

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ В НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ КОНТАКТАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ВЫЗВАННЫЕ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *APP* ЧЕЛОВЕКА

© С. В. Саранцева,¹ Г. А. Кислик,¹ Н. А. Ткаченко,¹ А. Н. Васильев,³ А. Л. Шварцман^{1, 2}

¹ ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова, Гатчина, Ленинградская обл.;

² Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург,

и ³ С.-Петербургский государственный университет;

¹ электронный адрес: svesar1@yandex.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей синапсов в коре и гиппокампе, которое предшествует амилоидозу и нейродегенерации и коррелирует с нарушением памяти в ранней клинической фазе заболевания. Мутации в гене предшественника амилоида (*APP*) вызывают семейную форму БА и приводят к усилению секреции амилоид-бета-протеина (Аβ). С целью понять роль белка *APP* в синаптических нарушениях, наблюдаемых при болезни Альцгеймера, *APP* дикого типа и его мутантную форму *APP-Swedish*, вызывающую семейную форму БА, и бета-секретазу экспрессировали в моторных нейронах личинок *Drosophila melanogaster*. Показано, что экспрессия *APP* (*APP-Swedish*) приводит к значительным морфологическим и функциональным изменениям в нейромышечных соединениях, вызывая разрастание аксонов и увеличение количества синаптических бутонов, нарушение экзоцитоза синаптических везикул (выявляемое при помощи красителя FM4-64), а также уменьшение числа митохондрий в пресинаптических терминалах. При этом выраженные синаптические нарушения наблюдались как при экспрессии *APP* (или *APP-Swedish*), так и в двойных трансгенах при совместной экспрессии *APP* (или *APP-Swedish*) и бета-секретазы человека (*BA-SE*), приводящей к секреции амилоид-бета-протеина (Аβ). Предполагается, что *APP* участвует в регуляции синаптических функций и что его повышенная экспрессия приводит к синаптической патологии независимо от нейротоксических эффектов Аβ.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, *APP*, нейромышечные соединения, *Drosophila melanogaster*.

Принятые сокращения: БА — болезнь Альцгеймера, Аβ — амилоид-β-протеин, НМК — нейромышечные контакты, *APP* — β-Amyloid Precursor Protein (белок, предшественник амилоид-β-протеина), GFP — зеленый флуоресцентный белок.

Основные нейропатологические характеристики болезни Альцгеймера (БА) связаны с накоплением в мозге больших экстраклеточных фибриллярных агрегатов короткого пептида (40—42 аминокислоты), получившего название амилоид-бета-протеин (Аβ), и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, содержащих гиперфосфорилированный тау-протеин (Hardy, Selkoe, 2002).

Аβ является продуктом протеолитического процесса интегрального мембранного белка *APP* (белок-предшественник Аβ) (Selko, 2001; Anaert, De Strooper 2002). Согласно гипотезе «амилоидного каскада» (Hardy, Selkoe, 2002), избыточное образование нейротоксичных форм Аβ запускает всю цепочку патологических изменений при БА. Между тем в ранней клинической фазе заболевания нарушение памяти предшествует амилоидозу, нейрофибриллярной дегенерации, гибели нейронов и коррелирует лишь с дисфункцией синапсов (Masliach et al., 1994) — единственным патоморфологическим признаком, обнаруживающим высокую корреляцию со степенью деменции (Terry et al., 1991; Masliach et al., 1994). Тем не менее механизм потери синапсов при БА до настоящего

времени остается неясным. В большинстве работ повышенная секреция Аβ или Аβ-олигомеров предполагается главной причиной дисфункции синапсов (Walsh, Selkoe, 2004).

Одним из основных экспериментальных подходов в изучении нейродегенеративных заболеваний в настоящее время является моделирование патогенеза этих заболеваний на трансгенных животных. Именно анализ результатов, полученных на трансгенных животных, показывает, что ситуация с дисфункцией синапсов представляется более сложной, чем возможный прямой эффект Аβ-олигомеров. Так, сравнение различных трансгенных линий мышей, различающихся уровнем экспрессии *APP*, показало, что содержание пресинаптических белков в нейронах не коррелирует с содержанием амилоидных бляшек (Mucke et al., 2000). В то же время у мышей с нокаутом или нокаудом гена *APP* наблюдали дисфункцию синапсов и нарушение когнитивных функций, характерных для БА (Seabrook et al., 1999; Senechal et al., 2006). Эти данные дают возможность предположить, что первичный эффект мутаций в *APP* при семейных формах БА может быть связан с

нарушением синаптической функции, в которой этот белок играет ключевую роль (Togroja et al., 1999b).

Drosophila melanogaster является удобным модельным организмом для анализа молекулярных механизмов, лежащих в основе нейродегенеративных заболеваний, в частности БА (Bonini, Fortini, 2003). Одним из преимуществ *Drosophila* при изучении БА является возможность дискриминировать в трансгенных линиях эффекты Аβ и его белка-предшественника APP. В протеолитический процессинг APP вовлечены три секретазы — альфа, бета и гамма. В результате действия гамма- и бета-секретазы образуется Аβ. У *Drosophila* представлены наряду с альфа-секретазой все компоненты гамма-секретазного комплекса, однако нет активности бета-секретазы, а ген *Appl*, ортолог гена *APP* человека у *Drosophila*, не содержит последовательности Аβ. Следовательно, только совместная экспрессия генов *APP* и бета-секретазы (*BACE*) человека в *Drosophila* приводит к образованию Аβ.

Ранее мы показали, что экспрессия гена *APP* дикого типа и его мутантной формы *APP-Swedish* (*APP695* человека с заменами 670K3N и 671M3L) в нервных клетках *Drosophila* вызывает эффекты, наблюдаемые при БА: накопление Аβ-агрегатов, нейродегенерацию, снижение содержания в мозге пресинаптических белков синаптогамина и синаптобревина, нарушения обучения и памяти (Sarantseva et al., 2009).

Для понимания клеточных механизмов, лежащих в основе этих эффектов, в настоящей работе проведен анализ морфологического и функционального состояния нейромышечных контактов (НМК) личинок *Drosophila* при экспрессии *APP* или *APP-Swedish*, а также при совместной экспрессии *APP* (или *APP-Swedish*) и *BACE* человека. Показано, что экспрессия *APP* вызывает разрастание аксонов и увеличение количества синаптических бутонов, нарушение экзоцитоза синаптических везикул в нейромышечных соединениях личинок, а также уменьшение числа митохондрий в пресинаптических терминалах.

