

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

« ____ » _____ 20 ____ г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Нейрон-астроцитарные взаимодействия в моделях нейродегенерации,
вызванные экспрессией мутантного Атаксина-1

06.04.01 Биология

06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель _____ канд. мед. наук А.Н.Шуваев

Выпускник _____ Д.А. Яковлева

Рецензент _____ д-р мед. наук А.В. Моргун

Красноярск, 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская работа на тему «Нейрон-астроцитарные взаимодействия в моделях нейродегенерации, вызванные экспрессией мутантного Атаксина-1» насчитывает 24 страницы текстового документа, 16 использованных литературных источников, 4 листа графического материала.

КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ, АСТРОЦИТЫ, МОЗЖЕЧОК, ГЛИЯ БЕРГМАНА, СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНАЯ АТАКСИЯ 1 ТИПА, АТАКСИН-1, АСТРОГЛИОЗ, НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЯ, ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТЬ.

Цель работы: Открытие новых молекулярных механизмов, лежащих в основе нейрон-астроцитарного взаимодействия в модели СЦА1 с активированной глией Бергмана. Цель работы предполагала следующие задачи:

- Создание модели СЦА1 посредством экспрессии *in vivo* лентевирусной конструкции GFAP-Atxn1Q89-Flag
- Оценка поведения у мышей с СЦА1, экспрессирующих GFAP-Atxn1Q89-Flag
- Оценка морфологических изменений в коре мозжечка в модели СЦА1
- Оценка транссинаптической передачи синаптической пластичности в коре мозжечка в модели СЦА1
- Сравнение патогенетических изменений в моделях специфической и неспецифической астроцит-опосредованной нейродегенерации

Спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) – тяжелое нейродегенеративное прогрессирующее заболевание, возникающее на 3-4 десятилетия жизни. Для картины данного заболевания характерны такие симптомы, как нарушение координации верхних и нижних конечностей и нарушение баланса при ходьбе. При развитии СЦА1 в течение нескольких лет появляются расстройства глотания и неясная речь. В отдельных случаях у больных появляются дополнительные признаки типа нейропатии (потеря чувствительности и рефлексов в нижних конечностях), усиления спазма мышц, слабости или потери памяти. При СЦА1 генетические дефекты ведут к нарушению работы определенных нервных волокон, которые несут информацию к головному мозгу и от него. В итоге, процесс заканчивается дегенерацией мозжечка. В настоящий момент заболевание не поддается лечению. Летальный исход чаще всего наступает спустя 10-15 лет с момента

проявления первых признаков. Источником генетического прогрессирования СЦА1 является увеличение числа копий tandemных тринуклеотидных ЦАГ-повторов в кодирующей области гена СЦА1. Тринуклеотидные повторы ЦАГ кодируют полиглутаминовые участки белка атаксина-1, влияние которого в патогенезе заболевания неизвестно [1].

В результате исследования была создана модель СЦА1 посредством экспрессии мутантного атаксина-1 в глию Бергмана. Мышам вводили лентивирус с плазмидами (pTYF-sGFAP-Flag-ATXN1[Q2]-WPRE) и (pTYF-sGFAP-Flag-ATXN1[Q85]-WPRE). Первая группа была с нормальным атаксином-1, вторая группа с мутантным атаксином-1, соответственно. 10 мкл лентивируса или PBS медленно стереотаксически вводили в кору головного мозга (около дольки VI) с помощью шприца Гамильтона 10 мкл. Мышей использовали для дальнейших экспериментов через 9 недель после инъекции. После введения LVV животным был проведен поведенческий тест на координацию. Мыши с PBS, с нормальным атаксином-1 и с мутантным атаксином-1 помещались на вращающуюся дорожку, которая за 3,5 минут увеличивала обороты до 30 об/мин и затем была стабильна до 5 минут. Эксперимент длился в течение 4 дней. В ходе эксперимента было выявлено, что экспрессия мутантного атаксина-1 в глии Бергмана глобально влияет на координацию движений. Мыши с прогрессирующим заболеванием плохо держались на вращающейся дорожке. Так же мутантный атаксин-1 негативно влияет на морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье. Изменялось качество передачи нейромедиатора клеток Пуркинье. Экспрессия мутантного атаксина-1 в глии Бергмана вызывает уменьшение экспрессии EAAT1, что приводит к нарушению обратного захвата нейромедиатора в синапсах ПВ-КП и к эксайтотоксичности. Было произведено сравнение специфической и неспецифической экспрессии атаксина-1. Специфический мутантный атаксин-1 локализовался только в астроцитах, неспецифический – в астроцитах и нейронах. Это дает предположить, что астроциты страдают в первую очередь, а нейроны страдают вторично. Можно сказать, что главным звеном в развитии эксайтотоксичности предстает реактивная астроглия, которая захватывая нейромедиатор из синаптической щели, может тормозить процесс эксайтотоксичности.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность:	5
1 Литературный обзор	7
1.1 Функциональная анатомия мозжечка:	7
1.2 Синаптическая передача клеток Пуркинье:	8
1.3 Астроглия:.....	9
1.4 Вклад ЕААТ в патогенез нейродегенеративных заболеваний:.....	9
1.5 Астроглиоз:	10
1.6 Эксайтотоксичность:	10
1.7 Спинаocerebellарная атаксия:.....	11
2 Материалы и методы	13
2.1 Нарabотка и очистка оптогенетических вирусов:	13
2.2 Введение вирусных векторов in vivo:	13
2.3 Получение живых срезов:	13
2.4 Регистрация токов с помощью метода локальной фиксации потенциала:.....	14
2.5 ИГХ срезов мозжечка:	14
2.6 Конфокальная микроскопия и морфометрический анализ:	15
2.7 Рота род:.....	15
2.8 Статистический анализ:.....	16
3 Результаты	17
3.1 Проведение поведенческого теста:	17
3.2 Исследование транссинаптической передачи:	17
ВЫВОДЫ	21
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	22
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	23

ВВЕДЕНИЕ

Цель данной работы заключалась в том, чтобы с помощью метода локальной фиксации мембранного потенциала клеток создать модель спиноцереbellлярной атаксии 1 типа мозжечка и изучить нейрон-астроцитарные взаимодействия в этой модели, вызванные экспрессией мутантного атаксина-1.

