

УДК 612.816

# Lynx1 предотвращает нарушение долговременной потенциации и экспрессии нейромодулятора, вызванные $A\beta_{1-42}$ и активацией JNK

М. Л. Бычков<sup>1,2</sup>, Н. А. Васильева<sup>1,3</sup>, М. А. Шулепко<sup>1,2</sup>, П. М. Балабан<sup>1,3</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>,  
Е. Н. Люкманова<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>3</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии человека РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5А

\*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2018

Принята к печати 27.06.2018

**РЕФЕРАТ** Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются лигандзависимыми ионными каналами, дисфункция которых ассоциирована с когнитивными нарушениями, наблюдаемыми при нейродегенеративных заболеваниях. Мембраносвязанный белок Lynx1 модулирует работу nAChR в структурах мозга человека, важных для формирования памяти и обучения. В нашей работе впервые показано, что  $\beta$ -амилоидный пептид  $A\beta_{1-42}$  снижает уровень мРНК Lynx1 в первичных нейронах коры головного мозга крысы, и это снижение связано с активацией N-концевой киназы c-Jun (JNK). Кроме того, снижение уровня экспрессии Lynx1, равно как и нарушение долговременной потенциации, лежащей в основе механизмов синаптической пластичности, вызванные  $A\beta_{1-42}$ , можно предотвратить, используя водорастворимый аналог Lynx1. Полученные данные указывают на водорастворимый Lynx1 как на препарат, потенциально способный улучшать когнитивные процессы при нейродегенеративных заболеваниях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бета-амилоид, болезнь Альцгеймера, когнитивные нарушения, никотиновый ацетилхолиновый рецептор,  $\text{Lu6/uPAR}$ .

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БА – болезнь Альцгеймера; ВЧС – высокочастотная стимуляция; ДВП – долговременная потенциация; ИЦЖ – искусственная цереброспинальная жидкость; фВПСП – фокальные возбуждающие постсинаптические потенциалы;  $A\beta$  – бета-амилоидный пептид; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; siРНК – малая интерферирующая РНК; ws-Lynx1 – водорастворимый домен Lynx1.

## ВВЕДЕНИЕ

Многие нейродегенеративные заболевания, например болезнь Альцгеймера (БА), характеризуются нарушениями когнитивных процессов, связанными с дисфункцией никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) [1]. При БА происходит формирование бляшек, состоящих из олигомеров  $\beta$ -амилоидного пептида ( $A\beta$ ), самой токсичной формой которого является  $A\beta_{1-42}$  [1].  $A\beta_{1-42}$  в концентрации 200 нМ ингибирует работу  $\alpha 7$ -nAChR – наиболее распространено в головном мозге никотинового холинорецептора, а взаимодействие  $A\beta$  с этим рецептором при БА приводит к его интернализации [1]. Кроме того,  $A\beta$  ингибирует долговременную потенциацию (ДВП) [2], лежащую в основе памяти и обучения [3].

Ранее мы показали, что водорастворимый вариант белка человека Lynx1 (ws-Lynx1) [4], модулирующего работу  $\alpha 7$ -nAChR в мозге [5], конкурирует с  $A\beta_{1-42}$  за связывание с  $\alpha 7$ -nAChR [6]. На культуре нейронов коры головного мозга мыши показано, что предынкубация с ws-Lynx1 снижает цитотоксический эффект  $A\beta_{1-42}$  [6]. Кроме того, с помощью Вестерн-блоттинга обнаружено, что экспрессия Lynx1 снижена в коре головного мозга трансгенных мышей, моделирующих БА (3×Tg-AD) по сравнению с мышами дикого типа [6]. Это позволило нам предположить, что Lynx1 играет важную роль при БА, и именно накопление  $A\beta_{1-42}$  приводит к снижению уровня этого нейромодулятора в мозге и влечет за собой нарушение баланса  $A\beta_{1-42}$ /Lynx1, вызывая нарушение работы  $\alpha 7$ -

nAChR. Нами изучено влияние  $A\beta_{1-42}$  на экспрессию гена *Lynx1* в первичных нейронах коры и гиппокампа крысы, на срезах гиппокампа мыши оценено влияние ws-Lynx1 и  $A\beta_{1-42}$  на ДВП.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