Материал и методика

В работе использовали следующие линии *Drosophila melanogaster*. 1. Трансгенные линии: *UAS-APP*, несет ген *APP* человека (далее в тексте *APP*); *UAS-APP-Swedish*, несет ген *APP* человека с мутацией *Swedish*, приводящей к наследственной форме БА (далее в тексте *APP-Sw*); *UAS-BACE*, несет ген *BACE* человека (далее в тексте *BACE*). Экспрессию трансгенов проводили в моторных нейронах личинок *Drosophila* 3-го возраста с использованием тканеспецифического активатора транскрипции *elav-GAL4-D42*. 2. Линию *UAS-CD8-GFP*; *GAL4-D42* (далее в тексте *CD8;D42*), экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок GFP в мембране нервных клеток, использовали для визуализации и изучения морфологии нейромышечных соединений *D. melanogaster*. 3. Линию *UAS-n-syb-GFP*, несущую вставку гена синаптобревина и последовательность GFP, использовали для анализа функционирования сателлитных бутонов. 4. Линию *UAS-mito-GFP/GAL4-D42* (далее в тексте *mito/D42*), экспрессирующую GFP в мембране митохондрий, использовали для визуализации и количественного анализа митохондрий в нейромышечных соединениях. Линии *D. melanogaster* получены из коллекции *Drosophila* Bloomington Stock Center (США). Во время проведения экспериментов мух содер-

жали на стандартной дрожжевой среде при 25 °С и 12-часовом световом дне.

Приготовление препаратов и анализ морфологии нейромышечных соединений. Диссекцию личинок 3-го возраста проводили в свежеприготовленном растворе HL3 (110 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ NaHCO₃, 5 мМ HEPES, 30 мМ сахарозы, 5 мМ трегалозы и 10 мМ MgCl₂, pH 7.2; Budnik, Ruiz-Canada, 2006). Далее проводили фиксацию в 4%-ном формальдегиде (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин и после промывки в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) заключали препарат в смесь PBS и глицерина (1 : 1). Анализ проводили с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS-SP5 (Leica, Германия). Количество бутонов и ветвлений аксона, длину нейромышечного соединения определяли с помощью программ ImageJ и LAS AF Lite (Leica, Германия). Анализировали 5—6 личинок каждого генотипа. Опыт проводили в трех повторностях.

Для анализа эндо- и экзоцитоза в нейромышечных соединениях использовали краситель FM4-64. Проводили диссекцию личинок в растворе HL3. Далее препараты инкубировали в течение 5 мин в растворе HL3, содержащем 90 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂ и 10 мкМ флуоресцентного красителя FM4-64 (Molecular Probes, США). Препараты промывали в среде HL3 без Ca²⁺ 3 раза по 10 мин и анализировали с помощью конфокальной микроскопии (микроскоп Leica TCS-SP5). Толщина конфокального среза составляла 0.3 мкм. Далее препараты инкубировали 1 мин в растворе HL3 без красителя, содержащем 90 мМ KCl и 1.8 мМ CaCl₂. Препараты промывали в среде HL3 без Ca²⁺ 3 раза по 10 мин и анализировали при помощи конфокальной микроскопии. Интенсивность флуоресценции красителя определяли с помощью программы ImageJ. Все полученные значения флуоресценции нормировали по отношению к контролю. Препараты анализировали при длине волны 543 нм. Анализировали 5 личинок каждого генотипа. Опыт проводили в трех повторностях.

Иммуногистохимия. Диссекцию личинок 3-го возраста проводили в свежеприготовленном растворе HL3, фиксировали в 4%-ном формальдегиде (Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре в течение 20 мин. Препараты инкубировали сначала с первичными антителами 4G8 (Sigma-Aldrich, США), специфичными к Аβ, в течение ночи при 4 °С, далее в течение 2 ч при комнатной температуре с вторичными антителами, меченными FITC (Santa Cruz Biotechnology, США). Препараты заключали в смесь PBS и глицерина (1 : 1). Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Leica MD2500 (Leica, Германия).

Анализ митохондрий. После диссекции личинок в растворе HL3 с последующей фиксацией в 4%-ном параформальдегиде в течение 15 мин препараты анализировали с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS-SP5 (Leica, Германия). Относительную флуоресценцию определяли при обработке фотографий серии конфокальных срезов с помощью программы LAS AF Lite. Препараты анализировали при длине волны 488 нм. Анализировали 5—6 личинок каждого генотипа. Опыт проводили в трех повторностях.

Статистическая обработка. Достоверность различий между контролем и вариантами эксперимента определяли с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Тью-

ки—Крамера (Tukey—Kramer test) программы Kurplot. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$.

Результаты

Иммуногистохимическую локализацию Аβ в нейромышечных соединениях проводили с помощью антител 4G8, специфичных к Аβ, в линиях, экспрессирующих трансгены в моторных нейронах личинок 3-го возраста. Флуоресцентный сигнал детектировался только в НМК личинок с одновременной экспрессией *APP* или *APP-Swedish* и *BACE* (рис. 1, б, д) и не наблюдался в линиях с экспрессией только *APP* или *APP-Swedish* (рис. 1, а, в).

Для определения влияния экспрессии *APP* на морфологию и структуру НМК мы использовали трансгенную линию *CD8;D42*, у которой мембраны моторных нейронов мечены GFP. У потомков от скрещиваний этой линии и линий с экспрессией *APP* (*APP*, *APP-Sw*, *APP/BACE* и *BACE;APP-Sw*) с помощью конфокальной микроскопии были проанализированы НМК на 4-й мышце 3-го абдоминального сегмента личинки (терминологию см.: Budnik, Ruiz-Canada, 2006). Каждая мышца личинки *D. melanogaster* иннервируется мотонейронами с двумя видами синаптических окончаний, обозначаемых как 1b (большие, диаметром 3—5 мкм) и 1s (маленькие, диаметром 1—1.5 мкм), которые соответствуют определенным типам моторных нейронов в мозге личинки (рис. 2, а) (Budnik, Ruiz-Canada, 2006).

