

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 577.2:576.33:612.816

Е. А. Сабурова, А. Н. Васильев, В. В. Кравцова, О. И. Большакова,
С. В. Саранцева, И. И. Кривой

**СПОНТАННАЯ АКТИВНОСТЬ В НЕРВНО-МЫШЕЧНОМ СИНАПСЕ
ЛИЧИНКИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ПРИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *APP*
ЧЕЛОВЕКА***

Согласно гипотезе амилоидного каскада основную роль в патогенезе болезни Альцгеймера играет β -амилоидный пептид, являющийся результатом протеолитического процессинга белка-предшественника амилоида (APP, amyloid precursor protein). Что же касается самого APP, физиологическая роль этого белка остается малопонятной. Удобной моделью для подобных исследований является *Drosophila melanogaster*, у которой отсутствуют гены *APP* и β -секретазы; поэтому в трансгенных линиях дрозофилы можно независимо исследовать эффекты APP и β -амилоида. В наших опытах на нервно-мышечном синапсе личинки *Drosophila melanogaster* в условиях экспрессии гена *APP* человека наблюдалось снижение частоты спонтанной квантовой секреции медиатора без нарушения случайной природы этого процесса. Частота спонтанной секреции не изменялась при снижении уровня APP и образовании β -амилоида в условиях одновременной экспрессии генов *APP* и β -секретазы человека. Наблюдаемые изменения свидетельствуют о нарушении механизма экзоцитоза синаптических везикул и специфичны для APP. Библиогр. 24 назв. Ил. 3.

Ключевые слова: нервно-мышечный синапс, *Drosophila melanogaster*, APP, квантовая секреция медиатора.

Е. А. Saburova¹, А. N. Vasiliev¹, V. V. Kravtsova¹, O. I. Bolshakova², S. V. Sarantseva², Krivoi I. I.¹

**SPONTANEOUS ACTIVITY IN NEUROMUSCULAR SYNAPSE
OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* LARVAE WITH HUMAN *APP* GENE EXPRESSION**

¹ St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; ekaterina.guseva87@mail.ru, avas125@gmail.com, violettakravtsova@gmail.com, iikrivoi@gmail.com

² В. П. Константинов St. Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Orlova Roscha, Gatchina, Leningrad district, 188300, Russian Federation; olya9999@yandex.ru, svesar1@yandex.ru

According to amyloid cascade hypothesis the main role in pathogenesis of Alzheimer's disease plays β -amyloid peptide, which is the product of proteolytic processing of amyloid precursor protein (APP).

Е. А. Сабурова (ekaterina.guseva87@mail.ru), А. Н. Васильев (avas125@gmail.com), В. В. Кравцова (violettakravtsova@gmail.com), И. И. Кривой (iikrivoi@gmail.com): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; О. И. Большакова (olya9999@yandex.ru), С. В. Саранцева (svesar1@yandex.ru): Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», Российская Федерация, 188300, Ленинградская область, г. Гатчина, Орлова роща.

* Работа поддержана Санкт-Петербургским государственным университетом (гранты № 1.50.162.1.2013 и № 1.38.231.2014), а также РФФИ (грант № 15-04-09041).

In regards to APP, physiological role of this protein itself remain incompletely understood. A convenient model for such experiments is *Drosophila melanogaster*, which does not contain APP and β -secretase genes. So in transgenic lines of *Drosophila melanogaster* it's possible to study effects of APP and β -amyloid independently. In our experiments on neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster* larvae with human APP gene expression a decrease of spontaneous quantal transmitter release frequency without alteration of its random nature was demonstrated. Frequency of spontaneous transmitter release was not affected at decreased level of APP and production of β -amyloid in conditions of co-expression of human APP and β -secretase genes. These changes give evidences for alteration of synaptic vesicle exocytosis mechanism which is specific for APP.

Keywords: neuromuscular synapse, *Drosophila melanogaster*, APP, quantal transmitter release.

Введение

Болезнь Альцгеймера — хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание головного мозга, которое сопровождается нарушениями памяти и других когнитивных функций. Согласно гипотезе амилоидного каскада основную роль в патогенезе болезни Альцгеймера играет β -амилоидный пептид (A β), являющийся результатом протеолитического процессинга белка-предшественника амилоида (APP, amyloid precursor protein) [1–5]. При мутациях в гене APP образуется наиболее нейротоксичная форма A β , являющаяся основным компонентом амилоидных бляшек, вызывающих, как предполагают, нарушения синаптической функции. Физиологическая роль самого APP остается малопонятной. По ряду данных APP участвует в формировании синапсов и в регуляции их активности, играет важную роль в процессах обучения и памяти [4, 6]. По некоторым данным изменения уровня APP вызывают нарушения синаптической и нейрональной функций [7–10].