Первичную культуру нейронов получали из коры и гиппокампа новорожденных крысят линии Wistar по описанной ранее методике [7]. На 14-й день к культуре нейронов добавляли либо  $A\beta_{1-42}$  (1 или 5 мкМ, Bioreptide Co), олигомеризованный по ранее описанному протоколу [8], либо 5 мкМ  $A\beta_{42-1}$  (обратный пептид использовали в качестве отрицательного контроля, Bioreptide Co), либо 10 мкМ ws-Lynx1 (получали согласно [4]), либо смесь (5 мкМ  $A\beta_{1-42}$  + 10 мкМ ws-Lynx1), либо 2.5 мкМ SP600125 (Tocris), либо смесь (5 мкМ  $A\beta_{1-42}$  + 2.5 мкМ SP600125) и инкубировали дополнительно в течение 24 ч.

Для нокдауна JNK культуру кортикальных нейронов трансфицировали малыми интерферирующими РНК (siРНК) к JNK-1 и JNK-2. В качестве контроля использовали последовательность РНК, приведенную в табл. 1. Нейроны коры на 10-й день культивирования трансфицировали либо siРНК к генам JNK-1 и JNK-2, либо контрольной siРНК. После этого культуру нейронов инкубировали в течение 72 ч, добавляли 5 мкМ  $A\beta_{1-42}$  и инкубировали в течение еще 24 ч.

Затем с помощью реактива ExtractRNA («Евроген») выделяли суммарную мРНК. мРНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США), после чего синтезировали кДНК при помощи набора MMLV RT kit («Евроген»). ПЦР в реальном времени проводили при помощи готовой 5-кратной смеси qPCRmix-HS SYBR + HighROX («Евроген»), список праймеров приведен в табл. 2. Данные анализировали с помощью программы LinReg 2017.0. Уровень мРНК генов нормировали на уровень мРНК  $\beta$ -актина.

Свежеприготовленные переживающие срезы гиппокампа мышей линии C57BL/6 восьмимесячного возраста перфузировали искусственным раствором цереброспинальной жидкости (ИЦЖ) следующего состава: 124 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2.5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1.3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 26 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 1.27 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 10 мМ D-глюкозы, рН 7.4, непрерывно насыщаемого карбогеном (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) при 34°C в течение 1 ч.

**Таблица 1.** Малые интерферирующие РНК, использованные в работе

Ген	Последовательности интерферирующих РНК
Контроль	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
JNK-1	GGCAUGGGCUAUAAGAAATT
	UUUCUUUGUAGCCCAUGCCTT
JNK-2	GCCAGAGACUUAUUAUCAATT
	UUGAUAUAAGUCUCUGGCTT

Затем одну часть срезов перфузировали ИЦЖ, содержащей 200 нМ  $A\beta_{1-42}$ , а другую – ИЦЖ, содержащей 200 нМ  $A\beta_{1-42}$  + 2 мкМ ws-Lynx1 в течение 1 ч. Контрольные срезы перфузировали ИЦЖ, не содержащей ни  $A\beta_{1-42}$ , ни ws-Lynx1. После инкубации срезы мозга помещали в камеры установки SliceMaster (Scientifica, Великобритания), предназначенные для регистрации фокальных возбуждающих постсинаптических потенциалов (фВПСП). На протяжении всей регистрации поддерживали температуру 32–34°C. С помощью стеклянного микроэлектрода, заполненного ИЦЖ (сопротивление 1–3 МОм), в пирамидном слое поля CA1 регистрировали фокальный ответ, вызываемый стимуляцией радиального слоя, используя протокол парной стимуляции (межстимульный интервал 50 мс, частота 0.033 Гц). После 20-минутной записи тестовых ответов подавался протокол высокочастотной стимуляции (ВЧС) для индукции ДВП: 10 серий с частотой 100 Гц (пять стимулов в одной серии) с интервалом между сериями 200 мс, четыре повтора с интервалом 30 с. После индукции ДВП запись фВПСП производили в течение 1.5 ч. Полученные данные записывали, отфильтровывали и анализировали с помощью программы Spike2 (Cambridge Electronic Design Limited, Великобритания) и SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Посттетанический тангенс угла наклона фВПСП нормировали на усредненный тангенс угла наклона всех фВПСП, записанных за 20 мин до индукции ДВП.