Анализ показал, что все НМК, представленные в контрольной линии на 4-й мышце 3-го абдоминального сегмента представлены и в линиях с экспрессией *APP*, что указывает на отсутствие нейродегенерации. Подсчет общего количества синаптических бутонов в НМК выявил увеличение числа бутонов примерно в 2 раза в линиях *APP* и *APP/BACE* по сравнению с контрольной линией (рис. 2, а—в, е). В линиях с экспрессией мутантной формы *APP-Sw* и *BACE; APP-Sw*, хотя и наблюдалось увеличение общего числа бутонов, оно не носило статистически достоверного характера по сравнению с контрольной линией (рис. 2, а, г—е). Количество 1s- и 1b-бутонов в линиях с экспрессией *APP* не отличалось от их количества в контроле, исключая линию с экспрессией полноразмерного *APP* дикого типа (рис. 2, ж). Однако во всех линиях, экспрессирующих *APP*, было выявлено увеличение количества сателлитных бутонов (рис. 2, з). К сателлитным относят бутоны, которые отпочковываются как от уже сформировавшихся бутонов, так и от самой межбутоновой аксонной связки, соединяющей два соседних бутона (рис. 2, б—д) (Torroja et al., 1999b). Следует отметить, что если синаптические бутоны личинок контрольной линии представляли собой образования округлой формы с четкими границами, то в линиях с экспрессией *APP* они имели расплывчатую форму.

Экспрессия *APP* в моторных нейронах также вызывала ветвление аксонов (рис. 2, б—д). Наибольшее количество ответвлений и наибольшую длину нейромышечных соединений наблюдали в линиях *APP* и *APP/BACE*. Интересно, что в линиях *APP-Sw* и *BACE; APP-Sw* эти показатели не отличались от таковых в контрольной линии (рис. 2, и, к). Полученные нами результаты анализа количества бутонов в линии с экспрессией только *APP* согласуются с результатами более ранней работы (Torroja et al.,

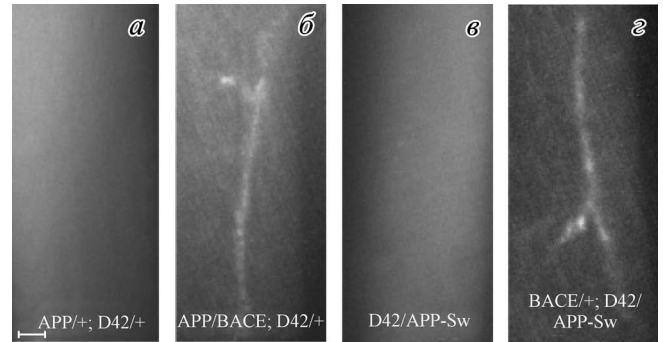


Рис. 1. Иммунофлуоресцентная локализация амилоида-β-протеина (Аβ) в нейромышечных контактах личинок *Drosophila melanogaster* (а—д).

Световая микроскопия, масштабная линейка — 10 мкм.

1999b), в которой, однако, не определяли количества 1s- и 1b-бутонов и ветвление аксонов.

Мы исследовали распределение в НМК пресинаптического маркера синаптобревина, меченного GFP (*n-syaptobrevin-GFP*; Zhang et al., 2002). Как показано на рис. 3, синаптобревин в контрольной линии локализован внутри синаптических бутонов. Важно отметить, что эти бутоны обособлены и отделены друг от друга, создают картину нанизанного на веревку бисера. Такая картина распределения пресинаптических белков является типичной для нейромышечных соединений *Drosophila* и показывает, что белки синаптических везикул обычно отсутствуют в регионах, соединяющих два соседних бутона (Budnik, Ruiz-Canada, 2006). Иную картину мы наблюдали в линиях, экспрессирующих *APP*, в которых бусиноподобная форма НМК была разрушена (рис. 3). По своему виду НМК больше напоминали канаты (рис. 3). В этих линиях синаптобревин также детектировался (помимо синаптических бутонов) в экстраинаптических регионах между индивидуальными бутонами. Наблюдаемое перераспределение синаптобревина может быть следствием дефектов в развитии синапсов, которые мы описывали выше. Нарушение распределения синаптобревина сопровождалось значительным уменьшением относительного количества этого белка в бутонах, которое мы оценивали по интенсивности флуоресцентного сигнала (данные не представлены).

Влияние экспрессии *APP* на функционирование синапсов мы изучили с помощью флуоресцентного красителя FM4-64, позволяющего анализировать синаптический эндо- и экзоцитоз (Verstreken et al., 2008). FM4-64 практически не флуоресцирует в водных растворах, однако его флуоресценция увеличивается более чем в 40 раз при связывании красителя с пресинаптической мембраной, и во время эндоцитоза краситель оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загрузка»). При загрузке красителя появляются светящиеся пятна, отражающие скопления меченных FM4-64 везикул в области активных зон. Однако связывание красителя носит обратимый характер, и возможно проведение обратного процесса — экзоцитоза («разгрузка»).

В линии дикого типа после 5-минутной стимуляции в растворе с содержанием 90 мМ K^+ в присутствии красителя в пресинаптических терминалях наблюдается высокий уровень красителя, что указывает на высокий уровень эндоцитоза FM4-64 (рис. 4, а, е). Внутри синаптического бутона краситель локализовался по периферии бутона,