Изучение эффектов самого APP может быть важным для более глубокого понимания механизмов синаптической дисфункции при болезни Альцгеймера. Однако модели с использованием млекопитающих не позволяют полностью дискриминировать эффекты APP и A β . Удобной моделью для подобных исследований является *Drosophila melanogaster*, у которой отсутствуют гены APP и β -секретазы, которая совместно с γ -секретазой участвует в образовании A β [10, 11]. Таким образом, в трансгенных линиях дрозофилы можно независимо исследовать эффекты APP и A β . В таких экспериментах на дрозофиле с экспрессией гена APP человека наблюдались нейродегенерация, нарушение процессов обучения и памяти, локомоторного поведения; ряд пресинаптических нарушений, включая механизм везикулярного экзоцитоза, а также многочисленные морфофункциональные изменения в нейромышечных соединениях [10, 12, 13]. Важно, что нервно-мышечный синапс дрозофилы является глутаматергическим, что приближает эту модель к глутаматергическим синапсам ЦНС млекопитающих [14].

Наблюдаемые при экспрессии гена APP пресинаптические нарушения свидетельствуют о возможности соответствующих функциональных изменений, в частности, в механизме экзоцитоза синаптических везикул. Для проверки данного предположения в настоящей работе проведен анализ спонтанной квантовой секреции медиатора в нервно-мышечном синапсе личинок трансгенных линий *Drosophila melanogaster* различающихся уровнем APP.

Материалы и методы

В опытах использовали трансгенные линии *Drosophila melanogaster*. Экспрессию трансгенов в моторных нейронах личинки проводили в системе UAS-GAL4. Линия UAS-APP/+; Gal4-D42/+ (далее линия APP) содержала ген APP человека. У дрозофилы γ -секретеза распознает APP человека и участвует в его протеолитическом процессинге [15]. Но поскольку у дрозофилы нет β -секретезы (BACE), в этой линии образуется только APP, тогда как $A\beta$ отсутствует. Линия UAS-APP/UAS-BACE; Gal4-D42/+ содержала гены APP и BACE человека (далее линия APP+BACE). В этой линии при действии β - и γ -секретаз происходит образование $A\beta$, а содержание APP по сравнению с предыдущей линией снижено. Линия Gal4-D42/+ использовалась в качестве контроля, от дикого типа ее отличало наличие конструкции, запускающей транскрипцию в мотонейронах.

Мухи *Drosophila melanogaster* содержались в пробирках на стандартной питательной среде при комнатной температуре ($t=22^{\circ}\text{C}$) и 12-часовом световом дне. Опыты проводили на личинках 3-го возраста в физиологическом растворе HL-3 следующего состава (в mM): NaCl — 70; KCl — 5; MgCl₂ — 20; CaCl₂ — 2; NaHCO₃ — 10; HEPES — 5; сахароза — 115; трегалоза — 5; pH=7,2 [16–18]. Препаровку проводили, как описано ранее [17]. В растворе для препаровки, чтобы избежать сокращения мышечных волокон, концентрация ионов кальция была снижена до 0,2мМ, раствор охлаждали до температуры 4 $^{\circ}\text{C}$. Препаровку личинки осуществляли в пластиковой чашке Петри (диаметр 35 мм), личинку фиксировали при помощи энтомологических игл на силиконовом покрытии (Sylgard). Далее чашку Петри с готовым препаратом подключали к системе перфузии проточным раствором со скоростью 0,5 мл/мин, обеспечиваемой перистальтическим насосом BT-100 (Leadfluid Co). Температуру раствора поддерживали на уровне 22 $^{\circ}\text{C}$ при помощи системы термостабилизации SC-20 и нагревательного элемента CL-100 (Warner Instruments, USA). Растворы для препаровки и в ходе эксперимента аэрировали карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Для приготовления растворов использовали соли производства SIGMA-ALDRICH.

Величину мембранного потенциала покоя (МПП) и спонтанные миниатюрные постсинаптические потенциалы (МПСП) регистрировали внутриклеточно в 6-м и 7-м мышечных волокнах. Данные волокна наиболее крупные, их легко идентифицировать, и большинство работ по исследованию нервно-мышечного синапса дрозофилы проведено именно на них [18–20]. Использовали стеклянные микроэлектроды с внутренними капиллярами (заготовки марки BF150-110-10, Sutter Instrument, Co., USA), изготовленные на микрокузнице Sutter P-97 (USA) и заполненные 3М раствором KCl. Сопrotивление микроэлектродов составляло около 10 М Ω , собственный потенциал кончика не превышал нескольких мВ. Поиск синаптического района и введение микроэлектродов в волокно проводили под визуальным контролем с помощью микроскопа PZMTIII (WPI), оснащенного видеокамерой JVC TK-C920BE, и микроманипулятора Narishige (National Instruments).

