть метилированы не только цитозины в CG-паре, но и цитозины в парах CA и CT [Ramsahoye et al., 2000]. С учетом того, что использованный в эксперименте набор Zymo Research позволял определить статус метилирования цитозина только в парах CG, это может объяснить наличие роста уровня метилирования промоторной области исследуемых генов при отсутствии статистической достоверности.

3.4 Изучение влияния содержания взрослых особей *Drosophila melanogaster* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид A β ₄₂, 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 A β [Ferreira, Klein, 2011]. Несмотря на описание других механизмов, возможно перекрывающихся с образованием A β , включающих воспаление [Galimberti et al., 2008], окислительный стресс [Reddy et al., 2009], нарушение метаболизма холестерина [Stefani, Liguri, 2009] и нарушение нормальных клеточных функций белков, замещения в которых приводят к развитию БА [Saura et al., 2004; Sarantseva et al., 2009], основные стратегии разработки терапии для БА в последние годы были сконцентрированы на поиске соединений, снижающих уровень A β [Giacobini, Becker, 2007]. Следовательно, терапия при БА должна восстанавливать гомеостаз A β в мозге, который может быть нарушен в результате изменений в образовании и клиренсе A β [Hardy, Higgins, 1992; Hardy, 2002; Hardy, 2006].

За годы исследований более чем 100 потенциальных антиамилоидогенных соединений были изучены в клинических исследованиях [Becker et al., 2008; Becker, Greig, 2010, 2012]. Однако ни одно из исследуемых соединений не было введено в практику по различным причинам, начиная от слабой эффективности и заканчивая сильными побочными эффектами. Тем не менее на сегодняшний день ясно, что антиамилоидогенная терапия войдет в комплексную лекарственную терапию при БА.

В данной работе мы оценили влияние содержания взрослых особей *Drosophila melanogaster* с экспрессией последовательности, кодирующей пептид A β ₄₂, 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* приводили к накоплению в цитоплазме клеток дрожжей *Saccharomyces 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 красного пигмента на амилоидизацию в *Drosophila melanogaster*.

Трансгенные *Drosophila melanogaster* с экспрессией последовательности человеческого $A\beta_{42}$ в нервных клетках – широко используемый инструмент для изучения патогенеза $A\beta$ *in vivo*. Было показано, что экспрессия $A\beta$ 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» изогенными штаммами дрожжей и сравнить их по проявлению перечисленных выше черт патогенеза.

3.4.1 Изучение влияния потребления красного штамма дрожжей трансгенными особями *Drosophila melanogaster* на амилоидогенез в мозге взрослых мух

Было оценено влияние потребления красного штамма дрожжей на содержание $A\beta$ в мозге имаго трансгенных особей *Drosophila* с экспрессией последовательности, кодирующей $A\beta_{42}$.

С помощью иммуногистохимии и конфокальной микроскопии было зафиксировано отложение $A\beta$ в мозге трансгенных мух. Пример опыта представлен на рис. 19.

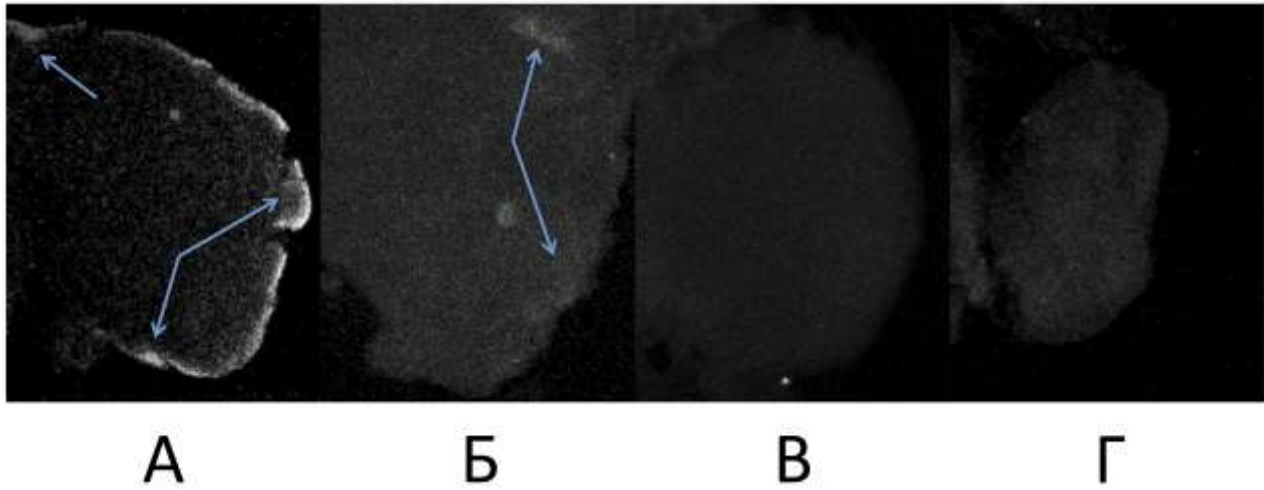


Рис. 19. Детекция отложения $A\beta$ в мозге мух; А - $elav/+; A\beta/+$ («белые» дрожжи), Б - $elav/+; A\beta/+$ («красные» дрожжи), В - контроль $elav/+;+$ («белые» дрожжи), Г – контроль $elav/+;+$ («красные» дрожжи).

Как видно из приведенного выше рисунка, $A\beta$ детектировался только в мухах с образованием $A\beta_{42}$, в контрольной линии сигнал отсутствовал.

Для количественной оценки содержания $A\beta$ было проведено измерение его уровня в мозге мух, потреблявших в пищу как «красные» дрожжи, так и «белые», не продуцирующие красный пигмент, дрожжи, используя метод вестерн-блоттинга. Относительное содержание $A\beta$ было нормировано на α -tubulin.

Пример вестерн блота приведен на рис. 20 и рис. 21.

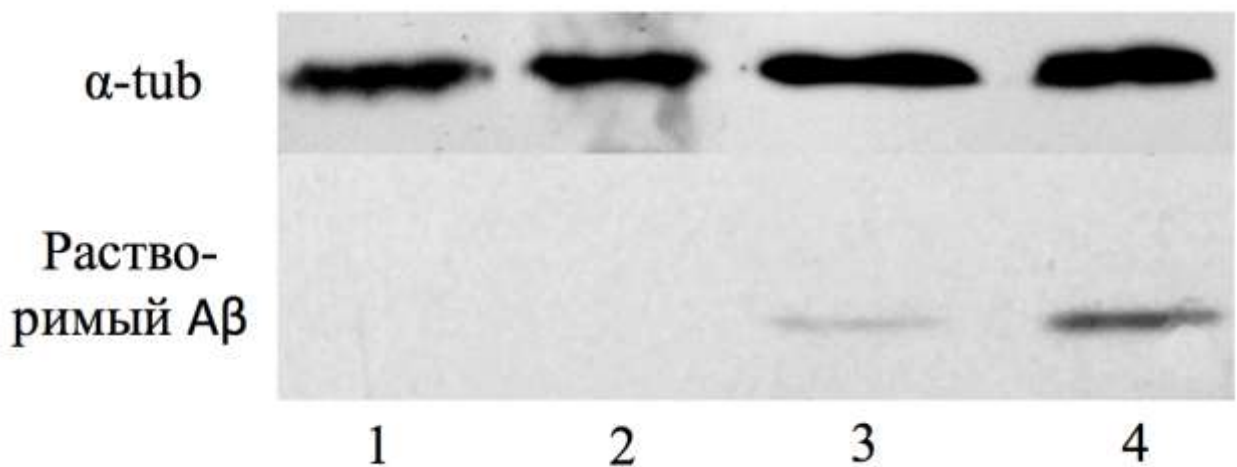


Рис. 20. Результаты вестерн блота на растворимую фракцию $A\beta$. 1 – контроль $elav/+;+$ («красные» дрожжи), 2 - контроль $elav/+;+$ («белые» дрожжи), 3 – $elav/+; A\beta/+$ («красные» дрожжи), 4 – $elav/+; A\beta/+$ («белые» дрожжи)