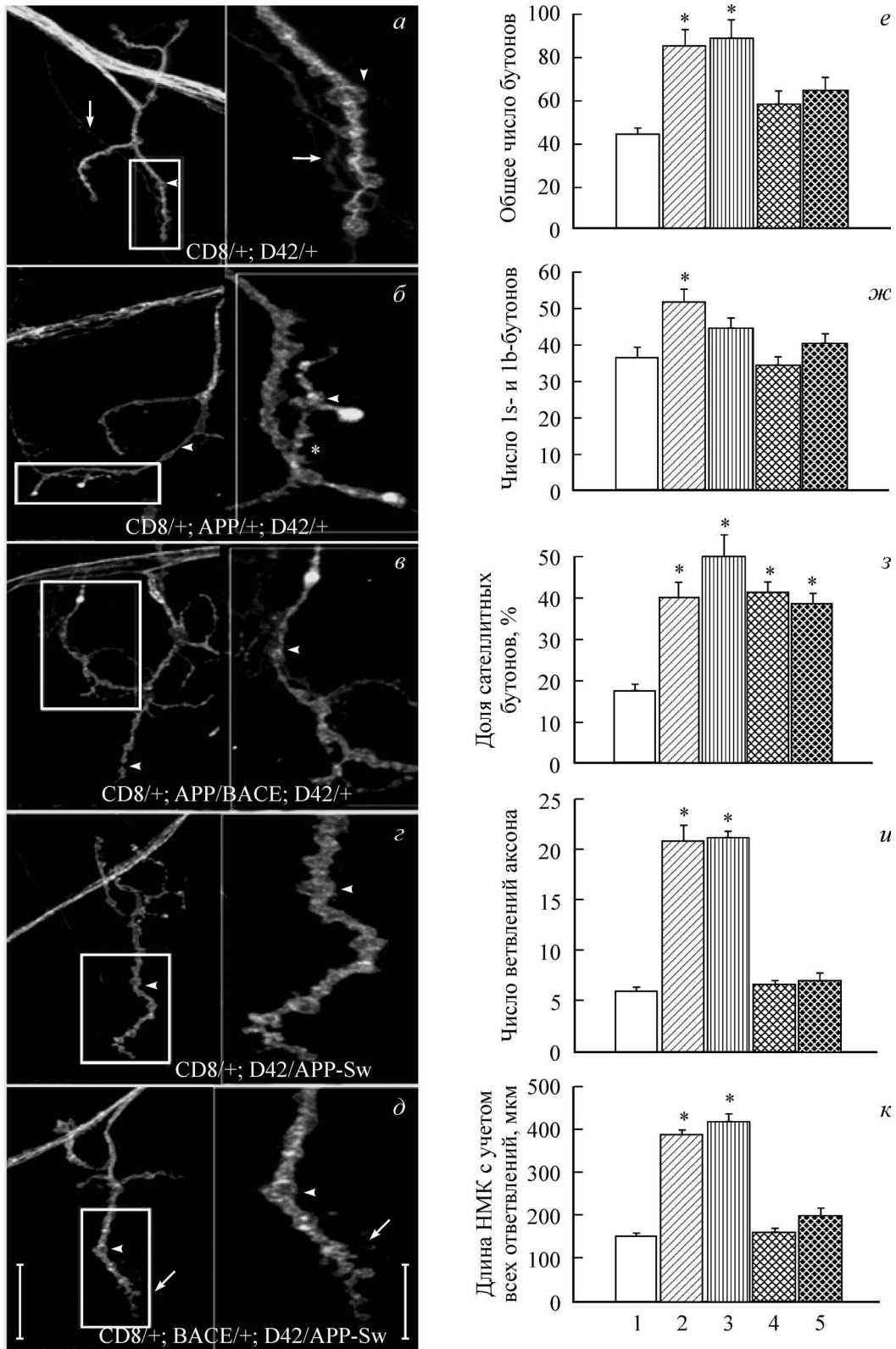


Рис. 2. Анализ морфологии нейромусcularных соединений личинок *Drosophila melanogaster* с экспрессией APP.

a-d — нейромусcularные соединения на 4-й мышце 3-го абдоминального сегмента. Внизу фотографий указаны генотипы линий. Выделенные белым прямоугольником сегменты НМК на фотографиях левого столбца представлены в увеличенном изображении на фотографиях правого столбца. Стрелка указывает на 1s-бутоны, головка стрелки — на 1b-бутоны; звездочкой отмечены сателлитные бутоны. Конфокальная микроскопия; масштабные линейки: 25 (левый столбец фотографий) и 10 (правый столбец) мкм. *e-k* — количественный анализ морфологии нейромусcularных контактов. По оси абсцисс — генотипы линий: 1 — CD8/+; D42/+, 2 — CD8/+; APP/+; D42/+, 3 — CD8/+; APP/BACE; D42/+, 4 — CD8/+; D42/APP-Sw, 5 — CD8/+; BACE/+; D42/APP/Sw. НМК — нейромусcularный контакт. Звездочкой отмечены статистически значимые результаты ($P < 0.05$).

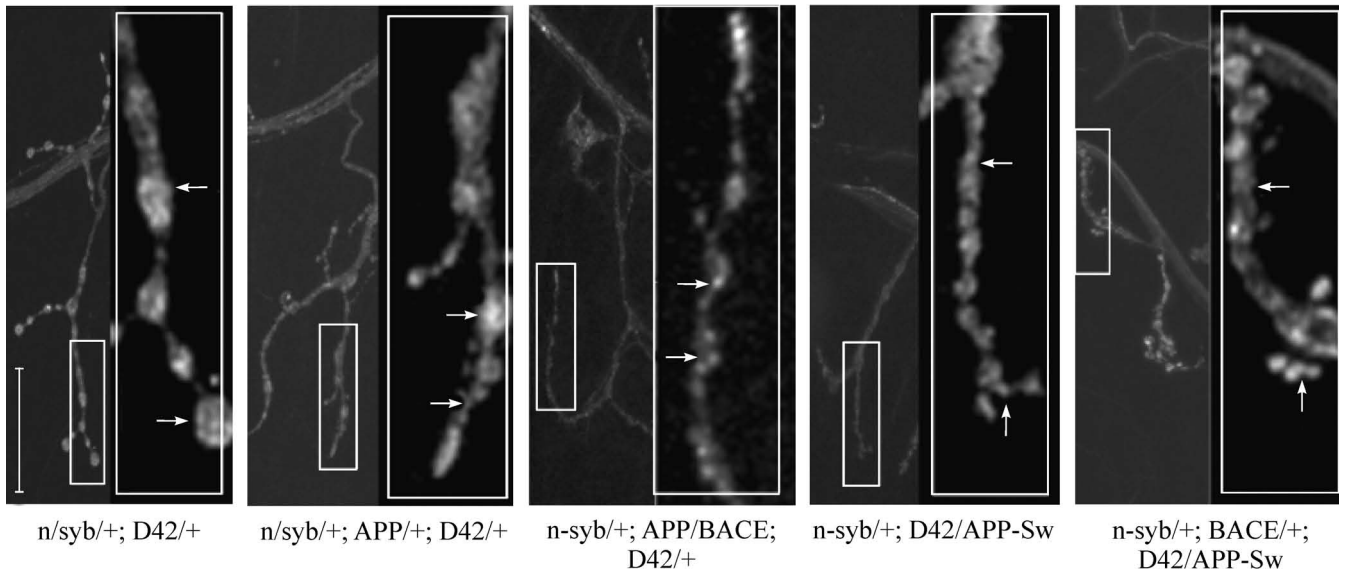


Рис. 3. Распределения синаптобревина в НМК личинок *Drosophila melanogaster* с экспрессией *APP*.