Статистический анализ данных записи ДВП и данных о влиянии  $A\beta_{1-42}$ , ws-Lynx1, SP600125 и siРНК на экспрессию генов в первичных нейронах прово-

**Таблица 2.** Праймеры, использованные в работе

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина фрагмента, п.н.
$\beta$ -актин	TCATGTTTGAGACSTTCAACAC	GTCTTTGCGGATGTCCACG	250
<i>Lynx1</i>	ACCACTCGAАСТТАСТTCAACC	ATCGTACACGGTCTCAAAGC	81
<i><math>\alpha</math>7-nAChR</i>	TGCACGTGTCCSTGCAAGGC	GTACACGGTGAGCGGCTGCG	112

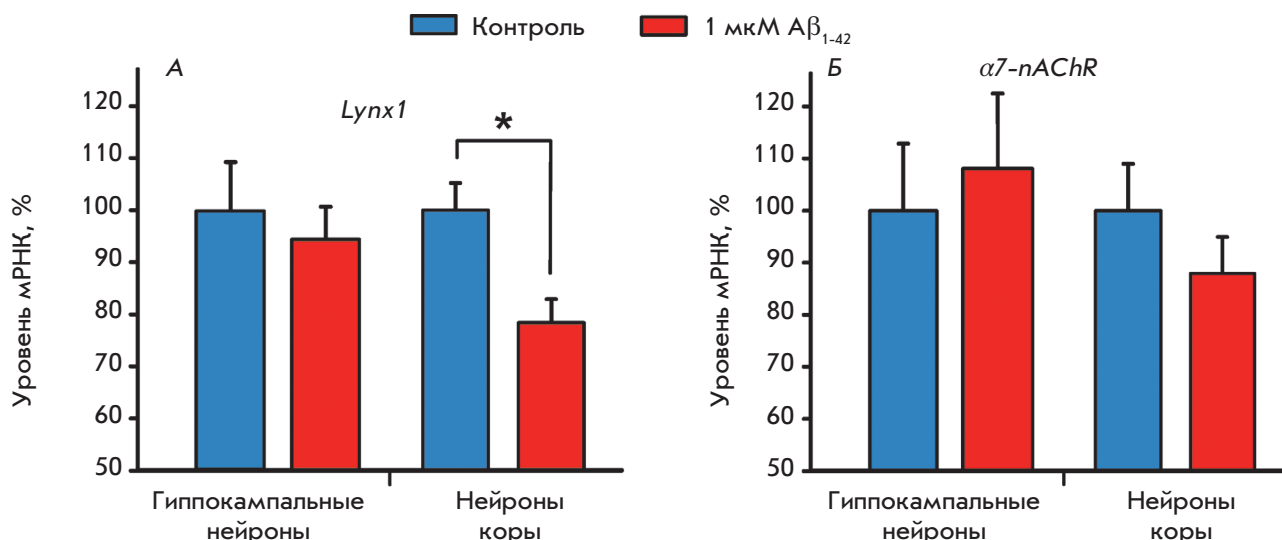


Рис. 1. Влияние Аβ<sub>1-42</sub> на экспрессию генов *Lynx1* (А) и *α7-nAChR* (Б) в первичной культуре нейронов коры головного мозга и гиппокампа. Значения представлены как % от контроля ± стандартная ошибка среднего значения ( $n = 3$ ). \* ( $p < 0.05$ ) означает статистически значимую разницу между группами согласно двустороннему *t*-тесту

дили в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Значение  $p < 0.05$  считали статистически значимым. Обращение с животными и экспериментальные процедуры с ними были выполнены в соответствии с директивами совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований и одобрены Этическими комиссиями МГУ и ИБХ РАН.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