Для регистрации и анализа МПСП применяли усилитель Axoclamp 900A с полосой пропускания от 0 до 1 кГц и систему обработки данных Digidata 1440A (Molecular devices, USA) с использованием программы AxoScop 10.4. В каждом волокне регистрировали от 300 до 600 МПСП, время регистрации составляло, как правило, от 2 до 6 мин. Статистическую обработку проводили с помощью пакетов программ

Microsoft Excel, а также Origin 6.1. Усредненные значения сравнивали с помощью критерия Стьюдента. В тексте и на рисунках приведены средние значения величин с их стандартными ошибками.

Результаты и обсуждение

Средняя величина МПП в контрольной линии составила $-64,6 \pm 1,1$ мВ (73 волокна), что является нормальным для раствора, содержащего 2мМ Ca^{2+} [21]. Величины МПП в линиях APP и APP+BACE существенно не отличались от МПП контрольной линии. Во всех случаях МПСР анализировали только в тех волокнах, где величина МПП оставалась относительно постоянной (отклонения не более 5%) в ходе регистрации.

Гистограмма распределения амплитуд МПСР всей контрольной линии (10 личинок, 32 волокна) имела вид, похожий на нормальное распределение. Однако более детальный анализ показал, что гистограмма наилучшим образом аппроксимируется двумя нормальными распределениями со средними амплитудами 0,46 мВ и 0,74 мВ (рис. 1, А). Такой характер распределения, по-видимому, объясняется особенностями иннервации 6-го и 7-го волокон, у которых терминалы мотонейронов образуют малые и большие бутоны, отличающиеся размерами синаптических везикул и генерацией разных по амплитуде постсинаптических ответов [19, 20]. Мы полагаем, что именно такой характер иннервации объясняет обнаруженные нами два пика в распределении амплитуд МПСР.

В контрольной группе встречались лишь единичные гигантские МПСР с амплитудами в 2–3 раза превышающими основные две популяции ответов. Гигантские МПСР, относящиеся к атипичным спонтанным квантовым ответам, по-видимому, как и в нервно-мышечном синапсе позвоночных [22], являются результатом одновременного экзоцитоза нескольких синаптических везикул из одной активной зоны.

В гистограмме распределения амплитуд МПСР линии с экспрессией гена APP человека (12 личинок, 30 волокон) также выявлены два нормальных распределения со средними амплитудами 0,52 мВ и 0,80 мВ (рис. 1, Б), что не отличается от соответствующих пиков контрольной линии. Помимо этих двух пиков можно также выделить распределение со средней амплитудой 1,4 мВ. Причина появления этого распределения неясна. Возможно, в синапсах линии APP увеличивается количество гигантских МПСР, однако этот вопрос требует специального анализа.

В линии с одновременной экспрессией генов APP и BACE человека (7 личинок, 14 волокон), как и в контрольной линии, встречались лишь единичные гигантские МПСР. Гистограмма распределения амплитуд МПСР в волокнах этой линии также наилучшим образом аппроксимировалась двумя нормальными распределениями со средними амплитудами 0,47 мВ и 0,79 мВ, которые не отличались от соответствующих амплитуд в контроле (рис. 1, В).

Таким образом, существенных нарушений постсинаптического электрогенеза в линиях APP и APP+BACE по сравнению с контролем не обнаружено.

При анализе средней частоты МПСР учитывали все зарегистрированные ответы без разделения на популяции, отличающиеся амплитудой. Общая частота всех МПСР, оцененная таким образом, составила в контрольных волокнах $2,5 \pm 0,4$ с⁻¹.