Нейродегенеративные заболевания являются наиболее актуальной проблемой в медицине и нейробиологии XXI века. Наибольший вклад в гибель нейронов при данном состоянии вносит такой патологический процесс, как эксайтотоксичность, поэтому исследование молекулярных основ данного процесса является наипервейшей задачей современной нейробиологии. Основным игроком в развитии эксайтотоксичности является астроглия, которая захватывая нейромедиатор из синаптической щели, препятствует развитию эксайтотоксичности. Это явление очень динамично и не может адекватно быть исследовано с помощью иммуногистохимических и генетических методов исследования, связанных с исследованием фиксированного материала. В связи с этим, в данной работе были применены методы исследования живых клеток, такие как локальная фиксация потенциала мембраны и оптогенетика.

Как человеческая кожа является «зеркалом» процессов, происходящих внутри организма, так и мембрана клетки отражает процессы ее внутренней жизнедеятельности, в частности, изменением электрической активности. Регистрировать же электрическую активность нейронов возможно методом локальной фиксации мембранного потенциала, который впервые был использован Неером и Сакманом в 1976г.

Благодаря методу локальной фиксации мембранного потенциала клетки возможно регистрировать изменения потенциала и токов на мембране клетки через контакт между кончиком микроэлектрода и мембраной клетки, которая имеет высокое сопротивление [2].

Актуальность:

- Реактивный астроглиоз возникает при нейродегенерации, ишемии, черепно-мозговой травме и затрудняет выполнение функций нейронов головного мозга
- Метод оптогенетики позволяет создать модель СЦА1, вызванную экспрессией мутантного Атаксина-1 и изучить патогенез на любой стадии

- Выявление молекул маркеров позволяет создать эффективную терапию данного состояния

1 Литературный обзор

1.1 Функциональная анатомия мозжечка:

Строение коры мозжечка преимущественно стереотипно. Самый поверхностный из трех слоев коры (молекулярный слой) отделен от нижнего (гранулярного) слоя слоем клеток Пуркинье.

В различных слоях коры мозжечка расположены шесть разных типов нервных клеток и их отростки. Мелкие клетки-зерна расположены в зернистом слое, а аксоны их спускаются в молекулярный слой. В молекулярном слое аксоны нервных клеток Т-образно делятся и отправляют в каждом направлении вдоль поверхности коры ветвь - параллельное волокно. Распространяясь на большие расстояния, эти параллельные волокна пересекают ветвления дендритов многих клеток Пуркинье и образуют с ними и дендритами корзинчатых и звёздчатых нейронов синапсы. Таким образом, нейроны клеток-зёрен посылают глутамат, используемый в виде нейромедиатора, и полученное ими от моховидных волокон возбуждение на большое расстояние грушевидным клеткам Пуркинье. В зернистом слое находятся также более крупные клетки Гольджи [3].

Между этими двумя слоями лежит слой клеток Пуркинье. Эти клетки представляют собой достаточно крупные нейроны. Их дендриты широко ветвятся в молекулярном слое. Аксоны клеток Пуркинье идут к ядрам мозжечка, и небольшое их количество доходит до вестибулярных ядер. В коре мозжечка присутствуют два типа двигательных волокон. Лазящие (лиановидные) волокна проходят через зернистый слой. Они заканчиваются в молекулярном слое на дендритах клеток Пуркинье. Отростки лиановидных волокон связываются с дендритами этих клеток. К каждой клетке Пуркинье подходит лишь одно волокно. В то же время каждое лиановидное волокно подходит к 10-15 клеткам Пуркинье [3].

Несмотря на изящную и регулярную структуру мозжечка, а так же хорошо изученные нейронные сети, конкретная роль его в двигательной функции еще далеко не известна. Ясно, что при осуществлении более тонких движений мозжечок определяет, где находятся в каждый данный момент части тела, и сравнивает их действительное положение с тем, которое должно быть. Мозжечок играет также важную роль при выполнении быстрых, последовательных и одновременных движений [4].

1.2 Синаптическая передача клеток Пуркинье:

Центральным звеном, интегрирующим всю поступающую информацию в мозжечок, являются клетки Пуркинье. Они образуют синапсы с ЛВ (лиановидных волокон) или ПВ (параллельных волокон). Клетки Пуркинье являются важным функциональным компонентом коры мозжечка. Они формируют активность нейронов глубоких ядер мозжечка с помощью ингибирующих сигналов. Таким образом, нарушение работы клеток Пуркинье и их смерть при СЦА ведет к нарушениям функций мозжечка. Без ингибирования, приходящего с клеток Пуркинье, нейроны глубоких ядер мозжечка становятся гипервозбудимыми. Моторные центры, принимающие сигналы с глубоких ядер, управляются неправильно. В результате возникает нарушение координации движения[5].

При возбуждении пресинапса происходит высвобождение нейромедиатора (глутамата) в синаптическую щель. Возникает возбуждение в результате непродолжительного увеличения проницаемости мембраны нервной клетки для ионов K и Na , которые в этот момент могут перемещаться (K - наружу, Na - внутрь). Этот перенос приводит к изменению потенциала покоя и образованию потенциала действия на мембране. Процесс деполяризации сопровождается генерацией тока. Постепенные изменения проницаемости мембраны являются условием передачи возбуждения.