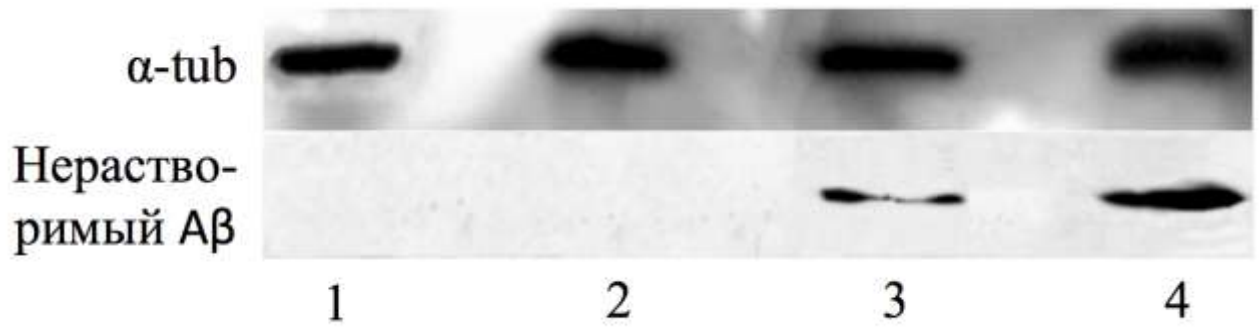


Рис. 21. Результаты вестерн блота на нерастворимую фракцию Аβ. 1 – контроль *elav*/+;+ («красные» дрожжи), 2 - контроль *elav*/+;+ («белые» дрожжи), 3 –*elav*/+; Аβ/+ («красные» дрожжи), 4 –*elav*/+; Аβ/+ («белые» дрожжи)

В мухах, потреблявших в пищу «красные» дрожжи, относительное содержание растворимой фракции Аβ₄₂ составило $0,095 \pm 0,04$, «белые» дрожжи – $0,31 \pm 0,04$. Подобные результаты были получены и для нерастворимой фракции. В этом случае содержание нерастворимой фракции Аβ₄₂ в мозге мух, потреблявших «красные» дрожжи составило $0,16 \pm 0,06$, «белые» – $0,58 \pm 0,13$.

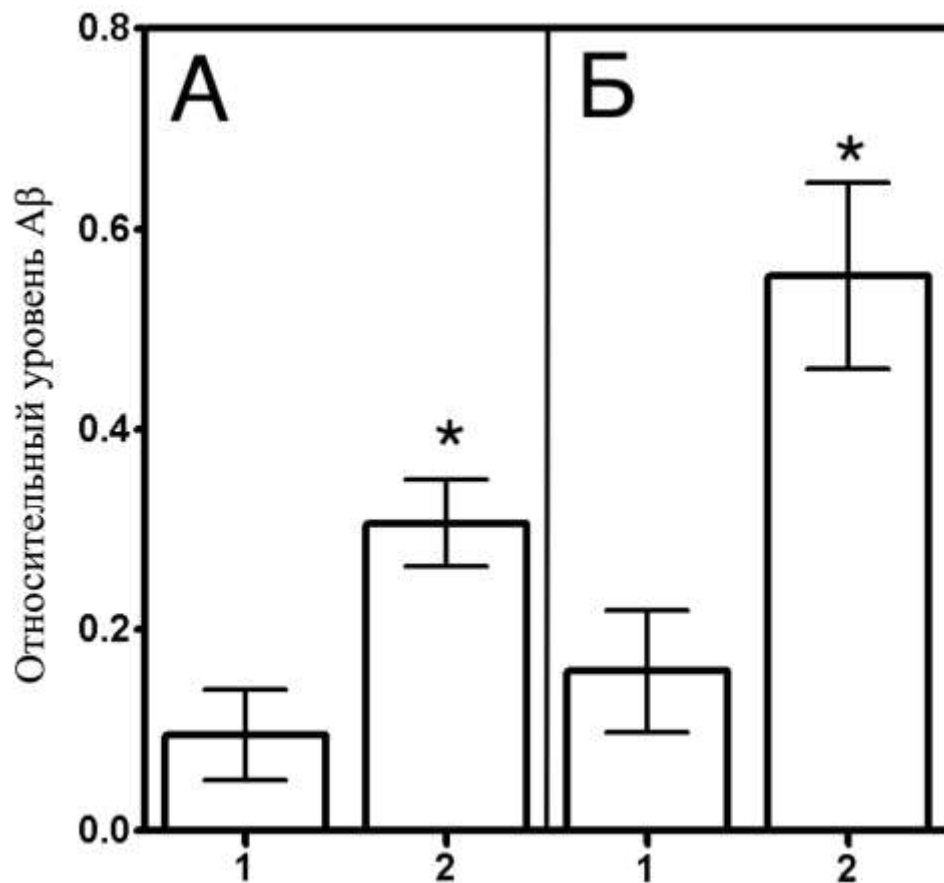


Рис. 22. Результаты вестерн блота. А – растворимая фракция Аβ, Б – нерастворимая фракция Аβ, 1 – *elav*/+; Аβ/+ («красные» дрожжи), 2 – *elav*/+; Аβ/+ («белые» дрожжи)

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 особей *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. 23). Относительное содержание GFP было нормировано на α -tub.

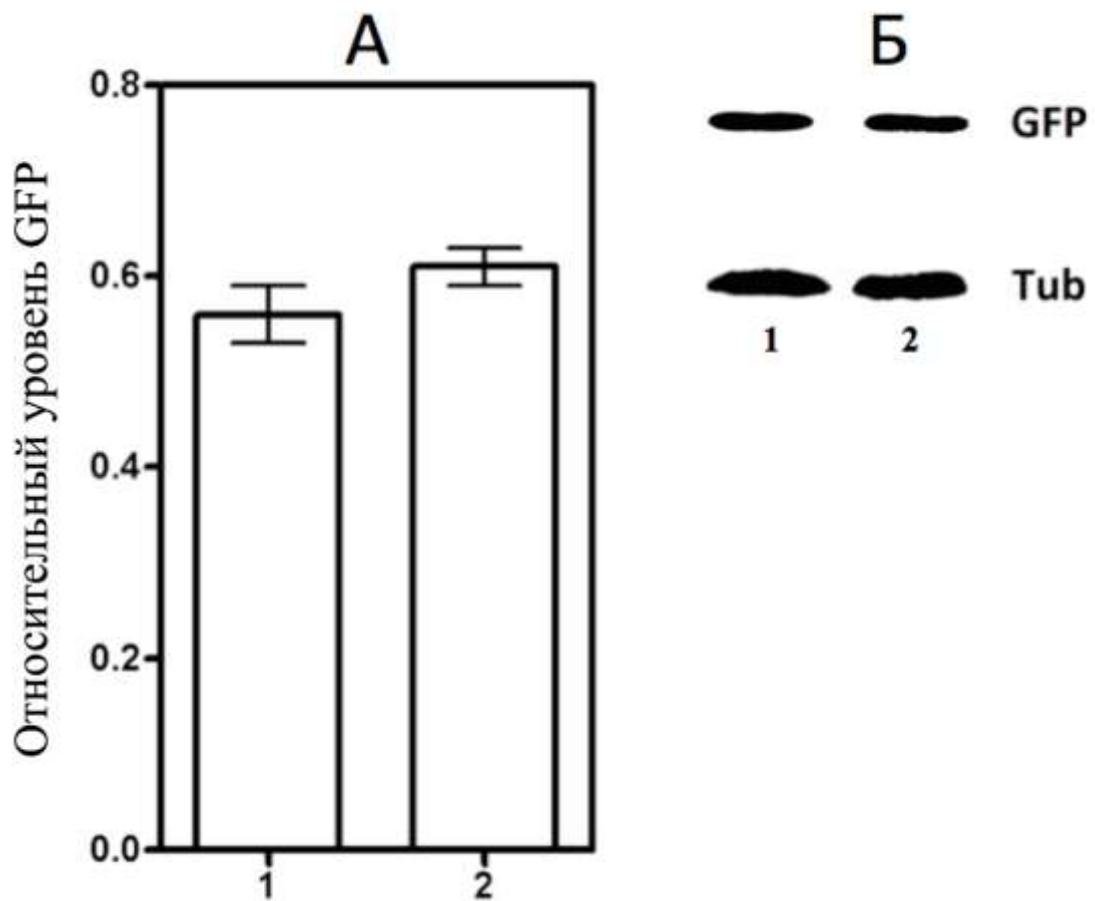


Рис. 23. Уровень GFP не менялся вне зависимости от штамма дрожжей. А – относительное содержание GFP в мозге *Drosophila*, Б – пример вестерн блота. 1 – *elav/+; GFP/+* («красные» дрожжи), 2 – *elav/+; GFP/+* («белые» дрожжи)

