УДК 577.2, 577.29

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА ПОВЫШЕННОГО ОБРАЗОВАНИЯ ГАММА-СИНУКЛЕИНА НА ДЕГЕНЕРАЦИЮ СИНАПСОВ, ВЫЗВАННУЮ НАРУШЕНИЕМ ФУНКЦИИ БЕЛКА CSPA

Лыткина О.А., Тарасова Т.В., Анохин П.К., Кухарский М.С., Устюгов А.А., Бачурин С.О.

Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, e-mail: loa.ipac@gmail.com

Создана и охарактеризована новая линия мышей с повышенным синтезом белка гамма-синуклеина в тканях нервной системы на фоне генетического нокаута CSPα, являющимся ко-шаперонным белком синапсов. Ранее было показано, что при скрещивании линии мышей с сверхпродукцией альфа-синуклеина с CSPα нокаутами происходит восстановление фенотипа благодаря участию альфа-синуклеина в синаптической передаче. Поскольку альфа- и гамма-синуклеин структурно похожи, вероятно, что скрещивание CSPα нокаутов с линией мышей со сверхпродукцией гамма-синуклеин даст схожие результаты. В результате было показано, что гамма-синуклеин присутствует в больших количествах в синаптических окончаниях у полученных мышей, однако реверсия фенотипа CSPα нокаутных мышей не происходит, что указывает на отличную от альфа-синуклеина функцию в синапсах. Несмотря на структурное сходство альфа- и гамма-синуклеина, их функции в пресинаптических окончаниях разделены и не дублируются.

Ключевые слова: CSPα, гамма-синуклеин, нейродегенерация, трансгенные мыши

ANALYSIS OF GAMMA-SYNUCLEIN OVEREXPRESSION ON SYNAPSE DEGENERATION CAUSED BY DYSFUNCTION OF CSPA PROTEIN

Lytkina O.A., Tarasova T.V., Anokhin P.K., Kukharskiy M.S., Ustyugov A.A., Bachurin S.O.

Institute of physiologically active compounds Russian academy of science, e-mail: loa.ipac@gmail.com

A new line of transgenic mice overexpressing gamma-synuclein in the nervous system on the CSPα knockout background was created and characterized. CSPα acts as a co-chaperone in synapses and it was previously shown that alpha-synuclein overexpression restores phenotypic synapse dysfunction in CSPα knockouts by crossing two different lines of mice. Taking into account that alpha- and gamma-synucleins are structurally related proteins it was expected that gamma-synuclein would be also involved in reversion of the phenotype. As a result, we determined that gamma-synuclein is present in large amounts in the synaptic terminals. However, high concentrations of gamma-synuclein synthesis we did not detect reversal of CSPα phenotype, indicating its functional role in the presynaptic terminals differs from the one of alpha-synuclein regardless of their structural similarities.

Keywords: CSPα, gamma-synuclein, neurodegeneration, transgenic mice

Белок CSPα (cysteine string protein) является везикулярным белком синапсов центральной и периферической нервной системы, обладающий ко-шаперонной активностью. CSPα взаимодействует с белками SNARE-комплекса, образование которого является ключевым в процессе нейротрансмиссии [12]. Нарушение функции CSPα препятствует эффективному формированию SNARE-комплексов и приводит к существенному снижению содержания белка SNAP-25 [5; 14]. И хотя CSPα принимает активное участие в целом ряде процессов, связанных с функционированием синаптических везикул и оборотом нейротрансмиттера [15], было выдвинуто предположение, что именно ко-шаперонная способность CSPα поддерживать правильную конформацию и задерживать деградацию белка SNAP-25 в процессах синаптической активности, стимулирует сборку SNARE-комплексов и, таким образом, предотвращает накопление токсичных форм SNARE-белков, имеющих развернутую конформацию, что в свою очередь препятствует синапсов [13–14]. Таким образом, стабилизация SNARE-комплексов и ингибирование процессов деградации белка SNAP-25 являются принципиально важными механизмами защиты синапсов от дегенерации, а поиск факторов, способных стимулировать эти защитные механизмы, рассматривается как перспективное направление разработки патогенетической терапии нейродегенераций. Поэтому исключительно важными представляются данные исследований, проведенных в лаборатории T. Sudhof [5], в которых было обнаружено, что повышенная экспрессия альфа–синуклеина предотвращает развитие нейродегенеративного процесса, вызванного нарушением функции белка CSPα в модельных мышах. Более того, при выключении гена альфа-синуклеина в генетических нокаутах, отсутствие в нервной системе белка CSPα приводит к еще более стремительному