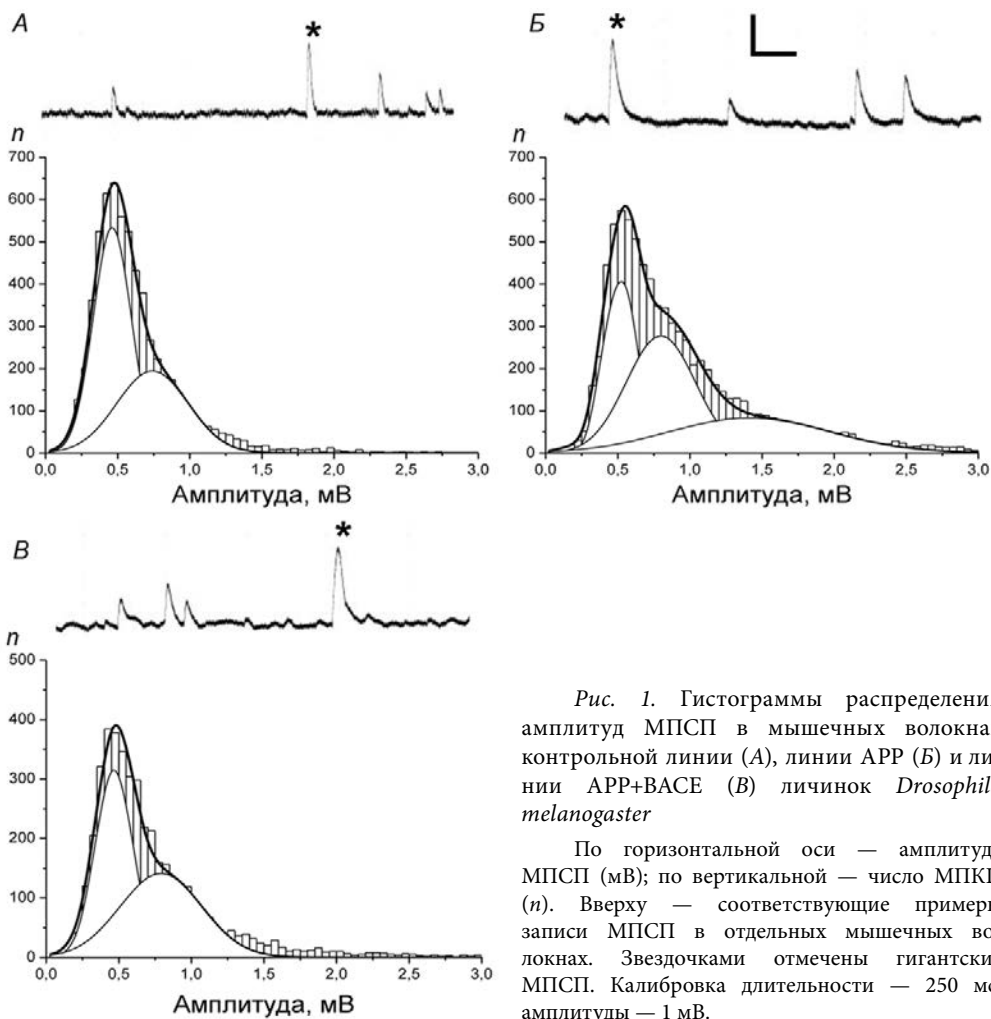


Рис. 1. Гистограммы распределения амплитуд МПСП в мышечных волокнах контрольной линии (А), линии *APP* (Б) и линии *APP+BACE* (В) личинок *Drosophila melanogaster*

По горизонтальной оси — амплитуда МПСП (мВ); по вертикальной — число МПКП (*n*). Вверху — соответствующие примеры записи МПСП в отдельных мышечных волокнах. Звездочками отмечены гигантские МПСП. Калибровка длительности — 250 мс, амплитуды — 1 мВ.

Средняя частота МПСП в линии с экспрессией гена *APP* человека составила $1,6 \pm 0,3 \text{ с}^{-1}$, что было достоверно ниже ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (рис. 2). Известно, что на частоту спонтанной квантовой секреции медиатора из нервных окончаний влияют самые разнообразные факторы. Один из таких факторов — запас доступных для освобождения квантов медиатора, который во многом определяется числом активных зон (бутонов). У дрозофилы с экспрессией гена *APP* человека наблюдается разрастание аксонов и увеличение количества сателлитных синаптических бутонов [12]. При этом может возрастать количество активных зон, что должно увеличивать частоту спонтанной квантовой секреции медиатора и не может объяснить наши наблюдения.

Другой важнейший фактор, влияющий на частоту спонтанной секреции квантов медиатора, — вероятность освобождения квантов из отдельных активных зон, которая во многом определяется кальций-зависимыми этапами везикулярного экзоцитоза: свойствами кальциевых каналов, состоянием кальциевого сенсора си-

наптотагмина и белков молекулярного комплекса экзоцитоза [23]. У дрозофилы с экспрессией гена *APP* человека наблюдается нарушение распределения белка молекулярного комплекса экзоцитоза синаптобревина, снижение уровня синаптотагмина и нарушение экзоцитоза синаптических везикул [12, 24]. У дрозофилы этой линии отсутствует β -секретаза и не образуется $A\beta$. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемое нами снижение частоты спонтанной квантовой секреции медиатора обусловлено снижением вероятности экзоцитоза синаптических везикул в результате действия *APP*.