Выделенные белым прямоугольником сегменты НМК представлены рядом в увеличенном изображении. Стрелки указывают на распределение синаптобревина. Конфокальная микроскопия, масштабные линейки: 25 и 8 мкм.

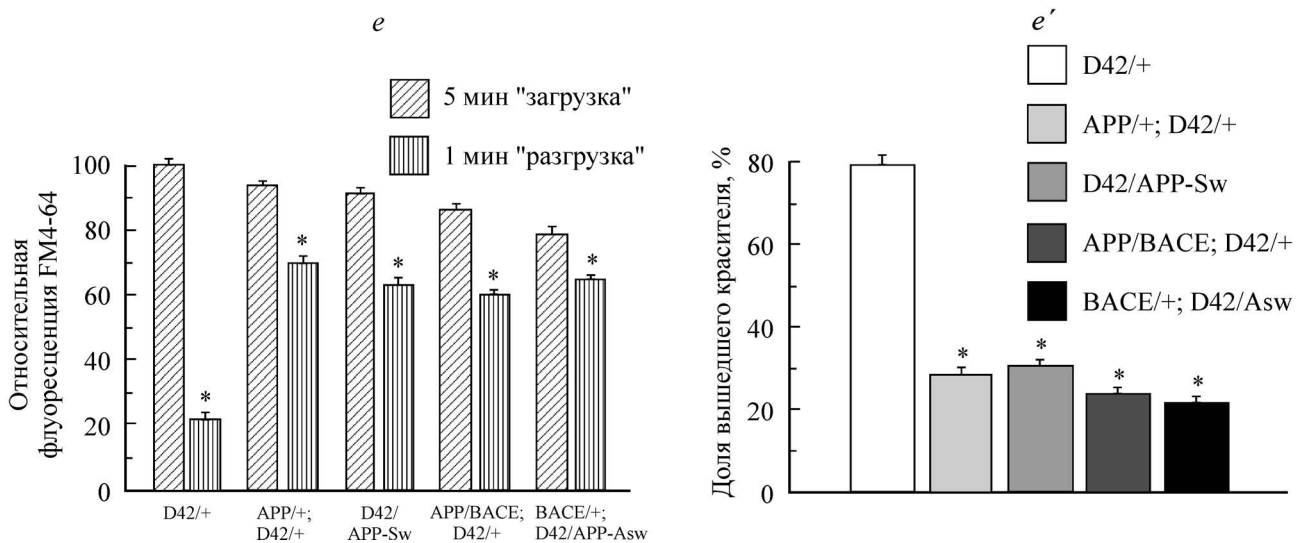
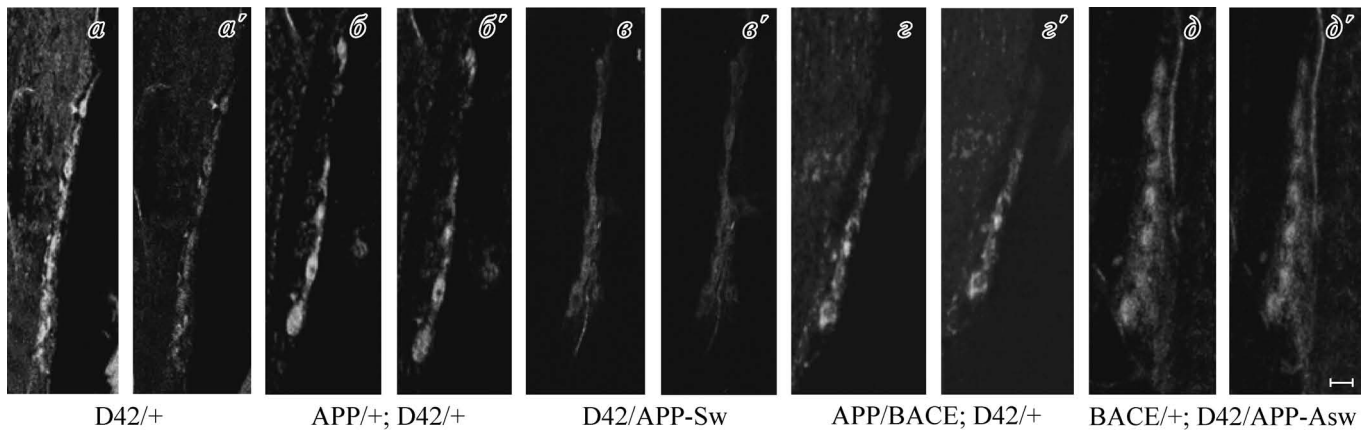


Рис. 4. Анализ эндо- и экзоцитоза в НМК личинок *Drosophila melanogaster* с экспрессией *APP*.

a—d — эндоцитоз, a'—d' — экзоцитоз. Конфокальная микроскопия, масштабная линейка: 25 мкм. e — относительный уровень флуоресценции в нейромышечных контактах при эндо- и экзоцитозе, e' — высвобождения красителя при экзоцитозе, %. Звездочкой отмечены статистически значимые результаты ($P < 0.05$).