Таким образом, мы показали достоверное снижение уровня $A\beta_{42}$ в мозге мух, потреблявших в пищу дрожжи-производители красного пигмента. Согласно работам Yerbury et al. 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 А β , усиливает агрегационный потенциал пептида. Любопытно, что подобный негативный эффект кластерина наблюдается только при аномально высоком образовании А β . Нарушение связи кластерина с А β замедляет дальнейшее отложение амилоида. Возможно, наблюдаемый нами позитивный эффект содержания трансгенных мух на «красных дрожжах» объясняется именно нарушением связи кластерина с А β за счет конкурентного связывания красного пигмента с А β , что было описано ранее в работе Nevzglyadova et al.

3.4.2 Изучение влияния потребления красного штамма дрожжей трансгенными особями *Drosophila melanogaster* на нейродегенерацию в мозге взрослых мух

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

Нейродегенерация, вызываемая А β ₄₂, проявляется в виде хаотично расположенных вакуолей округлой формы в нейропиле и в районе клеток Кеньона. Оценка уровня нейродегенерации проводилась на 30 день жизни трансгенных особей (рис. 24).

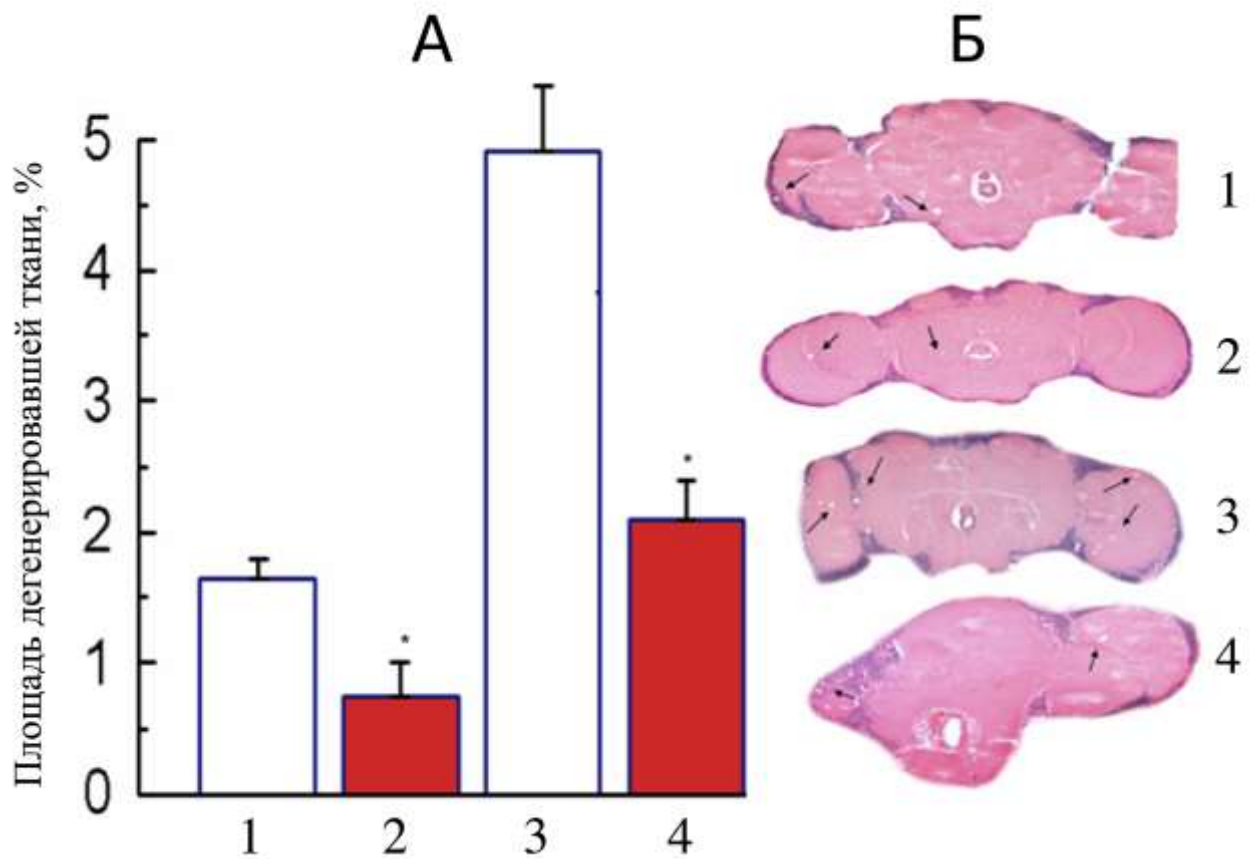


Рис. 24. Эффект содержания трансгенных особей *Drosophila* на среде с красным штаммом дрожжей на нейродегенерацию. А – уровень нейродегенерации, Б – срезы мозга. Стрелками указаны места вакуолизации. 1 – контроль $elav/+;$ («белые» дрожжи), 2 - контроль $elav/+;$ («красные» дрожжи), 3 $-elav/+;$ $A\beta/+$ («белые» дрожжи), 4 $-elav/+;$ $A\beta/+$ («красные» дрожжи)

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.

3.4.3 Анализ влияния потребления красного штамма дрожжей трансгенными особями *Drosophila melanogaster* на выживаемость взрослых 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. 25).