развитию нейродегенеративного процесса у таких двойных нокаутных животных [5]. В линии мышей, у которых генетически инактивирован белок CSPα, развивается агрессивная форма нейродегенеративного процесса с неизбежным летальным исходом. CSPα нокаутные животные погибают в раннем постнатальном периоде с выраженной неврологической симптоматикой [6]. Также было показано, что экспрессия мутантной формы альфа-синуклеина, связанной с наследственными формами болезни Паркинсона, при которых имеет место замена аланина в 30 положении белковой молекулы на фенилаланин, не способна предотвращать развитие нейродегенеративного процесса в CSPα нокаутных мышах, поскольку такая мутантная форма белка не способна эффективно связываться с биологическими мембранами. Таким образом, было установлено, что в нейрональных синапсах альфа-синуклеин и CSPα вовлечены в общий каскадный механизм, при этом маловероятной считается их способность напрямую заменять функцию один другого. Эта гипотеза подтверждается данными Burre с соавторами [4], которые показали, что в мозге модельных животных с инактивацией функции всех трех альфа-, бета- и гамма-синуклеинов обнаруживается повышенный уровень белка CSPα.

Альфа- и гамма-синуклеины имеют исключительно высокую степень гомологии [8]. В работах целого ряда авторов [1; 4–5; 7; 11] независимо было показано, что у модельных животных с нарушенной функцией всех трех синуклеинов с возрастом развивается синаптическая дисфункция, которая не была отмечена ни у альфа-синуклеиновых, ни у бета-синуклеиновых, ни у гамма-синуклеиновых нокаутов, что указывало на принципиальную возможность замещения функции одного синуклеина другим. С другой стороны, альфа- и бета-синуклеины имеют отличную от гамма-синуклеина анатомическую картину экспрессии и обнаруживается в других популяциях центральных и периферических нейронов [3; 9]

Цель: провести сравнительный анализ способности гамма-синуклеина влиять на прогрессию нейродегенерации, обусловленной нарушением функции белка CSP-а в генетически модифицированных мышах.

Материалы и методы исследования

В работе использовали чистые линии животных на генетическом фоне линии C57Bl/6J (Charles River Laboratories, США). Мыши с делецией гена белка CSPα были получены из лаборатории T. Sudhof (Genentech, США) [6]. Линия трансгенных мышей Thy1mγ^{tg} была получена из лаборатории V. Buchman [10]. Работы с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. Геномную ДНК выделяли из биопсии уха животных с помощью набора Diatom™ DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория ИзоГен», Россия). Детекцию мутированных аллелей проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью набора GenePak® PCR Core (ООО «Лаборатория ИзоГен», Россия). Для генотипирования потомства от скрещивания мышей трансгенной линии Thy1mγ^{tg} с нокаутными мышами линии CSPα$^{-/-}$ проводили идентификацию гомозиготных и гемизиготных по трансгенной кассете особей с использованием ПЦР в реальном времени, которую проводили на установке StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). При анализе соответствующих последовательностей генов использовали праймеры для CSPα: D (5’ AAAGTCCTATCGGTAAGCAGC), E (5’ CTGCTGGCATACTAATTGCAG), C (5’ GAGCGCGCGCGGCGGAGTTGTTGAC), для трансгенных животных по γ-синуклеину: Psn_up (CCA-TGG-ACG-TCT-TCA-AGA-AAGG), Gsex2_rev (CGT-TCT-CCT-TGG-TTT-TGG-TG). Для постановки иммуноблоттинга использовали следующие антитела: к γ-синуклеину – кроличьи поликлональные, клон SK23 [2], к синаптофизину – мышиные моноклональные, клон 2, BD Transduction Laboratories.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение повышенной экспрессии гамма-синуклеина в нервной системе CSPα нокаутных мышей. CSPα нокаутные мыши были скрещены с трансгенными мышами по гену гамма-синуклеина, чтобы создать линию мышей, у которых в геноме отсутствует ген белка CSPα и в то же время на высоком уровне экспрессируется ген белка гамма-синуклеина в нейронах. Для получения такой линии нами была проведена серия скрещиваний CSPα нокаутных мышей с линией трансгенных по гамма-синуклеину мышей [10]. Всех, полученных в первом поколении самок (n = 40) от скрещивания CSPα нокаутных мышей с мышами, трансгенными по гамма-синуклеину, скрещивали с самцами первого поколения. Результатом такого скрещивания является формирование девяти возможных генотипов, которые были определены анализом ДНК из биопсий уха всех потомков методом обычной ПЦР для гена белка CSPα и ПЦР в реальном времени для трансгенной кассеты гамма-синуклеина. В результате генотипирования животных (n = 279), полученных во втором поколении, были идентифицированы потомки со следующими генотипами:

CSPα$^{+/+}$ / Thy1mγ$^{WT/WT}$ – 19 особей; CSPα$^{+/+}$ / Thy1mγ$^{tg/WT}$ – 35 особей; CSPα$^{+/-}$ / Thy1mγ$^{WT/WT}$ – 41 особь; CSPα$^{+/-}$ / Thy1mγ$^{tg/WT}$ – 69 особей; CSPα$^{+/+}$ / Thy1mγ$^{tg/tg}$ – 33 особи; CSPα$^{+/-}$ / Thy1mγ$^{tg/tg}$ – 14 особей; CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ$^{WT/WT}$ – 23 особи; CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ$^{tg/WT}$ – 29 особей; CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ$^{tg/tg}$ – 16 особей.

В результате проведенных скрещиваний нами было получено 16 особей с генотипом CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ$^{tg/tg}$, что составляет 5,7% от общего числа ($n = 279$) прогенотипированных, выживших до половозрелого возраста потомков и соответствует ожидаемому количеству при менделевском типе наследования.

Повышенная экспрессия экзогенного гамма-синуклеина в нервной системе CSPα нокаутных мышей не влияет на прогрессию нейродегенеративного процесса. Нокаутные по гену белка CSPα мыши прекращали расти и набирать вес между 10 и 20 днями постнатального периода, в отличие от контрольных мышей дикого типа. С этого момента общее состояние нокаутных животных постепенно ухудшалось и, начиная с трехнедельного возраста, регистрировалась их гибель. Около половины всех нокаутных по CSPα мышей не доживали до 35-го постнатального дня, а к 52-му дню погибали все животные. Чтобы определить, будет ли сверхэкспрессия гамма-синуклеина в нокаутных мышах по CSPα влиять на выживаемость этих мышей, мы создали когорты животных дикого типа (WT) и нокаутных CSPα мышей, экспрессирующих высокий уровень гамма-синуклеина в нейронах, благодаря наличию трансгенного аллеля Thy1mγ в их геноме в гомозиготном состоянии, то есть получили экспериментальные группы животных с генотипами: CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ^{tg} и CSPα$^{+/+}$ / Thy1mγ^{tg}. Далее мы исследовали фенотипы мышей полученных линий, регистрируя вес в раннем постнатальном периоде и продолжительность жизни. Мыши с генотипом CSPα$^{+/+}$ / Thy1mγ^{tg} набирали вес и развивались нормально и не отличались от контрольных животных C57Bl/6J дикого типа в течение первых двух месяцев постнатального развития. Смертность этих животных в этом периоде была наравне с таковыми в контрольных группах животных дикого типа линии C57Bl/6J, которых содержали в таких же условиях. Мыши линии CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ^{tg}, напротив, не набирали вес, начиная с 10 дня постнатального периода так же, как мыши линии CSPα$^{-/-}$, не несущие трансгенную кассету гамма-синуклеина. На этой стадии мыши обеих групп становились постепенно апатичными, хотя способны были реагировать в ответ на внешний раздражитель. Причем это было показано как для самцов, так и самок (таблица).

Масса тела животных разных генотипов в раннем постнатальном периоде, X±m

Дни	WT♀	Thy1mγ^{tg}♀	CSPα$^{-/-}$♀	CSPα$^{-/-}$/ Thy1mγ^{tg}♀	WT♂	Thy1mγ^{tg}♂	CSPα$^{-/-}$♂	CSPα$^{-/-}$/ Thy1mγ^{tg}♂
10	4,98 ± 0,2	4,71 ± 0,3	4,70 ± 0,1	4,41 ± 0,2	4,74 ± 0,1	4,92 ± 0,2	4,57 ± 0,2	4,67 ± 0,1
20	7,67 ± 0,3	7,30 ± 0,3	5,32 ± 0,3	5,93 ± 0,4	7,98 ± 0,2	7,25 ± 0,2	6,91 ± 0,4	6,09 ± 0,2
30	14,16 ± 0,2	13,8 ± 0,7	5,47 ± 0,5	6,43 ± 0,3	16,83 ± 0,1	15,98 ± 1,1	7,13 ± 0,4	6,25 ± 0,2
40	17,36 ± 0,1	17,28 ± 0,7	6,81 ± 0,2	6,28 ± 0,6	21,0 ± 0,3	20,54 ± 0,8	7,56 ± 0,2	6,58 ± 0,3
50	19,09 ± 0,5	18,75 ± 0,7	6,90 ± 0,2	7,25 ± 0,1	23,12 ± 0,4	23,65 ± 0,5	7,34 ± 0,1	6,48 ± 0,7
60	21,01 ± 0,3	20,47 ± 0,9	–	7,23 ± 0,1	27,34 ± 0,1	26,41 ± 0,5	±	7,01 ± 0,5