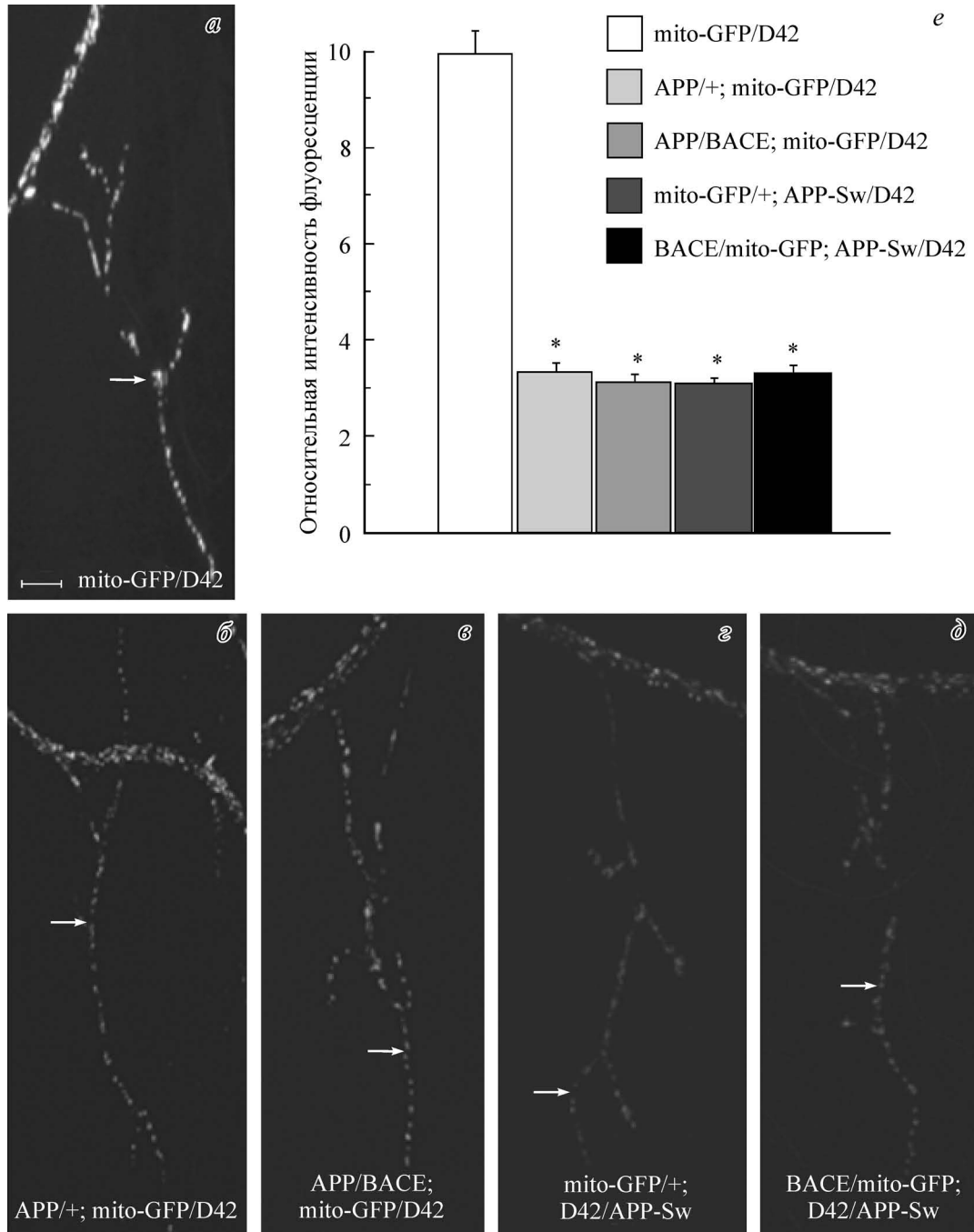


Рис. 5. Визуализация кластеров митохондрий НМК личинок *Drosophila melanogaster* с экспрессией *APP*.

a—d — нейромышечные соединения на 4-й мышце 3-го абдоминального сегмента. Стрелки указывают на кластеры митохондрий. Конфокальная микроскопия, масштабная линейка: 25 мкм. *e* — относительная интенсивность флуоресценции (ИФ). По оси абсцисс — генотипы линий: *mito-GFP/D42*, *APP/+; mito-GFP/D42*, *APP/BACE; mito-GFP/D42*, *mito-GFP/+; APP-Sw/D42*, *BACE/mito-GFP; APP-Sw/D42*. Звездочкой отмечены статистически значимые результаты ($P < 0.05$).

что соответствует пулу везикул, готовых к высвобождению медиатора (Kurogi, Kidokoro, 1998). Повторная 1-минутная стимуляция 90 mM K^+ без красителя, индуцирующая экзоцитоз, приводила к значительному уменьшению уровня красителя (рис. 4, *a'*, *e*). Анализ синаптических бутонов моторных нейронов личинок, экспрессирующих *APP*, показал, что интенсивность флуоресценции красителя и распределение красителя внутри бутона при эндоцитозе практически не отличались от контрольных образцов в линиях с экспрессией *APP* и *APP-Swedish* (рис. 4, *b*, *в*, *e*), в то время как образование $A\beta$ вызыва-

ло снижение эндоцитоза, хотя и незначительное (рис. 4, *г—e*).

Более драматическая ситуация наблюдалась при экзоцитозе (рис. 4, *б'—d'*). Так, если в синаптических окончаниях контрольной линии за 1 мин выгружалась большая часть красителя ($80 \pm 2.3\%$), то количество красителя, высвобождающегося из синаптических бутонов в линиях с экспрессией *APP* (*APP-Swedish*) или *APP* (*APP-Swedish*) и *BACE*, было значительно уменьшено (в линии *APP* — $28.4 \pm 1.7\%$, в *APP-Sw* — $30.0 \pm 2.2\%$, в *APP/BACE* — $23.6 \pm 1.9\%$, в *BACE; APP-Sw* — $21.6 \pm 1.6\%$) (рис. 4, *e'*).

Эти данные показывают, что хотя в линиях с экспрессией *APP* имеется достаточный запас готовых к экзоцитозу синаптических везикул, необходимо больше времени для их слияния с синаптической мембраной. Между линиями, экспрессирующими только *APP* или *APP-Swedish*, и линиями, в которых образовался Аβ (при совместной экспрессии *APP* и *BACE* или *APP-Swedish* и *BACE*), статистических различий выявлено не было.

Известно, что экспрессия *APP* или образование Аβ приводит к нарушению транспорта синаптических митохондрий *in vitro* и *in vivo* (Anandatheerthavarada, 2007). Поскольку митохондриальные функции являются критическими для нормальной синаптической трансмиссии, мы исследовали митохондрии в НМК. Для идентификации митохондрий использовали трансгенную линию *mito/D42*, у которой мембраны митохондрий мечены GFP. В контроле большие кластеры митохондрий представлены в каждом НМК (рис. 5, а), в то время как в линиях, экспрессирующих *APP*, размер кластеров резко уменьшен (рис. 5, б—д). Наряду с этим интенсивность свечения красителя резко снижена в этих линиях. Для количественной оценки мы измерили относительную интенсивность красителя, связанного с митохондриями, с помощью программы LAS AF Lite. В линиях, экспрессирующих *APP*, она была ниже, чем в контроле (рис. 5, е).