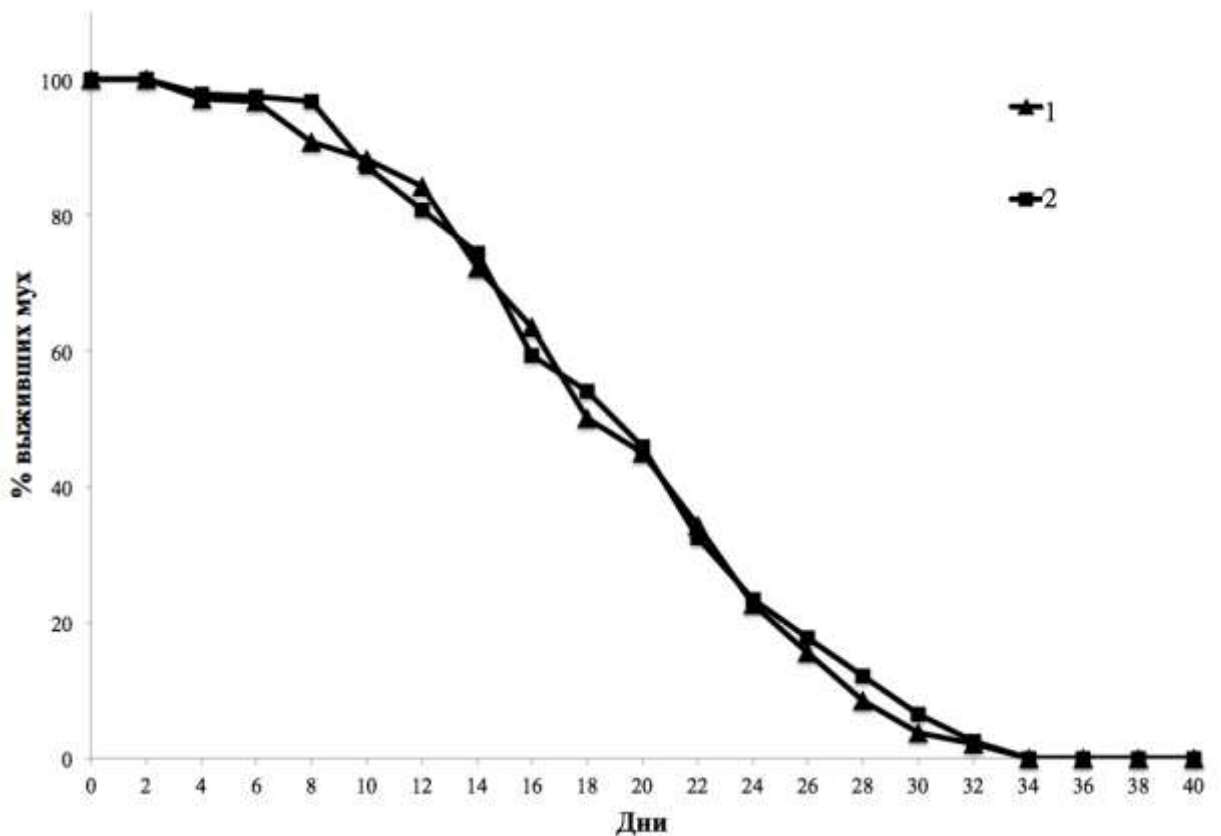


Рис. 25. Эффект потребления красных дрожжей трансгенными особями *Drosophila* на выживаемости; 1 –*elav/+; A β /+* («белые» дрожжи), 2 –*elav/+; A β /+* («красные» дрожжи)

Как видно из рис. 25 потребление красного штамма дрожжей не оказывало влияния на продолжительность жизни исследуемых трансгенных особей *Drosophila*.

3.4.4 Анализ влияния потребления красного штамма дрожжей на локомоторные функции, способность к обучению и память трансгенных особей *Drosophila melanogaster*

Оценка локомоторной активности была проведена для взрослых мух, в клетках мозга которых образовывался $A\beta_{42}$. Линию 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 таблице 4.

Таблица 4

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>	78,8±2,8	56,5±4,2	81,4±2,7	60,2±5,3
<i>elav/+; Aβ₄₂/+</i>	41,2±3,1	1,3±0,1	82,5±2,2*	5,5±1,4*

* - статистически достоверное отличие $P \leq 0.05$;

Как видно из таблицы 4, трансгенные животные с экспрессией последовательности, кодирующей $A\beta_{42}$, демонстрировали значительное падение локомоторной активности уже на 10 день жизни по сравнению с контролем. В то же время наблюдаемое падение было частично компенсировано у мух, потреблявших «красные» дрожжи в пищу. Особенно ярко улучшение локомоторной активности проявлялось на 10 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 и 20 день жизни. Полученные результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

Память и способность к обучению трансгенных мух с экспрессией $A\beta_{42}$, содержащихся на «красных» или «белых» дрожжах. * - статистически достоверное отличие $P \leq 0.05$;

Генотип		Возраст мух			
		10 дней		20 дней	
		Индекс обучаемости (%)	Индекс памяти (%)	Индекс обучаемости (%)	Индекс памяти (%)
<i>elav/+</i>	«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/+;</i> <i>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*

«Красные» дрожжи не привели к статистически значимым изменениям индекса обучаемости и памяти у мух контрольной линии *elav/+* ни на 10, ни на 20 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 среде с красным штаммом 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 фибрилах, 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 $A\beta$ и деградацию когнитивных функций.

Выводы

1. Экспрессия гена *APP* человека в нервных клетках *Drosophila 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 синаптотагмина-1 и нейронального синаптобревина снижается при экспрессии *APP* и его форм уже на ранних этапах жизни имаго *Drosophila 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 β .
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 *Drosophila melanogaster*, воспроизводящих основные признаки болезни Альцгеймера, а также снижается содержание как растворимой, так и нерастворимой фракций А β_{42} в мозге трансгенных мух. Полученные данные представляют интерес при разработке новых методов антиамилоидогенной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. БМЭ, 1974, т 1, стр.322.
2. Большакова О.И., Жук А.А., Родин Д.И., Кислик Г.А. and Саранцева С. В. Влияние гиперэкспрессии гена APP человека на холинергические и дофаминергические нейроны *Drosophila melanogaster* // Экологическая генетика. 2013. Т. 11. № 1. С. 23-31.
3. Саранцева С.В., Большакова О.И., Кузовкова У.Ф., Родин Д.И., Тимошенко С.И. Моделирование нейродегенеративных заболеваний человека на трансгенных животных // Бреслеровские чтения. 2007. С. 225-233.
4. Михайлова Е. В., Артемов А.В., Снигиревская Е.С., Артамонова Т.О., Ходорковский М. А., Сойдла Т. Р., Невзглядова О.В. Влияние красного пигмента *Saccharomyces cerevisiae* на образование инсулиновых фибрилл in vitro // Цитология. 2011. Т. 53. № 10. С. 808-814.
5. Abramov E., Dolev I., Fogel H., Ciccotosto G.D., Ruff E., Slutsky I. Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses // Nature Neurosci. 2009. Т. 12. С. 1567–1576.
6. Aisen P.S., Saumier D., Briand R., Laurin J., Gervais F., Tremblay P., Garceau D. A phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease // Neurology. 2006. Т. 67. С. 1757–1763.
7. Alcorn G., Law E., Connelly PJ., Starr J. Urinary incontinence in people with Alzheimer's disease // Int. J. Geriatr. Psychiatry. 2014. Т. 29. № 1. С. 107-9.
8. Alexandrescu A.T. Amyloid accomplices and enforcers // Protein Sci. 2005. Т. 14. № 1. С. 1-12.
9. Apostolova L.G., Green A.E., Babakchian S., Hwang K.S., Chou Y.Y., Toga A.W., Thompson P.M. Hippocampal atrophy and ventricular enlargement in normal aging, mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer Disease // Alzheimer Dis. Assoc Disord. 2012. Т. 26. № 1. С. 17-27.
10. Armstrong R.A. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease // Folia Neuropathol. 2009. Т. 47. № 4. С. 289-99.

11. Bali J., Gheinani A.H., Zurbriggen S., Rajendran L. Role of genes linked to sporadic Alzheimer's disease risk in the production of β -amyloid peptide // Proc .Nat. Acad. Sci. U S A. 2012. T. 109. № 38. C. 15307-11.

12. Bard F., Cannon C., Barbour R., Burke R.L., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock T. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease // Nat. Med. 2000. № 6. C. 916–919.

13. Bate C., Kempster S., Last T., Williams A. Interferon-gamma increases neuronal death in response to amyloid-beta1-42 // J. Neuroinflammation. 2006. T. 28. № 3. C. 7.

14. Becker R.E., Greig H.H. Increasing the success rate for Alzheimer's disease drug discovery and development // Expert Opin. Drug DiscoT. 2012. № 4. C. 367–370.

15. Becker R.E., Greig N.H. Why so few drugs for Alzheimer's disease? Are methods failing drugs? // Curr. Alzheimer Res. 2010. № 7. C. 27–35.

16. Becker R.E., Greig H.H. & Giacobini, E. Why do so many drugs for Alzheimer's disease fail in development? Time for new methods and new practices? // J. Alzheimers Dis. 2008. № 15. C. 303–325.

17. Beher D., Clarke E.E., Wrigley J.D., Martin A.C., Nadin A., Churcher I., Shearman M.S. Selected nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target g-secretase at a novel site: evidence for an allosteric mechanism // J Biol Chem, 2004. № 279. C. 43419-43426.

18. Bermejo-Pareja F., Benito-León J., Louis E.D., Trincado R., Carro E., Villarejo A., de la Cámara A.G. Risk of incident dementia in drug-untreated arterial hypertension: a population-based study // J. Alzheimers Dis. 2010. T. 22. № 3. C. 949-58.