Механизм передачи возбуждения:

- 1) Нервное возбуждение, распространяющееся вдоль аксона к концевым пластинкам, вызывает изменение проницаемости пресинаптической мембраны. Молекулы медиатора (глутамат), которые до этого момента хранились в синаптических пузырьках концевых пластинок нерва, высвобождаются через эту мембрану в синаптическую щель.
- 2) Молекулы медиатора (глутамат) диффундируют через синаптическую щель и, достигнув постсинаптической мембраны, взаимодействуют с находящимися в ней лиганд-зависимыми рецепторами (в основном, в КП – это АМРА рецепторы). Так формируется ВПСТ (возбуждающий постсинаптический ток).
- 3) Взаимодействие медиатора с рецептором увеличивает проницаемость для катионов Na^+ и Ca^{2+} , что приводит к образованию в постсинаптической мембране потенциала действия[6].

1.3 Астроглия:

Пространство между нервными клетками и их отростками заполнено специализированными опорными клетками, в совокупности называемыми глией. По подсчетам глиальных клеток примерно в 5-10 раз больше, чем нейронов. В отличие от нейронов глиальные клетки могут делиться.

Астроглия представлена астроцитами – это сильно ветвящиеся клетки с короткими отростками в виде шипов. Различают протоплазматические астроциты, которые находятся в сером веществе и волокнистые астроциты, расположенные в белом веществе. Основная функция астроцитов – трофическая: питание нейронов, их поддержание, опора и создание гематоэнцефалического барьера [7].

Глия Бергмана - вид радиального астроцита в коре мозжечка, который находится в слое клеток Пуркинье. Глия Бергмана выражает высокую плотность переносчиков глутамата, которые ограничивают диффузию нейромедиатора глутамата при его высвобождении из пресинаптической мембраны. Помимо их роли в раннем развитии мозжечка, глия Бергмана также требуется для элиминации или добавления синапсов.

Астроциты плотно охватывают синапс и играют важную роль в процессах выделения и утилизации нейромедиатора. Также взаимодействия между нейронами и нейроглией, в первую очередь астроцитарного ряда, играют ключевую роль в ходе развития головного мозга, в том числе взрослого организма [8].

1.4 Вклад ЕААТ в патогенез нейродегенеративных заболеваний:

Существует пять основных типов транспортера глутамата, или ЕААТ. Транспортеры, локализованные в астроцитах, включают ЕААТ1 и ЕААТ2. Последнее отвечает в большей мере за поглощение глутамата в центральной нервной системе. ЕААТ3 - локализованных в соматических и дендритных нейронах, но в экстра-синаптические области. ЕААТ4 находится в клетках Пуркинье мозжечка и ЕААТ5 специфичен для сетчатки. ЕААТ отвечают за быстрый, эффективный перенос глутамата из синаптической щели, где глутамат превращается в глутамин через глутаминсинтетазу. Глутамин затем переносится обратно в нейроны, где он трансформируется в глутамат и упаковывается в синаптические везикулы везикулярными глутаматными транспортерами (VGLUT) [9].

Нейродегенеративные расстройства обладают общими патологическими механизмами, такими как асептическое воспаление,

окислительный стресс и эксайтотоксичность. В связи с этим, существует высокая вероятность использования общих терапевтических целей для этих заболеваний [10].

1.5 Астроглиоз:

Благодаря своей тесной связи со всеми компонентами нервной ткани и с сосудистым руслом, астроглия одна из первых принимает на себя различные неблагоприятные воздействия, становясь реактивной. Возможно, наиболее известным аспектом реактивного астроглиоза является образование рубцов. Способность астроцитов образовывать шрамы (рубцы), которые ингибируют регенерацию аксонов, была признана уже более 100 лет и привела к общей негативной коннотации (связи), которая долгое время доминировала над концепциями развития реактивного астроглиоза. Тем не менее, растущий объем информации указывает на то, что реактивные астроциты оказывают ряд существенных положительных эффектов и что астроциты обладают широким спектром потенциальных и часто тонких ответов на раздражения ЦНС, из которых образование рубцов является только одним и лежит в крайнем конце с точки зрения его серьезности [11].

Реактивный астроглиоз представляет собой спектр изменений астроцитов. Они могут возникать в ответ на все формы и тяжести поражения ЦНС и болезней, включая тонкие нарушения; изменения, которые подвергаются реактивным астроцитам, варьируются в зависимости от характера и тяжести раздражения вдоль градуированного континуума прогрессирующих изменений молекулярной экспрессии, прогрессирующей клеточной гипертрофии и, в тяжелых случаях, пролиферации и образования рубцов; изменения астроглиоза регулируются контекстно-специфическим образом конкретными сигнальными событиями, которые могут изменять как природу, так и степень этих изменений; изменения, происходящие во время реактивного астроглиоза, могут изменять активность астроцитов как путем усиления, так и потери функций, которые могут оказывать как благоприятное, так и отрицательное воздействие на окружающие нейронные и не нейронные клетки [12].

1.6 Эксайтотоксичность:

Эксайтотоксичность - это установленный механизм гибели нейронов. Многие нейродегенеративные заболевания, в том числе эпилепсия, связанные с возбудимостью, имеют этот патологический механизм в своей

основе. Впоследствии исследования, характеризующие эксайтотоксические механизмы этих заболеваний, были сфокусированы на изучении аспектов переносчиков глутамата и / или рецепторов. Недавние результаты указывают на возбуждательную синаптическую дисфункцию при болезни Альцгеймера, которая походит на изменения синаптического белка, наблюдаемые в эпилептических моделях [12].

Несмотря на интенсивные исследования механизмов эксайтотоксичности, внутриклеточные механизмы, приводящие к гибели нейронов, до сих пор не полностью понятны. Как известно, что нарушение функционирования гомеостатических процессов регуляции эндогенно-возбуждающих аминокислот или присутствие эксайтотоксинов (аналоги глутамата) вызывает гиперактивацию рецепторов глутамата. Эти события приводят к аномально высоким уровням внутриклеточного Ca^{2+} , следствием чего являются активация каталитических ферментов, образование токсичных свободных радикалов и нарушение клеточной энергии [13].