Обсуждение

Определение центральной роли гена *APP* в патогенезе БА основано на многочисленных экспериментах, демонстрирующих, что мутации в этом гене вызывают такое изменение процессинга белка *APP*, которое приводит к увеличению секреции Аβ₄₂, повышению скорости образования Аβ-олигомеров и протофибрилл, которые обладают выраженными нейротоксическими свойствами. Между тем вполне возможно, что дисфункция синапсов, по крайней мере при наследственных формах БА, вызванных мутациями в *APP*, может быть связана непосредственно с нарушением синаптической функции *APP*. Хотя в настоящее время клеточные функции *APP* остаются не вполне понятными, роль этого белка в образовании и поддержании синапсов не подвергается сомнению. При гиперэкспрессии *APP* человека в *Drosophila melanogaster* он транспортируется в пресинаптический терминал нейронов и постсинаптические участки НМК (Yagi et al., 2000). У мышей с нокаутом гена *APP* отмечены прогрессирующая потеря синаптических белков и уменьшение длины дендритов нейронов CA1 (Seabrook et al., 1999; Senchal et al., 2006). Трансгенные животные, экспрессирующие мутантный *APP*, характеризовались ранним нарушением синаптогенеза и аксонного транспорта (Oddo et al., 2003; Stokin et al., 2005).

В настоящей работе роль экспрессии *APP* в синаптогенезе исследовали на трансгенных линиях *D. melanogaster*, позволяющих дискриминировать эффекты экзогенного белка *APP* и непосредственно Аβ. Экспрессия *APP* или *APP-Swedish*, а также совместная экспрессия *APP* или *APP-Swedish* и *BACE* человека в моторных нейронах личинок приводили к морфологическим изменениям структуры НМК, нарушали оборот синаптических везикул, вызывали уменьшение числа митохондрий в пресинаптических терминалах. Эти эффекты не сопровождалась выраженной нейродегенерацией или гибелью нейронов. В то же время морфология НМК личинок, экспрессирую-

щих *APP*, значительно отличалась от морфологии НМК личинок контрольной линии *CD8;D42*. Изменения в морфологии характеризовались разрастанием аксонов и увеличением общего числа синаптических бутонов, в частности за счет образования сателлитных бутонов, что указывало на прямое участие *APP* в образовании НМК, росте и ветвлении аксонов, процессов, которые лежат в основе образования нейронных цепей и синаптических контактов. Увеличение образования сателлитных бутонов наблюдали и при экспрессии в нейронах гена *Appl*, ортолога *APP* у *Drosophila* (Torroja et al., 1999b). Экспрессия *APP* и *Appl* индуцировала также рост нейритов в культуре нейронов (Jin et al., 1994) и ветвление аксонов в мозге *Drosophila* при моделировании черепно-мозговой травмы (Leysen et al., 2005).

Анализ эндо(экзо)цитоза показал, что экспрессия *APP* также влияет и на функцию нейромышечных соединений. У синаптических бутонов НМК значительно снижена способность к экзоцитозу. Мы предполагаем, что экспрессия *APP* может приводить к разрушению аппарата экзо(эндо)цитоза, ведущему к нарушениям в организации синаптических белков, участвующих в регуляции этих процессов. Проведенный нами анализ экспрессии пресинаптического маркера синаптобревина, который входит в состав белкового комплекса SNARE (Budnik, Ruiz-Canada, 2006), осуществляющего слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной в ходе экзоцитоза, выявил его аномальное распределение в НМК линий, экспрессирующих *APP*. Следовательно, нарушение оборота синаптических везикул, наблюдаемое нами в НМК линий с экспрессией *APP*, может быть вызвано изменением локализации синаптических белков, в частности синаптобревина. Помимо этого, нарушения экзоцитоза могут быть вызваны снижением числа синаптических митохондрий, которое мы наблюдали в НМК личинок с экспрессией *APP*. Митохондрии играют важную роль в регулировании энергозависимых процессов синаптогенеза и поддержании уровня кальция (Zenisek, Matthews, 2000; Hollenbeck, 2005). Вполне вероятно, что уменьшение содержания синаптических митохондрий ведет к уменьшению синтеза АТФ, содержание которого может быть недостаточным для нормального осуществления синаптических функций.

В свою очередь уменьшение количества синаптобревина и синаптических митохондрий может быть следствием нарушения аксонного транспорта при БА (Torroja et al., 1999a; Gunawardena, Goldstein, 2001; Stokin et al., 2005; Rusu et al., 2007).

В большинстве работ, исследующих эффекты гиперэкспрессии *APP* в клеточных культурах или у трансгенных животных, нарушения синаптической функции трактуются как результат нейротоксического действия Аβ или Аβ-олигомеров и их агрегатов (Moechars et al., 1999; Walsh, Selkoe, 2004; Ting et al., 2007). Как было отмечено ранее, трансгенные линии *Drosophila* позволяют разделить эффекты белков *APP* и Аβ. Полученные нами результаты показывают, что наблюдаемые структурные и функциональные нарушения НМК обусловлены экспрессией именно гена *APP* независимо от секреции Аβ.

Хотя наши эксперименты проведены на трансгенных организмах, в литературе есть данные о том, что дупликация гена *APP* могут приводить к развитию БА (Rovelet-Lecrux et al., 2006; <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). Мы также наблюдали, что влияние экспрессии *APP-Swedish* у мутантной формы на синаптогенез было значительно слабее влияния экспрессии *APP* дикого типа.

Подобная картина описана и у трансгенных мышей при экспрессии *APP* дикого типа и мутантной формы *APP* с мутациями *Swedish* и *Indian* (Seeger, 2009). Эти данные дают возможность предположить, что мутации в *APP*, связанные с семейными формами БА, вызывают потерю или уменьшение синаптической активности белка APP.

Таким образом, мы показали, что ген *APP* играет важную роль в становлении и поддержании синаптических контактов. Изменение его экспрессии или мутации может приводить к дисфункции синапсов и вызывать синаптическую патологию при БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-04-00647-а и 10-04-00153-а), а также программы НИР СПбГУ № 1.37.118.2011.