19. Bilén J., Bonini N.M. *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease // Annu. ReT. Genet. 2005. № 39. P153-171.

20. Blennow K., Zetterberg H., Rinne J.O., Salloway S., Wei J., Black R., Grundman M., Liu E. Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarkers levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease // Arch. Neurol. 2012. № 69. C. 1002–1010.

21. Boche D., Denham N., Holmes C. & Nicoll J. A. Neuropathology after active A β_{42} immunotherapy: implications for Alzheimer's disease pathogenesis // Acta Neuropathol. 2010. № 120. C. 369–384.

22. Bossers K., Heetveld S., Swaab D.F., Verhaagen J. A meta-analysis of microarray-based gene expression studies in Alzheimer's disease // Spot the difference: microarray analysis of gene expression changes in Alzheimer's and Parkinson's Disease. 2009. C. 135-153.

23. Braak H., Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories // Neurobiol Aging. 1997. T. 18. № 4. C. 351-7.

24. Breen K.C., Bruce M. and Anderton B.H. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion // Journal of Neuroscience Research. 1991. T. 28. C. 90-100.

25. Brion J.C. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease // Eur Neurol. 1998. T. 40. № 3. C. 130-40.

26. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. 2007. T. 6. № 3. C. 186-91.

27. Pfizer announces topline results of first of four studies in bapineuzumab phase 3 program [Электронный ресурс] // businesswire.com, 2012. URL: <http://www.businesswire.com/news/home/20120723006412/en/> (дата обращения: 20.08.2014).

28. Cao X., Südhof T.C. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60 // Science. 2001. T. 293. C. 115–20.

29. Carmine-Simmen K., Proctor T., Tschäpe J., Poeck B., Triphan T., Strauss R., Kretschmar D. Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function // Neurobiol Dis. 2009. T. 33. № 2. P274-81.

30. Chapman P.F., White G.L., Jones M.W., Cooper-Blacketer D., Marshall V.J., Irizarry M., Younkin L., Good M.A., Bliss T.V., Hyman B.T., Younkin S.G., Hsiao K.K. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice // *Nat Neurosci.* 1999. T. 2. C. 271–276.

31. Choi Y.H., Yon G.H., Hong K.S., Yoo D.S., Choi C.W., Park W.K., Kong J.Y., Kim Y.S., Ryu S.Y. In vitro BACE-1 inhibitory phenolic components from the seeds of *Psoralea corylifolia* // *Planta Med.* 2008. T. 74. C. 1405–1408.

32. Citron M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease // *Nature ReV. Neurosci.* 2004. T. 5. C. 677–685.

33. Claassen, A.M., Guevremont, D., Mason-Parker, S.E., Bourne, K., Tate, W.P., Abraham W.C. and Williams, J.M. Secreted amyloid precursor protein- α upregulates synaptic protein synthesis by a protein kinase G-independent mechanism // *Neurosci. Lett.* 2009. T. 460. C. 92–96.

34. Crehan H. Holton P., Wray S., Pocock J., Guerreiro R., Hardy J. Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease // *Immunobiology.* 2012. T. 217. № 2. C. 244-50

35. Scheuner D., Eckman C., Jensen M., Song X., Citron M., Suzuki N., Bird T.D., Hardy J., Hutton M., Kukull W., Larson E., Levy-Lahad E., Viitanen M., Peskind E., Poorkaj P., Schellenberg G., Tanzi R., Wasco W., Lannfelt L., Selkoe D., Younkin S. Secreted amyloid-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease // *Nature Medicine.* 1996. № 2. C. 864-870.

36. Davidsson P., Blennow K. Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease // *Int Psychogeriatr.* 1998. T. 10. C. 11–23.

37. Dodel R., Rominger A., Bartenstein P., Barkhof F., Blennow K., Förster S., Winter Y., Bach J.P., Popp J., Alferink J., Wiltfang J., Buerger K., Otto M., Antuono P., Jacoby M., Richter R., Stevens J., Melamed I., Goldstein J., Haag S., Wietek S., Farlow M., Jessen F. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild to moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial // *Lancet Neurol.* 2013. № 12. C. 233–243.

38. Doody R. S. Therapeutic standards in Alzheimer disease // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1999. T. 13. C. 20–26.

39. Dreses-Werringloer U., Lambert J.C., Vingtdeux T., Zhao H., Vais H., Siebert A., Jain A., Koppel J., Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Pasquier F., Galimberti D., Scarpini E., Mann D., Lendon C., Campion D., Amouyel P., Davies P., Fosskett J.K., Campagne F., Marambaud P.A. Polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk // Cell. 2008. T. 27. № 7. C. 1149-61.

40. Masliah E., Mallory M., Alford M. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease // Neurology. 2001. № 56. C. 127-129.

41. Eli Lilly and Company. Lilly announces detailed results of phase 3 Solanezumab EXPEDITIONS studies following a presentation of the independent analyses by the Alzheimer's Disease Cooperative Study (ADCS) // Eli Lilly and Company [online], <http://newsroom.lilly.com/releasedetail.cfm?releaseid=711933>. 2012.

42. Eli Lilly and Company. Lilly halts development of semagacestat for Alzheimer's disease based on preliminary results of phase III clinical trials // Eli Lilly and Company [online], <http://newsroom.lilly.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=499794>. 2010.

43. Emilien G., Durlach C., Minaker K.L., Winblad B., Gauthier S., Maloteaux J.-M. // Alzheimer Disease: Neuropsychology and Pharmacology. - Basel: Birkhauser Verlag, 2004& - 288 C.

44. Carrasquillo M.M., Belbin O., Hunter T.A., Ma L., Bisceglia G.D., Zou F., Crook J.E., Pankratz V.S., Sando S.B., Aasly J.O., Barcikowska M., Wszolek Z.K., Dickson D.W., Graff-Radford N.R., Petersen R.C., Morgan K., Younkin S.G. Replication of BIN1 association with Alzheimer's disease and evaluation of genetic interactions // J. Alzheimers Dis. 2011. T. 24. № 4. C. 751-8.

45. Ferreira S.T., Klein W.L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011. № 96. C. 529–543.
46. Ferris S.H. Evaluation of memantine for the treatment of Alzheimer's disease // *Expert Opin. Pharmacother.* 2003. T. 4. C. 2305–2313.
47. Finckh U., van Hadeln K., Müller-Thomsen T., Alberici A., Binetti G., Hock C., Nitsch R.M., Stoppe G., Reiss J., Gal A. Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of PLA2, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2 // *Neurogenetics.* 2003. T. 4. № 4. C. 213-7.
48. Finelli A., Kelkar A., Song H.-J., Yang H., Konsolaki M. A model for studying Alzheimer's AB42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Cell. Neurosci.* 2004. T. 26. № 3. C. 365–375
49. Fossgreen A., Bruckner B., Czech C., Masters C.L., Beyreuther K., Paro R. Transgenic *Drosophila* expressing human amyloid precursor protein show gamma-secretase activity and a blistered-wing phenotype // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1998. № 95. C. 13703-13708.
50. Galimberti D., Fenoglio C. and Scarpini E. Inflammation in neurodegenerative disorders: friend or foe? // *Curr Aging Sci.* 2008. № 1. C. 30-41.
51. Gao Y. and Pimplikar S.W. The γ -secretase- cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001. T. 98. C. 14979-14984.
52. Gelinas D.S., DaSilva K., Fenili D., St George-Hyslop P., McLaurin J. Immunotherapy for Alzheimer's disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. T. 101. Suppl 2. C. 4657–62.
53. Giacobini E. and Becker R.E. One hundred years after discovery of Alzheimer's disease. A turning point for therapy? // *J. Alzheimers Dis.* 2007. № 12. C. 37–52.