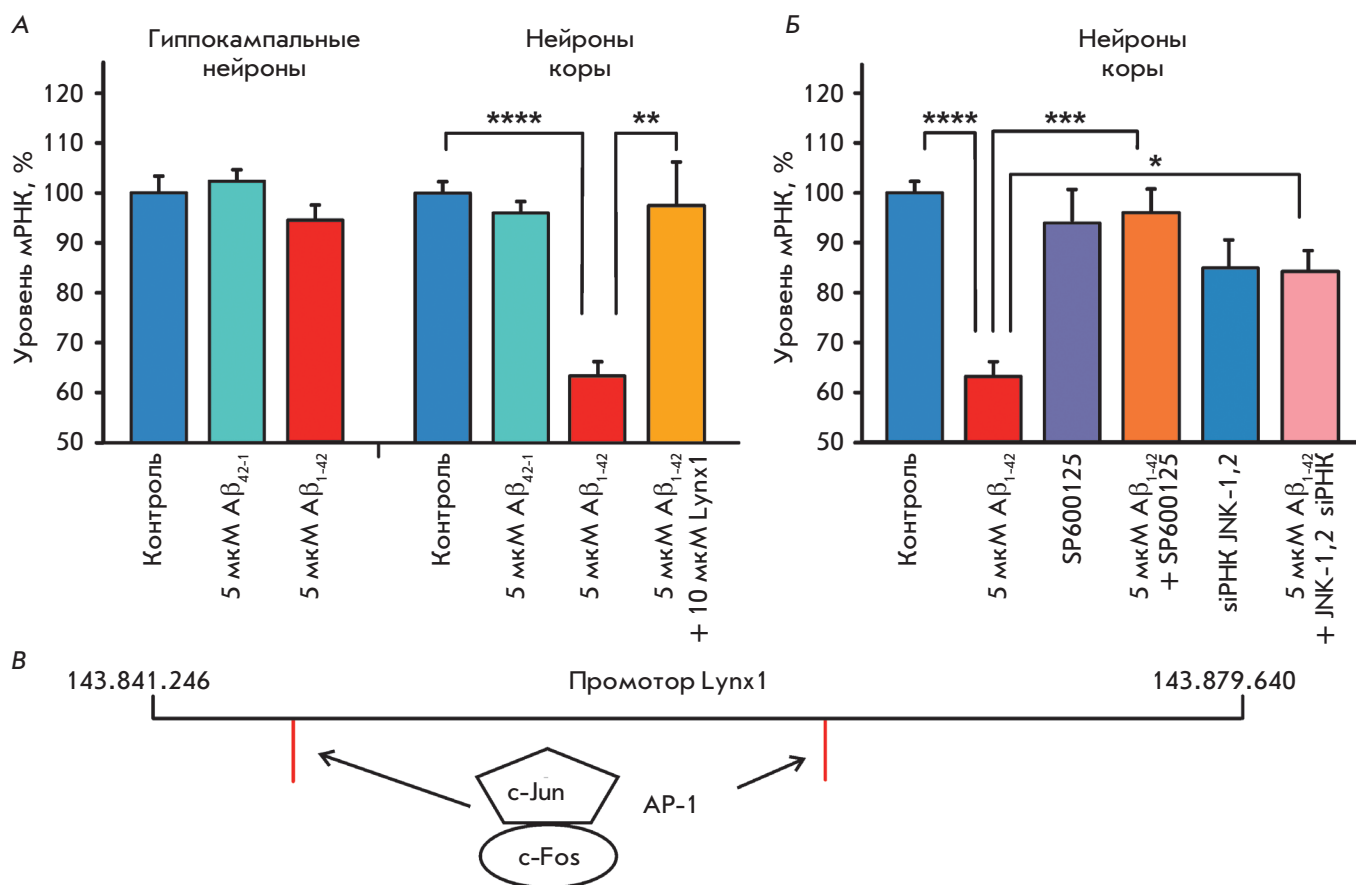
### Снижение экспрессии *Lynx1* в нейронах под действием Аβ<sub>1-42</sub> обусловлено активацией JNK

Для проверки гипотезы о влиянии амилоидного пептида на экспрессию *Lynx1* мы инкубировали первичные нейроны коры и гиппокампа крысы с 1 мкМ олигомерного Аβ<sub>1-42</sub> и анализировали уровень мРНК *Lynx1* (рис. 1А). В нейронах гиппокампа не было замечено значимого снижения экспрессии нейромодулятора, в то время как наблюдалось значительное снижение уровня мРНК *Lynx1* (до  $78.4 \pm 4.4\%$  от контрольного уровня) в нейронах коры. Это согласуется с отмеченным ранее снижением экспрессии белка *Lynx1* в коре головного мозга мышей, моделирующих БА [5]. Напротив, ни в гиппокампальных, ни в кортикальных нейронах не наблюдали снижения уровня мРНК  $\alpha 7$  субъединицы nAChR под действием Аβ<sub>1-42</sub> (рис. 1Б). Увеличение концентрации Аβ<sub>1-42</sub> до 5 мкМ приводило к дальнейшему снижению экспрессии гена *Lynx1* в кортикальных нейронах (до  $65.8 \pm 4.9\%$  от контрольного уровня, рис. 2А).