Список литературы

- Anandatheerthavarada H. K., Devi L.* 2007. Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuroscientist*. 13 : 626—638.
- Annaert W., De Strooper B.* 2002. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 18 : 25—51.
- Bonini N. M., Fortini M. E.* 2003. Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.* 26 : 627—56.
- Budnik V., Ruiz-Canada C.* 2006. The fly neuromuscular junction: structure and function. Second edition. *Int. Rev. Neurobiol.* V. 75. San Diego: Acad. Press. 425 p.
- Gunawardena S., Goldstein L. S.* 2001. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron*. 32 : 389—401.
- Hardy J., Selkoe D. J.* 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. An updated summary of the amyloid hypothesis *Science*. 297 : 353—356.
- Hollenbeck P. J.* 2005. Mitochondria and neurotransmission: evacuating the synapse. *Neuron*. 47 : 331—333.
- Jin L. W., Ninomiya H., Roch J. M., Schubert D., Masliah E., Otero D. A., Saitoh T.* 1994. Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J. Neurosci.* 14 : 5461—5470.
- Kuromi H., Kidokoro Y.* 1998. Two distinct pools of synaptic vesicles in single presynaptic boutons in a temperature-sensitive *Drosophila* mutant, *shibre*. *Neuron*. 20 : 917—925.
- Leyssen M., Ayaz D., Hebert S. S., Reeve S., De Strooper B., Hassan B. A.* 2005. Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the *Drosophila* brain. *EMBO J.* 24 : 2944—2955.
- Masliah E., Mallory M., Hansen L., DeTeresa R., Alford M., Terry R.* 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 174 : 67—72.
- Moechars D., Dewachter I., Lorent K., Reverse D., Baekelandt V., Naidu A., Tesseur I., Spittaels K., Haute C. V., Checler F., Godaux E., Cordell B., Van Leuven F.* 1999. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* 274 : 6483—6492.
- Mucke L., Masliah E., Yu G. Q., Mallory M., Rockenstein E. M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K., McConlogue L.* 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* 20 : 4050—4058.
- Oddo S., Caccamo A., Shepherd J. D., Murphy M. P., Golde T. E., Kaye R., Metherate R., Mattson M. P., Akbari Y., LaFerla F. M.* 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39 : 409—421.
- Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Le Meur N., Laquerriere A., Vital A., Dumanchin C., Feuillette S., Brice A., Vercelletto M., Dubas F., Frebourg T., Campion D.* 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet.* 38 : 24—26.
- Rusu P., Jansen A., Soba P., Kirsch J., Lower A., Merdes G., Kuan Y. H., Jung A., Beyreuther K., Kjaerulff O., Kins S.* 2007. Axonal accumulation of synaptic markers in APP transgenic *Drosophila* depends on the NPTY motif and is paralleled by defects in synaptic plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 25 : 1079—1086.
- Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O., Karaseva E., Rodin D., Schwarzman A. L., Vitek M. P.* 2009. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Plos One*. 4 : e8191.
- Seabrook G. R., Smith D. W., Bowery B. J., Easter A., Reynolds T., Fitzjohn S. M., Morton R. A., Zheng H., Dawson G. R., Srinathsinghi D. J.* 1999. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*. 38 : 349—359.
- Seeger G., Gartner U., Ueberham U., Rohn S., Arendt T.* 2009. FAD-mutation of APP is associated with a loss of its synaptotropic activity. *Neurobiol. Dis.* 35 : 258—263.
- Selkoe D. J.* 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J. Alzheimers Dis.* 3 : 75—80.
- Senechal Y., Larmet Y., Dev K. K.* 2006. Unraveling *in vivo* functions of amyloid precursor protein: insights from knockout and knockdown studies. *Neurodegenerative Dis.* 3 : 134—147.
- Stokin G. B., Lillo C., Falzone T., Brusch R. G., Rockenstein E., Mount S. L., Raman R., Davies P., Masliah T., Williams D. S., Goldstein L. S.* 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*. 307 : 1282—1288.
- Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L. A., Katzman R.* 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30 : 572—580.
- Ting J. T., Kelley B. G., Lambert T. J., Cook D. G., Sullivan J. M.* 2007. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 353—358.
- Torroja L., Chu H., Kotovsky I., White K.* 1999a. Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr. Biol.* 9 : 489—492.
- Torroja L., Packard M., Gorczyca M., White K., Budnik V.* 1999b. The *Drosophila* β -amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 15 : 7793—7803.
- Verstreken P., Ohyama T., Bellen H. J.* 2008. FM 1-43 labeling of synaptic vesicle pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Methods Mol. Biol.* 440 : 349—369.
- Walsh D. M., Selkoe D. J.* 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 44 : 181—193.
- Yagi Y., Tomita S., Nakamura M., Suzuki T.* 2000. Overexpression of human amyloid precursor protein in *Drosophila*. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 4 : 43—49.
- Zenisek D., Matthews G.* 2000. The role of mitochondria in presynaptic calcium handling at a ribbon synapse. *Neuron*. 25 : 229—237.
- Zhang Y. Q., Rodesch C. K., Broadie K.* 2002. Living synaptic vesicle marker: synaptotagmin — GFP. *Genesis*. 34 : 142—145.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ABNORMALITIES IN NEUROMUSCULAR JUNCTIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* INDUCED BY THE EXPRESSION OF HUMAN *APP* GENE

S. V. Sarantseva,¹ G. A. Kislik,¹ N. A. Tkacheno,¹ A. N. Vasiliev,³ A. L. Schwarzman^{1,2}

¹ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina,

² Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg, and ³ St. Petersburg State University;

¹ e-mail: svesar1@yandex.ru

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of neurocortical and hippocampal synapses that precedes amyloidosis and neurodegeneration and closely correlates with memory impairment. Mutations in the amyloid precursor protein (*APP*) cause familial AD and result in the increased production of amyloid- β -protein ($A\beta$). To gain insights into synaptic effects of APP, we expressed *APP*, mutant form *APP-Swedish* and *BACE* in the motor neurons of fly larvae. We have shown that targeted expression of *APP* (*APP-Swedish*) in *Drosophila* larval motor neurons causes significant morphological and functional changes in neuromuscular junctions (NMJs): a dramatic increase in the number of synaptic buttons and changes in exocytosis as revealed by incorporation of the styryl dye FM4-64. Analysis of the number and distribution of mitochondria showed that motor neurons overexpressing *APP* (*APP-Swedish*) had a significant reduction of functional mitochondria in the presynaptic terminal. Significant synaptic abnormalities were observed for *APP* (*APP-Swedish*) and human beta-secretase (*BACE*) resulting in secretion of amyloid beta protein ($A\beta$). We suggest that *APP* participates in regulation of synaptic functions and its elevated expression leads to synaptic pathology independently from neurotoxic effects of $A\beta$.

Key words: Alzheimer disease, APP, neuromuscular junctions, *Drosophila melanogaster*.