54. Gilman S., Koller M., Black R.S. Clinical effects of Ab immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial // *Neurology*. 2005. T. 64. C. 1553–1562.
55. Goedert M., Spillantini M. A century of Alzheimer's disease // *Neurobiol Aging*. 1997. T. 18. № 4. C. 351-7.
56. Gowher H., Leismann O., Jeltsch A. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine // *The EMBO J*. 2000. T. 19. № 24. C. 6918-6923.
57. Green R.C., Cupples L.A., Kurz A., Auerbach S., Go R., Sadovnick D., Duara R., Kukull W.A., Chui H., Edeki T., Griffith P.A., Friedland R.P., Bachman D., Farrer L. Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study // *Arch Neurol*. 2003. T. 60. № 5. C. 753-9.
58. Green C., Levashina, E., McKimmie C., Dafforn T., Reichhart J.-M. and Gubb D. The necrotic gene in *Drosophila* corresponds to one of a cluster of three serpin transcripts mapping at 43A1.2 // *Genetics*. 2000. № 156. C. 1117-27.
59. Greeve I., Kretzschmar D., Tschape J.-A., Beyn A., Brellinger C., Schweizer M., Nitsch R.M., Reifegerste R. Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila* // *The Journal of Neuroscience*. 2004. N. 24. C. 3899-3906.
60. Grilli M., Ribola M., Alberici A., Valerio A. and Memo M. Identification and characterization of a kappa B/Rel binding site in the regulatory region of the amyloid precursor protein gene // *The Journal of Biological Chemistry*. 1995. № 270. C. 26774-26777.
61. Haass C., Selkoe D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. T. 8. № 2. C. 101-12.
62. Hardy J., Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. An updated summary of the amyloid hypothesis // *Science*. 2002. T. 297. C. 353–356.
63. Hardy J.A., Higgins G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // *Science*. 1992. № 256. C. 184–185.

64. Hardy J. Alzheimer disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal // *J. Alzheimers Dis.* 2006. № 9. C. 151–153.

65. Hardy J. and Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. An updated summary of the amyloid hypothesis // *Science.* 2002. № 297. C. 353-356.

66. Hardy J. Testing times for the “amyloid cascade hypothesis” // *Neurobiol. Aging.* 2002. № 6. C. 1073–1074.

67. Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. An updated summary of the amyloid hypothesis // *Science.* 2002. № 297. C. 353–356.

68. Hébert S.S., Horré K., Nicolai L., Bergmans B., Papadopoulou A.S., Delacourte A., De Strooper B. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression // *Neurobiol Dis.* 2009. T. 33. № 3. C. 422-8.

69. Hébert S.S., Horré K., Nicolai L., Papadopoulou A.S., Mandemakers W., Silaharoglu A.N., Kauppinen S., Delacourte A., De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. T. 105. № 17. C. 6415-20.

70. Henley D.B., May C.C., Dean R.A. and Siemers E.R. Development of semagacestat (LY450139), a functional gamma-secretase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease // *ExC. Opin. Pharmacother.* 2009. № 10. C. 1657–1674.

71. Hernández F., Gómez de Barreda E., Fuster-Matanzo A., Lucas J.J., Avila J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein // *ExC. Neurol.* 2010. T. 223. № 2. C. 322-5.

72. Hippus H. The discovery of Alzheimer's disease // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2003. T. 5. № 1. C. 101–108.

73. Huang W., Yu H., Sheng R., Li J., Hu, Y. Identification of pharmacophore model, synthesis and biological evaluation of N-phenyl-1-arylamide and N-phenylbenzenesulfonamide derivatives as BACE 1 inhibitors // *Bioorg Med Chem.* 2008. T. 16. C. 10190–10197.

74. Itoh T., Satou T., Nishida S., Tsubaki M., Hashimoto S., Ito H. Expression of amyloid precursor protein after rat traumatic brain injury // *Neurol Res.* 2009. T. 31. № 1. C. 103-9.

75. Iwata N., Tsubuki M., Takaki Y., Watanabe K., Sekiguchi, M., Hosoki E., Kawashima-Morishima M., Lee H.J., Hama E., Sekine-Aizawa Y., Saido T.C. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition // *Nature Med.* 2000. T. 6. C. 143–150.

76. Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., Seabrook G., Borchelt D., Iwatsubo T., Sisodia S., Malinow R. APP processing and synaptic function // *Neuron.* 2003. T. 37. № 6. C. 925-37.

77. Kan R., Wang B., Zhang C., Jin F., Yang Z., Ji S., Lu Z., Zheng C., Wang L. Genetic association of BACE1 gene polymorphism C786G with late-onset Alzheimer's disease in Chinese // *J. Mol. Neurosci.* 2005 . T. 25. № 2. C. 127-31.

78. Kanemitsu H., Tomiyama T., Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form // *Neuroscie Let.* 2003. T. 350. C. 113–116.

79. Kim H.S., Kim E.M., Lee J.P., Park C.H., Kim S., Seo J.H., Chang K. A., Yu.E., Jeong S.J., Chong Y.H. and Suh Y.H. C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression // *FASEB J.* 2003. T. 17. C. 1951-1953.

80. Ko S.Y., Lin S.C., Chang K.W., Wong Y.K., Liu C.J., Chi C.W. and Liu T.Y. Increased expression of amyloid precursor protein in oral squamous cell carcinoma // *International Journal of Cancer.* 2004 T. 111. C. 727-732.

81. Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? // *Altern. Med ReT.* 2009. T. 14. № 4. C. 373-9.

82. Kukar T., Prescott S., Eriksen J.L., Holloway T., Murphy M.P., Koo E.H. Golde T.E., Nicolle M.M. Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice // *BMC Neurosci.* 2007. T. 8. C. 54.

83. Kunert N., Marhold J., Stanke J., Stach D., Lyko F.A. Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila* // *Development*. 2003. T. 130. C. 5083-5090.
84. Lai M.T., Chen E., Crouthamel M.C., DiMuzio-Mower J., Xu M., Huang Q., Price E., Register R.B., Shi X.P., Donoviel D.B., Bernstein A., Hazuda D., Gardell S.J., Li Y.M. Presenilin-1 and presenilin-2 exhibit distinct yet overlapping gamma-secretase activities // *J. Biol Chem*. 2003. T. 278. № 25. C. 22475-81.
85. Xiong L., Gaspar C., Rouleau G.A. Genetics of Alzheimer's Disease and Research Frontiers in Dementia // *Geriatrics and Aging*. 2005. T. 8. № 4. C. 31-35.
86. Lannfelt L. Blennow K., Zetterberg H., Batsman S., Ames D., Harrison J., Masters C.L., Targum S., Bush A.I., Murdoch R., Wilson J., Ritchie C.W. Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A β as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial // *Lancet Neurol*. 2008. T. 9. C. 779-786.
87. Laras Y., Garino C., Dessolin J., Weck C., Moret T., Rolland A., Kraus J.L. New N(4)-substituted piperazine naphthamide derivatives as BACE-1 inhibitors // *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2009. T. 24. C. 181-187.
88. Lee C.Y., Landreth G.E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain // *J. Neural Transm*. 2010. T. 117. № 8. C. 949-60.
89. Lee J.Y., Friedman J.E., Angel I., Kozak A., Koh J.Y. The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human beta-amyloid precursor protein transgenic mice // *Neurobiol. Aging*. 2004. T. 25. № 10. C. 1315-21.
90. Lee H.G., Casadesus G., Zhu X., Joseph J.A., Perry G, Smith M.A. Perspectives on the amyloid-beta cascade hypothesis // *Alzheimers Dis*. 2004. T. 6. № 2. C. 137-45.
91. Leung D., Abbenante G., Fairlie D. C. Protease inhibitors: current status and future prospects // *J. Med. Chem*. 2000. T. 43. C. 305-341.
92. Li Y., Liu T., Peng Y., Yuan C. and Guo A.J. Specific functions of *Drosophila* amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and non- neural tissues // *Neurobiology*. 2004. T. 61. C. 343-358.