1.7 Спиноцеребеллярная атаксия:

Аутосомно-доминантные спиноцеребеллярные атаксии (СЦА) представляют собой группу прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся нарушением равновесия и двигательной координации вследствие первичной дисфункции мозжечка. На сегодняшний день было идентифицировано более 30 генов, запускающих хорошо описанный клинический и патологический фенотип, но лежащие в основе клеточные и молекулярные механизмы все еще плохо изучены. Исследования функций белков, участвующих в СЦА, и соответствующих измененных клеточных путей указывают на важную этиологическую роль дефектов в регуляции транскрипции, агрегации и очистки белков, изменений гомеостаза кальция и активации проапоптотических путей среди других. Все это приводит к дефициту синаптической нейротрансмиссии, спиноцеребеллярной дисфункции и, в конечном итоге, гибели нейронов [14].

Спиноцеребеллярная атаксия первого типа (СЦА1) является аутосомно-доминантным наследственным заболеванием, характеризующееся действием клеток Пуркинье мозжечка, спиноцеребеллярных путей, и селективных нейронов ствола мозга, вследствие расширения нестабильных трионуклеотидных повторов ЦАГ.

Атаксин-1 локализуется в ядрах клеток Пуркинье мозжечка. Нормальный атаксин-1 локализуется в нескольких ядерных структурах приблизительно через 0,5 микрона в поперечнике, тогда как расширенный

Атаксин-1 локализуется в единой приблизительно 2-микромной структуре до наступления атаксии. Мутантный атаксин-1 локализуется в единой ядерной структуре в пораженных нейронах пациентов с СЦА1. Мутантный атаксин-1 вызывает специфическое перераспределение домена, ассоциированного с ядерным матриксом, содержащего белок промиелоцитарной лейкемии. Препараты ядерного матрикса демонстрируют, что атаксин-1 связывается с ядерным матриксом в клетках Пуркинье [15].

Было показано, что уже с ранней стадии СЦА1 в патологический процесс вовлекается глия. Накопление мутантного белка приводит к селективной нейродегенерации в определенных областях мозга и реактивному астроцитозу. Астроглиоз в СЦА1 тесно связан с возникновением и тяжестью заболевания, и не является следствием гибели нейронов. Также было показано отложение мутантного Атаксина-1 непосредственно в астроцитах [16].

2 Материалы и методы

2.1 Нарботка и очистка оптогенетических вирусов:

Для создания модели СЦА1 мышам вводили LVV с плазмидами (pTYF-sGFAP-Flag-ATXN1[Q2]-WPRE) и (pTYF-sGFAP-Flag-ATXN1[Q85]-WPRE). Нормальный непатогенный ATXN1 [Q2] (кодирующий человеческий атаксин-1 с повторами 2 CAG) и патогенный ATXN1 [Q85] (с 85 непрерывными глутаминовыми повторами) были слиты в конструкцию с последовательностью, кодирующей меткой Flag первоначально на их 3'-концах в векторе экспрессии pcDNA3.1 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Затем конструкции Flag-ATXN1 [Q2] и Flag-ATXN1 [Q85] переносили в лентивирусный вектор pTyf под контролем расширенного промотора GFAP. Титры LVV GFAP-Flag-ATXN1 [Q2] составляли $6,94 \times 10^9$ единиц трансдукции (TU) / мл, в то время как титры GFAP-Flag-ATXN1 [Q85] составляли $6,78 \times 10^9$ TU / мл. LVV хранили при -80°C и использовали в течение 6 месяцев.

2.2 Введение вирусных векторов *in vivo*:

До введения вируса внутрибрюшинно вводился Маннитол (25% р-р 30μл/мг) для дегидратации и увеличения ёмкости внутричерепной полости. Десять микролитров лентивирусного векторного раствора вводили в субарахноидальное пространство над червем мозжечка (около дольки VI) 3-месячных (P90) WT CD11 мышей (Togashimaetal., 2006), обезболивавших хлоралгидратом [300 мг / кг массы тела]. Большинство трансдуцированных клеток были ограничены астроцитами под контролем промотора GFAP.

Двенадцати недельных мышей WT CD1 анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (400 мг / кг). 10 мкл LVV или PBS медленно стереотаксически вводили в кору головного мозга (около дольки VI) с помощью шприца Гамильтона 10 мкл. Мышей использовали для дальнейших экспериментов через 9 недель после инъекции.

2.3 Получение живых срезов:

Декапитация мыши осуществлялась под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг веса животного). Мозг быстро вынимался из черепной коробки и погружался на 1 минуту в охлажденный (до 4°C) раствор Рингера, содержащий (в мМ): 234 сахарозы; 26 NaHCO_3 ; 2,5 KCl ; 1,25 NaH_2PO_4 ; 11

глюкоза; 10 MgSO₄ и 0,5 CaCl₂ 0,5, pH 7,4 и перфузирующийся 95% O₂ и 5% CO₂. Парасагиттальные срезы червя мозжечка нарезались толщиной 250 мкм, используя вибротом. Срезы помещались во внеклеточный раствор, содержащий (в mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10D-глюкоза и 0,1 пикротоксин. Этот раствор непрерывно перфузировался смесью 95% O₂ и 5% CO₂ при комнатной температуре в течение 45 мин перед началом записи.