Известно, что активация  $\alpha 7$ -nAChR никотином регулирует транскрипцию генов посредством фос-

форилирования CREB и активации сигнальных путей MAP/ERK, при этом увеличивается количество транскрипционного фактора раннего ответа c-Fos [9]. С другой стороны, связывание олигомерного Аβ<sub>1-42</sub> с  $\alpha 7$ -nAChR приводит к активации N-концевой киназы c-Jun (JNK) [10], которая играет ключевую роль в регуляции генной экспрессии и других жизненно важных процессах, в том числе в процессинге предшественника  $\beta$ -амилоидного пептида и образовании нейрофибриллярных клубков при БА [10]. В свою очередь, активация JNK может приводить к ингибированию фосфорилирования транскрипционного фактора CREB и, как следствие, к снижению уровня экспрессии транскрипционного фактора c-Fos [11].

Чтобы выяснить, связано ли падение уровня экспрессии *Lynx1* в нейронах коры, инкубированных с олигомерным Аβ<sub>1-42</sub>, с активацией JNK, мы инкубировали кортикальные нейроны с Аβ<sub>1-42</sub> и SP600125, – селективным ингибитором JNK-1, -2 и -3, который рассматривается в настоящее время как один из возможных препаратов для лечения БА [10]. Действительно, совместная инкубация нейронов с Аβ<sub>1-42</sub> и SP600125 отменяла снижение экспрессии *Lynx1*, что указывает на возможную связь этого снижения с активацией JNK (рис. 2Б). Для подтверждения роли JNK в регуляции транскрипции *Lynx1* использовали технологию нокдауна генов *JNK-1* и *JNK-2* при помощи малых интерферирующих РНК. Действительно, инкубация нейронов с заблокированной экспрессией *JNK-1* и *JNK-2* в присутствии Аβ<sub>1-42</sub> приводила к восстановлению уровня экспрессии мРНК *Lynx1* (рис. 2Б). При этом трансфекция культуры нейронов контрольной siРНК, не ингиби-



**Рис. 2.** ws-Lynx1 и ингибирование JNK отменяют снижение экспрессии *Lynx1* в первичной культуре кортикальных нейронов, обработанных Aβ<sub>1-42</sub>. **А** – влияние Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>42-1</sub> и ws-Lynx1 на экспрессию *Lynx1*. **Б** – влияние Aβ<sub>1-42</sub> и ингибирования JNK с помощью SP600125 и нокадауна генов *JNK-1* и *JNK-2* на экспрессию *Lynx1*. Значения представлены как % от контроля ± стандартная ошибка среднего значения ( $n = 4$ ). \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) и \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) означают статистически значимую разницу между группами согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Tukey's/пос-тестом. **В** – схематическое изображение строения гена *Lynx1*. Красными линиями показаны сайты связывания c-Jun и c-Fos