Генотипы: WT (wild type) – контрольная группа с немодифицированным геномом; Thy1mγ^{tg} – линия трансгенных мышей со сверхэкспрессией гамма-синуклеина; CSPα$^{-/-}$ – нокаутные мыши по CSPα, CSPα$^{-/-}$/ Thy1mγ^{tg} – нокаутные мыши по CSPα со сверхэкспрессией гамма-синуклеина (масса в граммах, X – средняя арифметическая; m – ошибка средней арифметической).

Статистически значимых отличий в возрасте наступления смерти между животными групп CSPα$^{-/-}$/ Thy1mγ^{tg} и CSPα$^{-/-}$ выявлено не было. Так же, как и в группе CSPα$^{-/-}$ мышей, 50% мышей линии CSPα$^{-/-}$/ Thy1mγ^{tg} погибали к 35 постнатальному дню и к 50 дню погибали почти все мыши (рис. 1).

Таким образом, показатели динамики постнатального развития мышей CSPα$^{-/-}$ / Thy1mγ^{tg}, которое было охарактеризовано регулярной регистрацией массы тела животных, не отличались от показателей линии нокаутных по CSPα мышей с нормальной экспрессией гамма-синуклеина.

Анализ уровня гамма-синуклеина в синаптических везикулах CSPα$^{-/-}$/ Thy1mγ^{tg} мышей. Ранее было установлено, что увеличение внутриклеточной концентрации альфа-синуклеина, причем не только в синапсах, но и в цитоплазме нейронов, путем его эктопической экспрессии позволяет остановить нейродегенеративный процесс, вызванный недостаточностью функции белка CSPα, участвующего в образовании SNARE-комплекса при нейротрансмиссии [5]. Для того чтобы оценить, влияет ли сверхэкспрессия гамма-синуклеина на синаптическую дисфункцию, причиной которой является отсутствие в геноме ко-шаперонного белка CSPα, очень важным представлялся вопрос, достаточно

ли высокая концентрация эктопического гамма-синуклеина в синапсах полученных нами мышей. То, что уровень эктопического гамма-синуклеина высок в телах и в отростках нейронов, ранее было показано в работах, посвященных анализу этой линии мышей [10]. Однако не было показано наличие эктопического гамма-синуклеина в синапсах. Для того чтобы доказать, что гамма-синуклеин присутствует в синапсах в повышенном количестве у трансгенных мышей, мы анализировали с помощью иммуноблоттинга белковые фракции печени, коры головного мозга, спинного мозга, а также синаптосомальную и везикулярную фракции (выделенные из полосатого тела мозга) девятимесячных мышей дикого типа и трансгенных по гену гамма-синуклеина. В результате мы показали, что гамма-синуклеин действительно присутствует в больших количествах во фракции синаптических везикул и в грубой синаптосомальной фракции. Также мы показали, что эктопический гамма-синуклеин экспрессировался исключительно в нервной ткани. В контрольных препаратах, полученных от мышей дикого типа, его количество было существенно ниже, поскольку там присутствовал только эндогенный гамма-синуклеин (рис. 2).

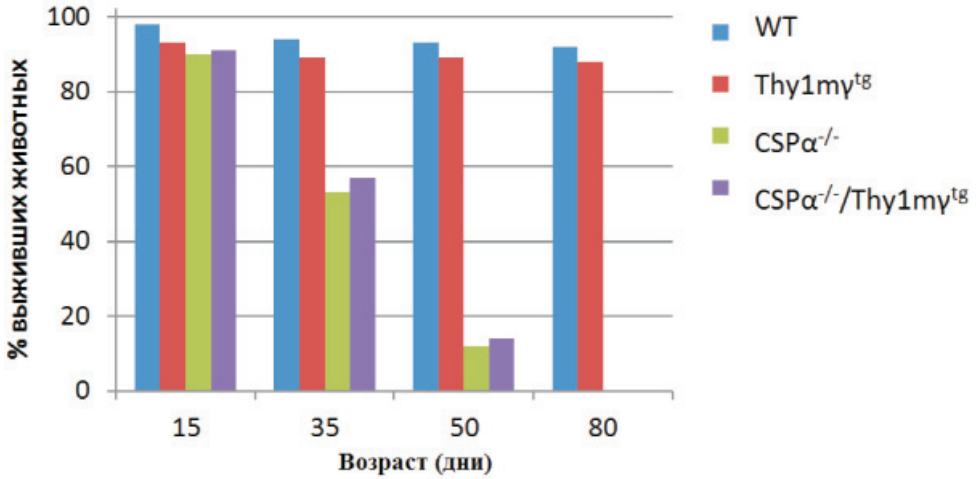

Рис. 1. Процент выживших животных разных генотипов в различные периоды постнатального развития