2.4 Регистрация токов с помощью метода локальной фиксации потенциала:

Записи whole-cell voltage-clamp были сделаны с использованием внутриклеточного раствора, содержащего (в миллимолярах) 65 K-глюконат, 65 Cs-methanesulfonate, 10 KCl, 1 MgCl₂, 4Na₂ATP, 1 NaGTP, 20 HEPES, 0,4 EGTA и 5 сахарозы (pH 7,3, С помощью CsOH). Фиксировали напряжение на -70 мВ для регистрации токов с параллельных волокон (PF) EPSC (возбуждающие постсинаптические токи). Селективная стимуляция PF была подтверждена парным импульсом уменьшения амплитуд EPSC с интерстимулятивным интервалом 50 мс. Пассивные мембранные свойства, такие как мембранная емкость (C_m) и мембранное сопротивление (R_m), были получены путем применения гиперполяризующих этапов напряжения от -70 до -80 мВ в течение 200 мс. Быстрая емкостная составляющая была автоматически скомпенсирована; сигнал был выбран на частоте 50 кГц и отфильтрован на низких частотах на частоте 10 кГц. Не было сделано никаких поправок для потенциалов жидкостного перехода. Анализ электрофизиологических данных проводили с использованием pClamp10 (Molecular Devices, США), программного обеспечения Patchmaster (НЕКА, Германия) и Clampfit 10.5 (Axon instruments, США). PF-возбуждающие постсинаптические токи (EPSC) регистрировались с напряжением при -70 мВ при электростимуляции. Селективная стимуляция PFs была подтверждена облегчением парных импульсов амплитуд EPSC (с интервалом между стимулами 50 мс). Константы времени затухания для PF EPSC измеряли путем подгонки EPSC-распада с помощью одной экспоненты.

2.5 ИГХ срезов мозжечка:

Для ИГХ исследования анестезированных мышей перфузировали транскардиально 4% параформальдегидом в 0,1 М фосфатном буфере, мозг удаляли и фиксировали в том же фиксаторе в течение ночи. Черви мозжечка

разрезали на сагиттальные срезы размером 50 мкм. Срезы обрабатывали rabbit monoclonal anti-calbindin D-28k (1: 500, Cloud Clone Corp., China), chicken polyclonal anti-GFAP антителами (1: 1000, Abcam, UK), rabbit polyclonal anti-S100b (1: 1000, Abcam, UK), rabbit polyclonal anti-EAAT1 (1: 500, Abcam, UK), rabbit polyclonal anti-Flag (1: 500, Cloud Clone Corp., China) и rabbit polyclonal anti-EAAT2 (1: 500, Abcam, UK). Вторичными антителами являлись конъюгированные с Alexa Fluor 514 donkey anti-rabbit IgG (1:1,000, Life Technologies), Alexa Fluor 647 donkey anti-chicken IgG (1:1,000, Life Technologies), и Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (1:1,000, Life Technologies).. Антитела растворяли в растворе PBS, содержащем 2% (об. / Об.) donkey serum, 0,1% (об. / Об.) Triton X-100 и 0,05% NaN₃.

2.6 Конфокальная микроскопия и морфометрический анализ:

Во всех группах для сравнения использовали 6 и 7 доли мозжечка червеобразного отростка. Флуоресцентные изображения получали с использованием конфокального микроскопа FV10i (Olympus, Япония). Изображения были записаны в виде Z-стеков с использованием объектива x10 и разрешения 1024x1024. Для оценки двойной маркировки сравнивались изображения из одной и той же конфокальной плоскости. Толщину и количество отростков глии Бергмана измеряли на конфокальных изображениях сагиттальных срезов мозжечка. Количество радиальных глиальных отростков молекулярного слоя подсчитывали на 100 мкм. Процессы в глии Бергмана анализировали с использованием профилей интенсивности линии 100 мкм, проведенной поперек слоя, где каждый глиальный процесс проявлялся как пик флуоресценции GFAP / Alexa 647. Обнаружение среза сигнала GFAP было установлено равным 30% максимальной интенсивности флуоресценции. Приблизительную длину дендритов клеток Пуркинье оценивали по общей толщине молекулярного слоя, визуализированной с использованием окрашивания anti-calbindin/Alexa 488.

2.7 Рота род:

Через 9 недель после введения LVV животным был проведен поведенческий тест на координацию. Мыши с PBS, с нормальным атаксином-1 и с мутантным атаксином-1 помещались на вращающуюся дорожку, которая за 3,5 минут увеличивала обороты до 30 об/мин и затем была стабильна до 5 минуты. Эксперимент проводился в течение 4 дней.

2.8 Статистический анализ:

Все получаемые результаты с нескольких клеток усреднялись и статистически обрабатывались. Результаты выражаются как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ различий был определен непарным t-критерием Стьюдента, точным тестом Фишера, дисперсионным анализом. Различия считались значимыми, если $P < 0,05$.

3 Результаты

3.1 Проведение поведенческого теста:

Через 9 недель после введения LVV животным был проведён поведенческий тест на координацию (выявление атаксии), (рис.1).

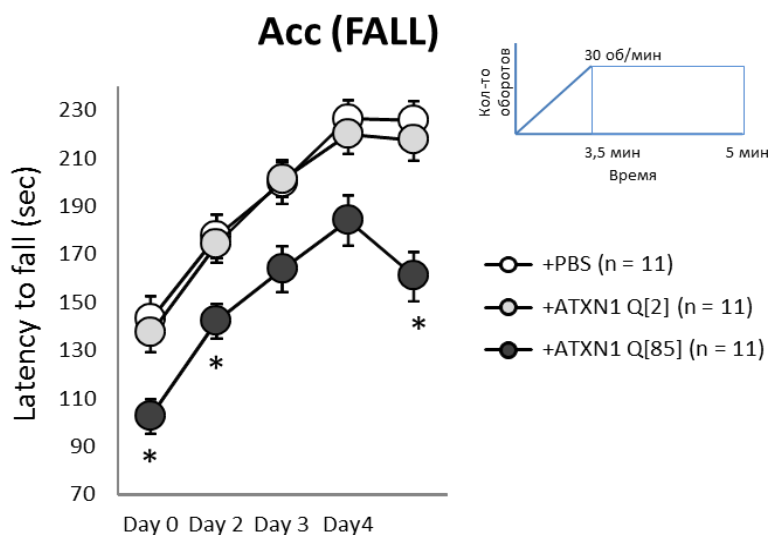


Рисунок – 1 График времени нахождения мышей на вращающейся дорожке.

3.2 Исследование транссинаптической передачи:

При исследовании переживающих срезов были выявлены явления нейродегенерации - уменьшения ёмкости клеток Пуркинье без влияния на другие электрофизиологические параметры клеток.