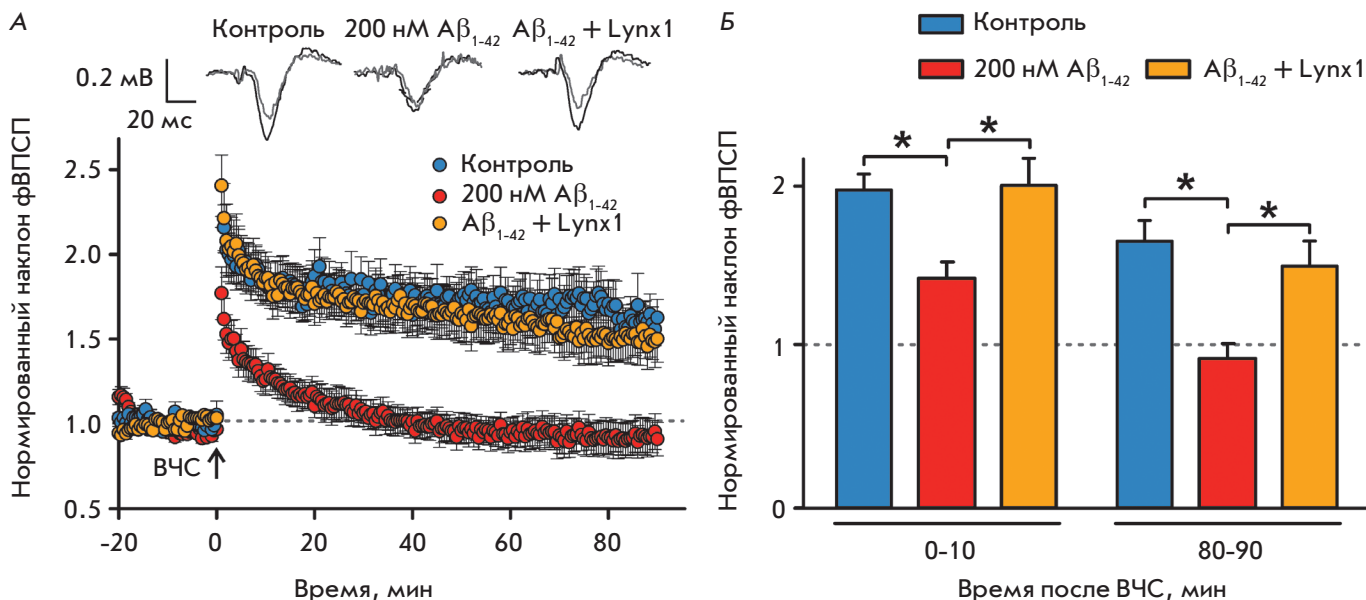
рующей транскрипцию генов, не влияла на снижение экспрессии мРНК *Lynx1*, вызванное Aβ<sub>1-42</sub> (данные не показаны). Нокадаун *JNK-1* и *JNK-2* в отсутствие Aβ<sub>1-42</sub> не вызывал значимых изменений в уровне экспрессии гена *Lynx1* (рис. 2Б), что подтверждает связь амилоидного пептида, активации JNK и снижения транскрипции нейромодулятора.

Анализ промотора гена *LYNX1* человека в браузере генома человека (chr8: 143841246 – chr8: 143879640) и промотора гена мыши *Lynx1* (chr15: 74573409 – chr15: 74603409) выявил два потенциальных сайта связывания транскрипционного комплекса AP-1, образующегося из транскрипционных факторов c-Jun и c-Fos (рис. 2В). Так как в результате активации JNK под действием Aβ<sub>1-42</sub> одновременно происходит активация c-Jun [10] и снижение экспрессии c-Fos [11], то дисбаланс, возникающий меж-

ду c-Jun и c-Fos, возможно, является причиной нарушения формирования транскрипционного комплекса AP-1, и, как следствие, снижения транскрипции гена *Lynx1*. В согласии с этим предположением при инкубации кортикальных нейронов совместно с препаратом ws-Lynx1 и Aβ<sub>1-42</sub> наблюдалось восстановление уровня мРНК *Lynx1* (рис. 2Б). По-видимому, ws-Lynx1, конкурируя с Aβ<sub>1-42</sub> за связывание с α7-nAChR [6], подобно никотину активирует α7-nAChR, что приводит к повышению уровня c-Fos [9] и восстановлению транскрипции гена *Lynx1*.

#### ***Lynx1* предотвращает нарушение ДВП, вызванное Aβ<sub>1-42</sub>**

С использованием SP600125 ранее было показано, что нарушение ДВП, наблюдаемое при инкубации срезов гиппокампа с олигомерным Aβ<sub>1-42</sub>,



**Рис. 3.** ws-Lynx1 предотвращает нарушение ДВП, вызванное  $A\beta_{1-42}$ , на срезах гиппокампа. А — временной ход изменений наклона фВПСП, регистрируемых на срезах гиппокампа, полученных от контрольных животных и перфузированных ИЦЖ без  $A\beta_{1-42}$  ( $n = 8$ ), перфузированных ИЦЖ с 200 нМ  $A\beta_{1-42}$  ( $n = 6$ ) и перфузированных ИЦЖ с 200 нМ  $A\beta_{1-42}$  + 2 мкМ ws-Lynx1 ( $n = 5$ ). Б — усредненные значения наклона фВПСП, зарегистрированные в первые и последние 10 мин регистрации после ВЧС. \* ( $p < 0.05$ ) означает статистически значимые различия между группами согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Tukey's/hoc-тестом