93. Liu C.C., Kanekiyo T., Xu H., Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy // *Nat. Rev Neurol.* 2013. T. 9. № 2. C. 106-18.
94. Lonze B.E., Ginty D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system // *Neuron.* 2002. T. 3. C. 605–623.
95. Love S., Barber R., Wilcock G.K. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease // *Brain.* 1999. T. 122. C. 247–253.
96. Luo L., Martin-Morri L.E. and White K. Identification, secretion, and neural expression of APPL-*Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor // *The Journal of Neuroscience.* 1990. T. 10. C. 3849-3861.
97. Marcade M., Bourdin J., Loiseau N., Peillon H., Rayer A., Drouin D., Schweighoffer F., Désiré L. Etazolate, a neuroprotective drug linking GABA(A) receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing // *J Neurochem.* 2008. T. 106. C. 392-404.
98. Masliah E., Terry R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system // *Brain Pathol.* 1993. T. 3. C. 77–85.
99. Mastroeni D., Mckee A., Grover A., Rogers J., Coleman P.D. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease // *PLoS One.* 2009. T. 4. C. e6617.
100. Mayeux R., Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. T. 2. C. 8.
101. Merdes G., Soba P., Loewer A., Bilic M.T. // *EMBO J.* 2004. T. 23. C. 4082–4095.
102. Mucke L., Masliah E., Yu G.Q., Mallory M., Rockenstein E.M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K., McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice. Synaptotoxicity without plaque formation // *J Neurosci.* 2000. T. 20. C. 4050–4058.
103. Mufson E.J., Counts S.E., Ginsberg S.D. Gene expression profiles of cholinergic nucleus basalis neurons in Alzheimer's disease // *Neurochem Res.* 2002. T. 27. № 10. C. 1035-48

104. Mullane K., Williams M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis — but what lies beyond? // *Biochem. Pharmacol.* 2013. T. 85. C. 289–305.
105. Müller T., Meyer H.E., Egensperger R., Marcus K. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease // *Prog Neurobiol.* 2008. T. 85. № 4. C. 393-406.
106. Muller T., Concannon C.G., Ward M.W., Walsh C.M., Tirniceriu A.L., Tribl F., Kögel D., Prehn J.H., Egensperger R. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) // *Mol. Biol Cell.* 2007. T. 18. C. 201–210.
107. Müller U.C., Zheng H. Physiological functions of APP family proteins // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. T. 2. C. a006288.
108. Murakami N., Yamaki T., Iwamoto Y., Sakakibara T., Kobori N., Fushiki S., Ueda S. Experimental brain injury induces expression of amyloid precursor protein, which may be related to neuronal loss in the hippocampus // *J Neurotrauma.* 1998. T. 15. № 11. C. 993-1003.
109. Neve R. and McPhie D. Dysfunction of amyloid precursor protein signaling in neurons leads to DNA synthesis and apoptosis // *Biochim Biophys Acta.* 2007. T. 1772. № 4. C. 430-437.
110. Nevzglyadova O.T., Kuznetsova I.M., Mikhailova E.T., Artamonova T.O., Artemov A.T., Mittenberg A.G., Kostyleva E.I., Turoverov K.K., Khodorkovskii M.A., Soidla T.R. The effect of red pigment on the amyloidization of yeast proteins // *Yeast.* 2011. T. 28. № 7. C. 505-26.
111. Niculescu M.D., Zeisel S.H. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline // *J. Nutr.* 2002. T. 132. C. 2333-2335.
112. Nizzari M., Thellung, S., Corsaro A., Villa T., Pagano A., Porcile C., Russo C. and Florio T. Neurodegeneration in Alzheimer disease: Role of amyloid

precursor protein and presenilin 1 intracellular signaling // *Journal of Toxicology*. 2012. T. 2012. 13 p.

113. Nussbaum R., Ellis C. Alzheimer's disease and Parkinson's disease // *N Engl J Med*. 2003. T. 348. № 14. C. 1356-64.

114. Ogawa O., Zhu X., Lee H.G., Raina A., Obrenovich M.E., Bowser R., Ghanbari H.A., Castellani R.J., Perry G., Smith M.A. Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? // *Acta Neuropathol*. 2003. T. 105. C. 524–528.

115. Patterson C., Feightner J.W., Garcia A., Hsiung G.Y., MacKnight C., Sadvnick A.D. Diagnosis and treatment of dementia: risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease // *CMAJ*. 2008. T. 178. № 5. C. 548–56.

116. Peers C., Pearson H.A., Boyle J.C. Hypoxia and Alzheimer's disease // *Curr Alzheimer Res*. 2008. T. 6. C. 525-32.

117. Pierrot N., Tyteca D., D'auria L., Dewachter I., Gailly P., Hendrickx A., Tasiaux B., Haylani L.E., Muls N., N'kuli F., Laquerrière A., Demoulin J.B., Champion D., Brion J.P., Courttoy P.J., Kienlen-Campard P., Octave J.N. Amyloid precursor protein controls cholesterol turnover needed for neuronal activity // *EMBO Mol Med*. 2013. T. 4. C. 608-25.

118. Plant L.D., Webster N.J., Boyle J.P., Ramsden M., Freir D.B., Peers C., Pearson H.A. Amyloid beta peptide as a physiological modulator of neuronal 'A'-type K⁺ current // *Neurobiol Aging In Press*. 2006. T. 11. C. 1673-83.

119. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human disease // *Nat Biotechnol*. 2010. T. 10. C. 1057-68.

120. Prince M., Prina M., Guerchet M. World Alzheimer Report 2013. Journey of Caring, An analysis of long-term care for dementia [Электронный ресурс] // ALZ.CO.UK, 2013& URL: <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2013> (дата обращения: 24.06.14).

121. Ramsahoye B.H., Biniszkiwicz D., Lyko F., Clark V., Bird A.P., Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a // *PNAS*. 2000. T. 97. № 10. C. 5237-42.

122. Reddy T. P., Zhu X., Perry G. and Smith M.A. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease // *J Alzheimers Dis.* 2009. T. 16. C. 763-774.
123. Relkin N., Szabo P., Adamiak B., Burgut T., Monthe C., Lent R.W., Younkin S., Younkin L., Schiff R., Weksler M.E. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease // *Neurobiol. Aging.* 2009. T. 30. № 11. C. 1728-36
124. Roberds S.L., Anderson J., Basi G., Bienkowski M.J., Branstetter D.G., Chen K.S., Freedman S.B., Frigon N.L., Games D., Hu K., Johnson-Wood K., Kappenman K.E., Kawabe T.T., Kola I., Kuehn R., Lee M., Liu W., Motter R., Nichols N.F., Power M., Robertson D.W., Schenk D., Schoor M., Shopp G.M., Shuck M.E., Sinha S., Svensson K.A., Tatsuno G., Tintrup H., Wijsman J., Wright S., McConlogue L. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics // *Hum Mol Genet.* 2001. T. 10. № 12. C. 1317-24.
125. Rouaux C., Jokic N., Mbebi C., Boutillier S., Loeffler J.P., Boutillier A.L. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration // *EMBO J.* 2003. T. 22. C. 6537–6549.
126. Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Meur N., Laquerrière A., Vital A., Dumanchin C., Feuillette S., Brice A., Vercelletto M., Dubas F., Frebourg T., Campion D. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy // *Nature Genetics.* 2006. № 38. C. 24-26.
127. Salloway S. Sperling R., Keren R., Porsteinsson A.P., van Dyck C.H., Tariot P.N., Gilman S., Arnold D., Abushakra S., Hernandez C., Crans G., Liang E., Quinn G., Bairu M., Pastrak A., Cedarbaum J.M. Investigators A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer Disease // *Neurology.* 2011. T. 77. C. 1253–1262.
128. Samuels S., Davis K. Experimental approaches to cognitive disturbance in Alzheimer's disease // *Harv Rev Psychiatry.* 1998. T. 6. № 1. C. 11-22.

129. Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O., Karaseva E., Rodin D., Schwarzman A.L. and Vitek M.C. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease // PLOS One. 2009. T. 7. e8191.
130. Saura C.A., Choi S.-Y., Beglopoulos T., Malkani S., Zhang D., Rao B.S.S., Chattarji S., Kelleher J., Kandel E.R., Duff K., Kirkwood A., Shen J. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration // Neuron. 2004. T. 42. C. 23–36.
131. Scheff S.W., Price D.A. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus // J Alzheimers Dis. 2006. T. 9. № 3. C. 101-15.
132. Schenk D., Barbour R., Dunn W. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in PDAPP mouse // Nature. 1999. T. 400. C. 173–177.
133. Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H. Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation // Neuroreport. 2008. T. 19. C. 1329–1333.
134. Smith A.D. The worldwide challenge of the dementias: a role for B vitamins and homocysteine // Food Nutr Bull. 2008 . T. 29. № 2. C. 143-72.
135. Stante M., Minopoli G., Passaro F., Raia M., Vecchio L.D. and Russo T. Fe65 is required for Tip60-directed histone H4 acetylation at DNA strand breaks // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. T. 106. C. 5093-5098.
136. Stefani M. and Liguri G. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions // Curr Alzheimer Res .2009. T. 6. C. 15-29.
137. Su B., Wang X., Nunomura A., Moreira P.I., Lee H.G., Perry G., Smith M.A., Zhu X. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease // Curr Alzheimer Res. 2008. T. 5. № 6. C. 525-32.

138. Sze C.I., Bi H., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Filley C.M., Martin L.J. Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains // *J Neurol Sci.* 2000. T. 175. №2. C. 81-90.
139. Szumiel I. and Foray N. Chromatin acetylation, β -amyloid precursor protein and its binding partner FE65 in DNA double strand break repair // *Acta Biochimica Polonica.* 2011. T. 58. C. 8-11.
140. Terry R.D. The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis // *J. Neuropathol. ExC. Neurol.* 1996. T. 55. C. 1023–1025.
141. Terry R.D., Masliah E. and Salmon D.C. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment // *Annals of Neurology.* 1991. T. 30. C. 572-580.
142. Thambisetty M., Simmons A., Velayudhan L., Hye A., Campbell J., Zhang Y., Wahlund L.O., Westman E., Kinsey A., Güntert A., Proitsi P., Powell J., Causevic M., Killick R., Lunnon K., Lynham S., Broadstock M., Choudhry F., Howlett DR., Williams R.J., Sharp S.I., Mitchelmore C., Tunnard C., Leung R., Foy C., O'Brien D., Breen G., Furney S.J., Ward M., Kloszewska I., Mecocci P., Soininen H., Tsolaki M., Vellas B., Hodges A., Murphy D.G., Parkins S., Richardson J.C., Resnick S.M., Ferrucci L., Wong D.F., Zhou Y., Muehlboeck S., Evans A., Francis P.T., Spenger C., Lovestone S. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2010. T. 67. №7. C. 739-48.
143. Thome J., Retz W., Baader M., Pesold B., Hu M., Cowen M., Durany N., Adler G., Henn F.A., Rösler M. Association analysis of HTR6 and HTR2A polymorphisms in sporadic Alzheimer's disease // *J Neural Transm.* 2001. T. 108. №10 C. 1175-80.
144. Tohgi H., Utsugisawa K., Nagane Y., Yoshimura M., Genda Y. Ukitsu M. Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999. T. 70 C. 288–292.

145. Torroja L., Packard M., Gorczyca M., White K. and Bud-nik T. The *Drosophila* b-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction // The Journal of Neuroscience. 1999. T. 15. C. 7793-7803.
146. Townsend M., Cleary J.P., Mehta T., Hofmeister J., Lesne S., O'Hare E., Walsh D.M., Selkoe D.J. Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer Amyloid-b oligomers // Ann Neurol. 2006. T. 60. C. 668–676.
147. Townsend K.C. and Pratico` D. Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs // FASEB J . 2005. T. 19. C. 1592-1601.
148. Umeda T., Mori H., Zheng H., Tomiyama T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion // J Neurosci Res. 2010. T. 88. №9. C. 1985-94.
149. Walker J. R. Pacoma R., Watson J., Ou W., Alves J., Mason D.E., Peters E.C., Urbina H.D., Welzel G., Althage A., Liu B., Tuntland T., Jacobson L.H., Harris J.L., Schumacher A.M. Enhanced proteolytic clearance of plasma A β by peripherally administered neprilysin does not result in reduced levels of brain A β in mice // J. Neurosci. 2013. T. 33. C. 2457–2464.
150. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.T. Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo // Nature. 2002. T. 416. C. 535-539.
151. Walsh D.M., Selkoe D.J. A beta oligomers - a decade of discovery // J Neurochem . 2007. T. 101. C. 1172–1184.
152. Walsh D.M., Selkoe D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease // Neuron. 2004. T. 44. №1. C. 181-93.
153. Wang W.X. Rajeev B.W., Stromberg A.J., Ren N., Tang G., Huang Q., Rigoutsos I., Nelson P.T. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-

site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 // *J Neurosci* .2008. T. 28. C. 1213–1223.

154. Wang Y., Tang X.C., Zhang H.Y. Huperzine A Alleviates Synaptic Deficits and Modulates Amyloidogenic and Nonamyloidogenic Pathways in APP^{swe}/PS1^{dE9} Transgenic Mice // *J Neurosci Res*. 2012. T. 90. №2. C. 508-17.

155. Wang S.C., Oelze B., Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease // *PLoS One*. 2008. T. 3. №7. e2698.

156. Xia W., Wong S. T., Hanlon E. & Morin C. γ Secretase modulator in Alzheimer's disease: shifting the end // *J. Alzheimers Dis*. 2012. T. 31. C. 685–696.

157. Yao P.J., Zhu M., Pyun E.I. Brooks A.I., Therianos S., Meyers V.E., Coleman P.D. Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease // *Neurobiol Dis*. 2003. T. 12. C. 97-109.

158. Yang Z., Fan, Y., Deng Z., Wu B. and Zheng Q. Amyloid precursor protein as a potential marker of malignancy and prognosis in papillary thyroid carcinoma // *Oncology Letters*. 2012. T. 3. C. 1227-1230.

159. Yerbury J.J., Wilson M.R. Extracellular chaperones modulate the effects of Alzheimer's patient cerebrospinal fluid on Abeta(1-42) toxicity and uptake // *Cell Stress Chaperones*. 2010. T.15. №21. C. 115-21

160. Zhang Y., Lu L., Jia J., Jia L., Geula C, Pei J., Xu Z., Qin W., Liu R., Li D., Pan N. (2014) A Lifespan Observation of a Novel Mouse Model: In Vivo Evidence Supports Ab Oligomer Hypothesis // *PLoS ONE*. 2014. T. 9. №1. e85885.

161. Zheng H., Koo E. The amyloid precursor protein: beyond amyloid // *Mol Neurodegener*. 2006. T. 1. C. 1-5.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю Светлане Владимировне Саранцевой за обучение, направление и терпение, за помощь в планировании и проведении экспериментов и написании диссертации.

Огромная благодарность Ольге Игоревне Большаковой как за профессиональную, так и за моральную поддержку.

Я также признателен Тимошенко Светлане Ивановне за помощь в проведении опыта по определению нейродегенерации мозга мух.

Также благодарю Вербенко Валерия Николаевича, Чухловина Алексея Борисовича за критическую оценку текста диссертации.

Отдельную благодарность хотел бы выразить Емельянову Антону Константиновичу, Тараскиной Анастасии Евгеньевне и Пчелиной Софье Николаевне за обучение методикам RT-PCR и вестерн-блоттинга, а также за предоставление необходимых материалов.

Также хочу поблагодарить Невзгядову Ольгу Всеволодовну и весь коллектив лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков за предоставление мутантных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*.

Я также признателен Кислик Галине Алексеевне и Ткаченко Никите Андреевичу за привнесение дружеской атмосферы в рабочие будни.

В завершении я благодарю своих родителей: Родину Марину Алексеевну и Родину Игоря Юрьевича, а также жену Родину Виолетту Михайловну за поддержку и помощь.