Group	Capacitance (pF)	Ra (MΩ)	Rm (MΩ)	PF EPSC amplitude (pA)	PPF	Rise time (ms)	Decay time (τ)
+PBS (n=14/5)	504,9±34,4	14,2±1,4	193,0±30,8	279,2±39,1	1,7±0,1	2,5±0,3	17,0±2,2
+GFAP-Flag-ATXN1[Q2] (n=15/5)	515,9±24,7	14,8±0,8	260,5±36,1	304,4±39,7	1,7±0,1	2,6±0,2	15,3±1,2
+GFAP-Flag-ATXN1[Q85] (n=16/4)	357,4±33,2	12,5±1,0	259,7±18,0	216,5±33,7	1,7±0,1	2,5±0,2	16,2±1,7
+GFAP-Flag-ATXN1[Q2] +GFAP-ChR2-mKate (n=9/3)	493,7±50,1	13,6±1,0	187,7±19,1	296,1±52,1	1,6±0,1	2,1±0,2	17,2±3,7
+GFAP-Flag-ATXN1[Q85] +GFAP-ChR2-mKate (n=8/3)	336,1±17,5	14,3±1,9	235,3±23,9	217,1±37,7	1,7±0,0	2,1±0,1	13,7±2,6

Рисунок – 2 Сводный график емкостных значений клеток мозжечка мышей с PBS, экспрессирующего GFAP - ATXN1[Q2] - Flag, экспрессирующего GFAP - ATXN1[Q85] - Flag.

Сделаны микрофотографии среза мозжечка мыши (рис.3). Экспрессия Flag в астроцитах.

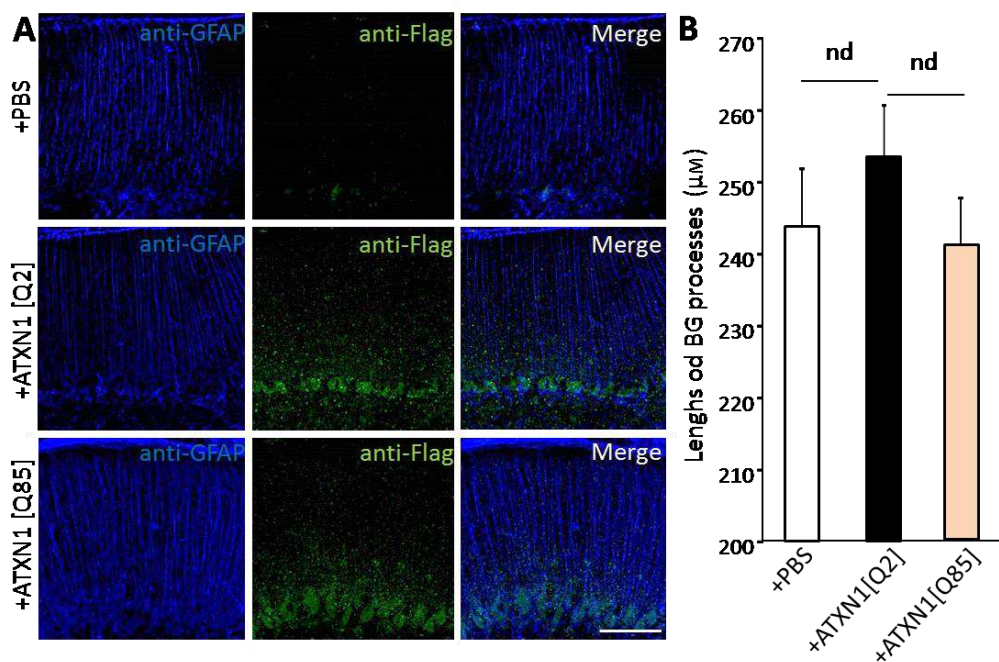


Рисунок – 3 Микрофотография среза мозжечка мыши с PBS (A), экспрессирующего GFAP - ATXN1[Q2] - Flag (B), экспрессирующего GFAP - ATXN1[Q85] - Flag (C). Зеленый цвет – ИГХ окраска FLAG, синий цвет – ИГХ окраска GFAP. Мерная шкала 100μм. Морфология клеток не меняется, изменяется их качество (D).

Нарушение синаптической передачи в глии Бергмана (рис.4). Для измерения времени удаления нейромедиатора из синаптической щели был зафиксирован (исключен) такой параметр, как емкость клеток. В группах с нормальным атаксином-1 и мутантным атаксином-1 были отобраны клетки приблизительно одинакового размера. Время удаления нейромедиатора из синаптической щели в двух группах стало различаться.