связано с активацией JNK [12]. Для изучения возможности восстановления с помощью Lynx1 синаптической пластичности, нарушенной в результате взаимодействия олигомерного  $A\beta_{1-42}$  с  $\alpha 7$ -nAChR и активации JNK, мы исследовали влияние 200 нМ  $A\beta_{1-42}$  на ДВП на переживающих срезах гиппокампа мыши в присутствии и в отсутствие 2 мкМ ws-Lynx1. Предварительная перфузия срезов в течение 1 ч в растворе, содержащем  $A\beta_{1-42}$ , приводила к значительному падению посттетического фВПСП, заметному уже на первых минутах после индукции ДВП. Наклон фВПСП, усредненный за первые 10 мин записи, в этом случае падал почти в 1.5 раза по сравнению с контрольным значением наклона фВПСП (рис. 3Б). Значительное снижение наклона фВПСП под действием  $A\beta_{1-42}$ , приближающееся к значениям непотенцированных фВПСП, наблюдалось в течение всего времени после индукции ДВП.

Однако совместная инкубация срезов гиппокампа в среде, содержащей и  $A\beta_{1-42}$ , и ws-Lynx1, восстанавливала уровень ДВП практически до контрольных значений (рис. 3). Усредненное значение наклона фВПСП при совместной аппликации  $A\beta_{1-42}$  и ws-Lynx1 было значительно больше, чем у фВПСП, наблюдаемого при инкубации только с  $A\beta_{1-42}$ , и ста-

тистически не отличалось от усредненного значения наклона фВПСП в контроле в течение всего времени регистрации после ВЧС (рис. 3Б). Следовательно, ws-Lynx1 отменяет ингибирующее действие  $A\beta_{1-42}$ , полностью восстанавливая ДВП.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, присутствие олигомерного  $A\beta_{1-42}$  в окружении нейронов приводит к значительному снижению экспрессии гена нейромодулятора Lynx1, регулирующего функционирование  $\alpha 7$ -nAChR в мозге. Мы впервые показываем, что это снижение связано с активацией JNK и может быть предотвращено инкубацией с водорастворимым аналогом Lynx1. Кроме того, ws-Lynx1 способен корректировать нарушения синаптической пластичности в гиппокампе, вызванные  $A\beta_{1-42}$  и лежащие в основе нарушения памяти и других когнитивных функций при БА. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 16-34-01302, Н.А.В., разработка системы регистрации токов на срезах мозга) и РНФ (№ 16-14-00102, Е.Н.Л., М.А.Ш., Н.А.В., влияние  $A\beta_{1-42}$ , SP600125, siRNK и ws-Lynx1 на ДВП и генную экспрессию).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buckingham S.D., Jones A.K., Brown L.A., Sattelle D.B. // *Pharmacol. Rev.* 2009. V. 61. P. 39–61.
2. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. // *Nature.* 2002. V. 416. P. 535–539.
3. Lynch M.A. // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. P. 87–136.
4. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Mineev K.S., D'Hoedt D., Kasheverov I.E., Filkin S.Y., Krivolapova A.P., Janickova H., Dolezal V., Dolgikh D.A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10618–10627.
5. Miwa J.M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G.W., Sánchez R., Sali A., Role L.W., Heintz N. // *Neuron.* 1999. V. 23. P. 105–114.
6. Thomsen M.S., Arvaniti M., Jensen M.M., Shulepko M.A., Dolgikh D.A., Pinborg L.H., Härtig W., Lyukmanova E.N., Mikelsen J.D. // *Neurobiol. Aging.* 2016. V. 46. P. 13–21.
7. Suntsova M., Gogvadze E.V., Salozhin S., Gaifullin N., Eroshkin F., Dmitriev S.E., Martynova N., Kulikov K., Malakhova G., Tukhbatova G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 19472–19477.
8. Klein W.L. // *Neurochem. Int.* 2002. V. 41. P. 345–352.
9. Hu M., Liu Q.S., Chang K.T., Berg D.K. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2002. V. 21. P. 616–625.
10. Yarza R., Vela S., Solas M., Ramirez M.J. // *Front. Pharmacol.* 2016. V. 6 doi: 10.3389/fphar.2015.00321.
11. Yenki P., Khodaghali F., Shaerzadeh F. // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 49. P. 262–269.
12. Wang Q., Walsh D.M., Rowan M.J., Selkoe D.J., Anwyl R. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 3370–3378.