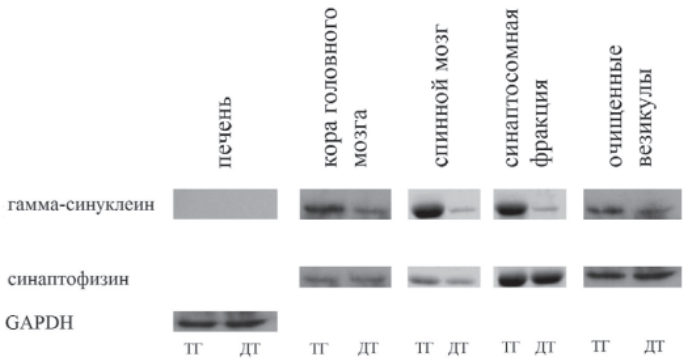

Рис. 2. Детекция эктопического гамма-синуклеина в лизатах нервной ткани и печени Thy1mγ^{tg} мышей: ТГ – трансгенные мыши; ДТ – дикий тип, контрольная группа с немодифицированным геномом

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

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

Список литературы/References

1. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family // J Neurosci. – 2011. – Vol. 31. – № 20. – P. 7264–74.

2. Buchman V.L., Adu J., Pinon L.G., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity // Nat Neurosci. – 1998. – Vol. 1. – № 2. – P. 101–3.

3. Buchman V.L., Hunter H.J., Pinon L.G., Thompson J., Privalova E.M., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system // J Neurosci. – 1998. – Vol. 18. – № 22. – P. 9335–41.

4. Burre J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Sudhof T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro // Science. – 2010. – Vol. 329. – № 5999. – P. 1663–7.

5. Chandra S., Gallardo G., Fernandez-Chacon R., Schluter O.M., Sudhof T.C. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration // Cell. – 2005. – Vol. 123. – № 3. – P. 383–96.

6. Fernandez-Chacon R., Wolfel M., Nishimune H., Tabares L., Schmitz F., Castellano-Munoz M., Rosenmund C., Montesinos M.L., Sanes J.R., Schneggenburger R., Sudhof T.C. The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration // Neuron. – 2004. – Vol. 42. – № 2. – P. 237–51.

7. Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Makani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S. alphabetagamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107. – № 45. – P. 19573–8.

8. Lavedan C. The synuclein family // Genome Res. – 1998. – Vol. 8. – № 9. – P. 871–80.

9. Ninkina N., Papachroni K., Robertson D.C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F., Court F., Rosenthal A., Fleetwood-Walker S.M., Davies A.M., Buchman V.L. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene // Mol Cell Biol. – 2003. – Vol. 23. – № 22. – P. 8233–45.

10. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. Gamma-synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein // Hum Mol Genet. – 2009. – Vol. 18. – № 10. – P. 1779–94.

11. Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice // J Neurochem. – 2004. – Vol. 89. – № 5. – P. 1126–36.

12. Ruiz R., Casanas J.J., Sudhof T.C., Tabares L. Cysteine string protein-alpha is essential for the high calcium sensitivity of exocytosis in a vertebrate synapse // Eur J Neurosci. – 2008. – Vol. 27. – № 12. – P. 3118–31.

13. Sharma M., Burre J., Bronk P., Zhang Y., Xu W., Sudhof T.C. CSPalpha knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function // EMBO J. – 2012. – Vol. 31. – № 4. – P. 829–41.

14. Sharma M., Burre J., Sudhof T.C. CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity // Nat Cell Biol. – 2011. – Vol. 13. – № 1. – P. 30–9.

15. Zhang Y.Q., Henderson M.X., Colangelo C.M., Ginsberg S.D., Bruce C., Wu T., Chandra S.S. Identification of CSPalpha clients reveals a role in dynamin 1 regulation // Neuron. – 2012. – Vol. 74. – № 1. – P. 136–50.

Рецензенты:

Кинзирский А.С., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией фармакологии, Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка;

Григорьев В.В., д.б.н., заведующий лабораторией нейрорецепции, Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка.

Работа поступила в редакцию 30.04.2014.