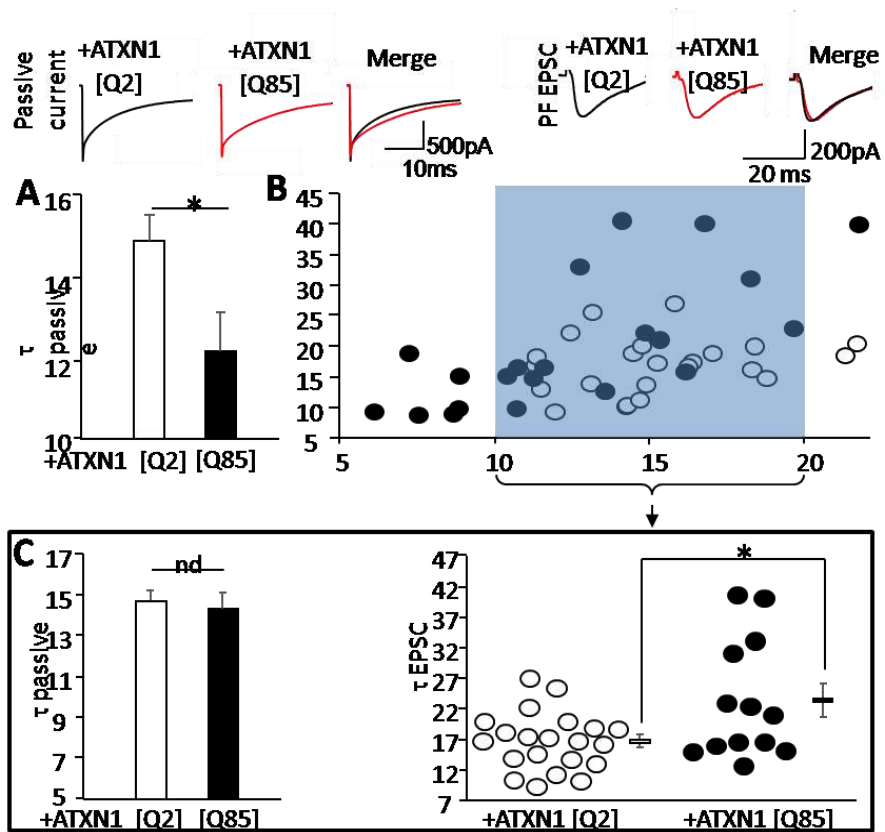


Рисунок – 4 (А) График усредненных данных τ ПВ-ВПСТ. (В) Отбор клеток одинакового размера с активными свойствами. (С) Усредненные данные τ ПВ-ВПСТ отобранных клеток.

Мутантный атаксин-1 в клетках мозжечка мышей с СЦА1 К1 влияет на синаптическую передачу клеток Пуркинье параллельных волокон (рис.5).

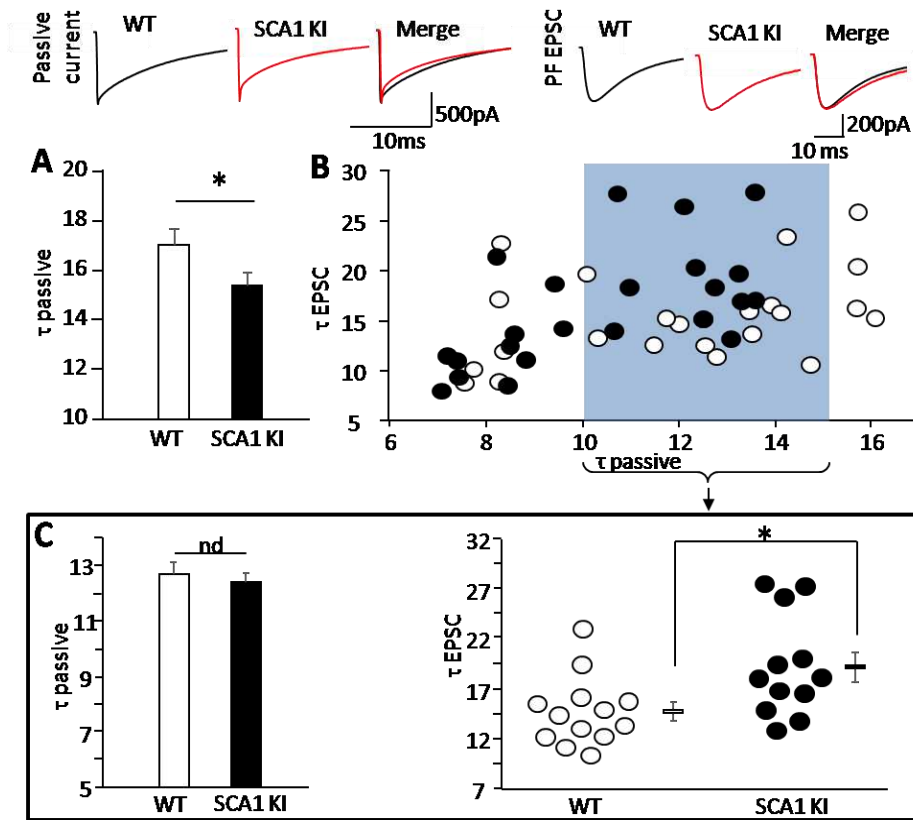


Рисунок – 5 (А) График усредненных данных τ ПВ-ВПСТ. (В) Отбор клеток одинакового размера с активными свойствами. (С) Усредненные данные τ ПВ-ВПСТ отобранных клеток.

Мутантный Атаксин-1 уменьшает экспрессию EAAT1 (рис.6).

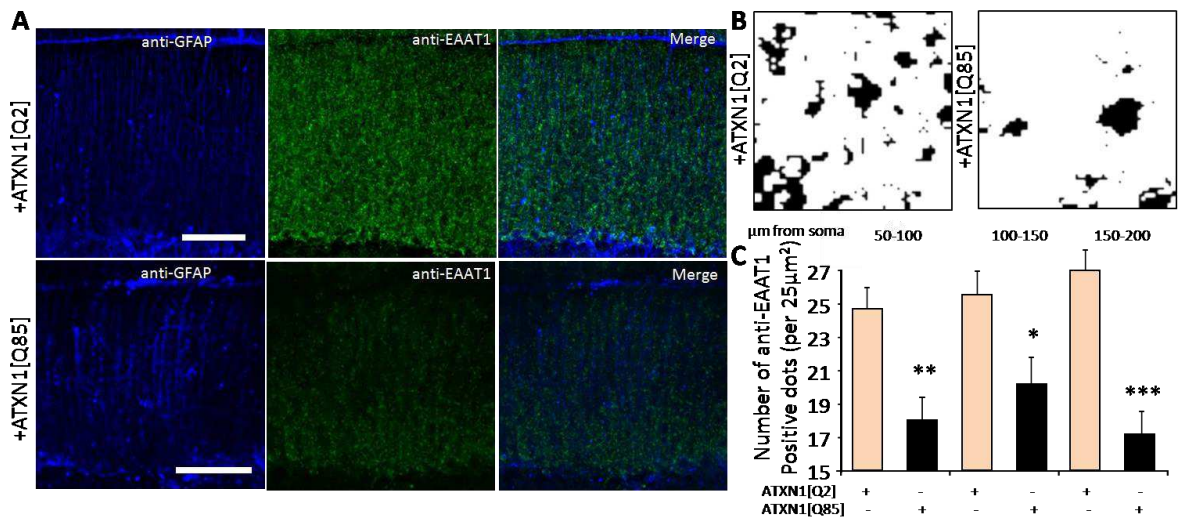


Рисунок – 6 (А) Конфокальное изображение среза мозжечка мыши, экспрессирующего EAAT1. (В) Черно-белое изображение положительных пятен EAAT1. (С) Количество EAAT1 положительных пятен на 25 μm^2 в моделях мышей с нормальным и мутантным атаксином-1.

ВЫВОДЫ

- 1) Создание модели СЦА1 с селективным поражением глии Бергмана коры мозжечка.
- 2) Локальная экспрессия мутантного Атаксина-1 в глии Бергмана глобально влияет на координацию движений.
- 3) Мутантный Атаксин-1 негативно влияет на морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье.
- 4) Экспрессия мутантного Атаксина-1 в глии Бергмана вызывает уменьшение экспрессии EAAT1, что приводит к нарушению обратного захвата нейромедиатора в синапсах ПВ-КП и к эксайтотоксичности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В данной работе применены следующие сокращения:

ChR2 – каналородопсин-2

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

CPE – цитопатический эффект

LVV – лентивирусный вектор

WT CD11 – мышцы дикого типа линии CD11

AMPA- рецептор – рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

NMDA - рецептор – N-метил-D-аспартатный рецептор

EAAT – возбуждающий аминокислотный транспортер

VGLUT – везикулярный транспортер глутамата

ATXN1 – атаксин 1

СЦА – спиноцеребеллярная атаксия

ВПСТ – возбуждающие постсинаптические токи

ПВ – параллельное волокно

ЛВ – лиановидное волокно

ЦНС – центральная нервная система

ИГХ – иммуногистохимия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Электронный ресурс, режим доступа: <https://www.svf.u.ru/universitet/innovatsii/malye-innovatsionnye-predpriyatiya/llc-genodiagnostika/yakut-hereditary-diseases/spinotserebellaryarnaya-ataxia-type-1/>
2. Дембицкая Ю.В., Лебедева А.В., Тюрикова О. В., Семьянов А.В. МЕТОДИКА РЕГИСТРАЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МЕТОДОМ «ПАТЧ-КЛАМП». Учебно-методическое пособие /Нижний Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета, 2012. – 27с. Электронный ресурс, режим доступа: http://www.ion.unn.ru/docs/Patch_clamp.docx
3. Дж. Дудел, И. Рюэгг, Р. Шмидт, В. Яниг. Физиология человека : В 4-х томах. Т.1. Пер. с англ./Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса.- М.: Мир, 1985.- 272 с.
4. Блум Ф., Лейзерсон А., Хофстедтер Л. Мозг, разум и поведение : Пер. с англ. – М.: Мир, 1988.- 248 с.
5. Enhanced neuronal excitability in the absence of neurodegeneration induces cerebellar ataxia. Shakkottai V.G., Chou C.H., Oddo S., Sailer C.A., Knaus H.G., Gutman G.A. 2004 г., J Clin Invest., стр. 582–590, режим доступа: <https://www.jci.org/articles/view/20216>
6. Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц. Современная биохимия в схемах: Пер. с англ. С.М. Аваевой, А.А. Байкова.- М.: Мир, 1981-216 с.
7. Электронный ресурс, режим доступа: <https://laesus-deliro.livejournal.com/188434.html>
8. Michael V. Sofroniew. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787735/>
9. R.K. Tannenberг, P.R. Dodd, CELL DAMAGE/EXCITOTOXICITY | Excitotoxicity and Neurodegenerative Disease, Encyclopedia of Basic Epilepsy Research, 2009, Pages 114–119, режим доступа: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739612000692>
10. Claire J. Williams, David T. Dexter, Neuroprotective and symptomatic effects of targeting group III mGlu receptors in neurodegenerative disease, J.Neurochem.(2014) 129, 4-20, режим доступа: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jnc.12608>
11. Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binvignat O, Auladell C, Camins A, Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications, J Psychopharmacol. 2018

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29444621>

12. Cellular and Molecular Pathways Triggering Neurodegeneration in the Spinocerebellar Ataxias. Matilla-Duenas A., Sanchez I., Corral-Juan M., Davalos A., Alvarez R., Latorre P. 2010 г., Cerebellum., стр. 148–166, режим доступа: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12311-009-0144-2>
13. Anna Maria Colangelo, Lilia Alberghinaa, Michele Papab. Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases, режим доступа: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030439401400041X>
14. Milos Pekny, Marcela Pekna. ASTROCYTE REACTIVITY AND REACTIVE ASTROGLIOSIS: COSTS AND BENEFITS, *Physiol Rev* 94: 1077–1098, 2014 doi:10.1152/physrev.00041.2013, режим доступа: <http://physrev.physiology.org/content/physrev/94/4/1077.full.pdf>
15. Skinner PJ, Koshy BT, Cummings CJ, Klement IA, Helin K, Servadio A, Zoghbi HY, Orr HT. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353120>
16. Cvetanovic, M.; Ingram, M.; Orr, H.; Opal, P. Early activation of microglia and astrocytes in mouse models of spinocerebellar ataxia type 1. *Neuroscience* 2015, 289, 289–299, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.003, режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25595967/>

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк
В.А. Кратасюк
« 22 » июня 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Нейрон-астроцитарные взаимодействия в моделях нейродегенерации,
вызванные экспрессией мутантного Атаксина-1

06.04.01 Биология
06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель	<i>Шуваев</i>	канд. мед. наук	А. Н. Шуваев	18.06.20
Выпускник	<i>Яковлева</i>		Д.А. Яковлева	18.06.20
Рецензент	<i>Моргун</i>	д-р мед. наук	А. В. Моргун	18.06.20

Красноярск 2020