Для того чтобы проверить данное предположение, мы провели опыты на личинках третьей линии, в которой одновременно экспрессируются гены *APP* и *BACE* человека. В личинках линии *APP+BACE* в отличие от предыдущей линии содержание *APP* должно быть снижено при одновременном образовании $A\beta$. Важно, что у дрозофилы линии *APP+BACE* действительно продемонстрировано накопление $A\beta$ в мозгу [13]. В мышечных волокнах линии *APP+BACE*, несмотря на образование $A\beta$, общая частота МПСП составила $2,0 \pm 0,3 \text{ c}^{-1}$, т. е. наблюдалась тенденция к снижению частоты по сравнению с контролем, однако эффект был недостоверным (см. рис. 2).

Распределения межимпульсных интервалов МПСП во всех трех линиях наилучшим образом аппроксимировались моноэкспоненциальными функциями в соответствии с моделью Пуассона (рис. 3). Полученные данные позволяют предположить, что в исследованных линиях нет нарушения случайной природы спонтанной секреции квантов медиатора.

Полученные нами факты свидетельствуют о том, что наблюдаемые при гиперэкспрессии *APP* нарушения спонтанной квантовой секреции медиатора (проявляющиеся в снижении частоты МПСП) отсутствуют при одновременной экспрессии генов *APP* и *BACE* человека. Таким образом, можно предположить, что данные пресинаптические нарушения не связаны с образованием $A\beta$ и специфичны именно для *APP*.

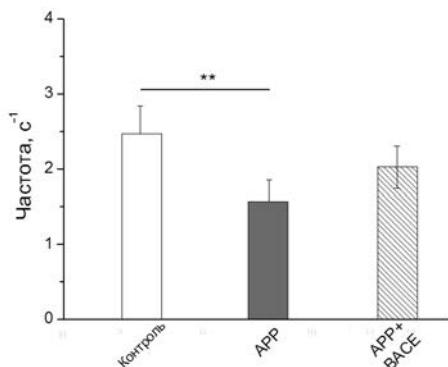


Рис. 2. Средние частоты МПСП в мышечных волокнах контрольной линии (белые столбцы); линии *APP* (серые столбцы) и линии *APP+BACE* (заштрихованные столбцы) личинок *Drosophila melanogaster*

По вертикальной оси — частота (c^{-1}). $**p < 0,01$ по сравнению с контролем.

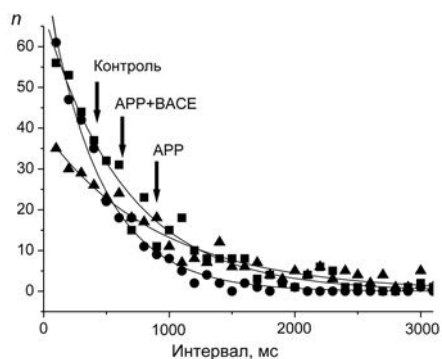


Рис. 3. Распределения временных интервалов между МПСП в индивидуальных волокнах контрольной линии (кружки); линии *APP* (треугольники) и линии *APP+BACE* (квадраты)

По вертикальной оси — количество интервалов (n). Сплошные линии представляют собой моноэкспоненциальные функции, рассчитанные с помощью программы Origin 6.1. Вертикальные стрелки — соответствующие константы спада: величина константы в контрольной линии меньше по сравнению с константой линии *APP*, что отражает более высокую частоту МПСП (меньший межимпульсный интервал) в контроле. По горизонтальной оси — интервал, мс.

Это предположение подкрепляется рядом фактов. У мышей с нокаутом или нокадауном гена *APP* наблюдали дисфункцию синапсов и нарушения когнитивных функций, характерные для болезни Альцгеймера [7, 8]. У мышей с гиперэкспрессией *APP* наблюдали снижение частоты спонтанной квантовой секреции медиатора [9]. У дрозофилы с экспрессией гена *APP* дикого типа наблюдали нейродегенерацию, снижение содержания в нервных клетках синаптобревина, нарушения обучения и памяти [13]. У дрозофилы с экспрессией гена *APP* человека выявлены многочисленные морфологические и функциональные изменения в нейромышечных соединениях: разрастание аксонов и увеличение количества сателлитных бутонов; нарушение распределения синаптобревина и экзоцитоза синаптических везикул; уменьшение числа пресинаптических митохондрий [12, 24]. Таким образом, проведенный нами функциональный анализ подтверждает данные морфологических исследований.

Литература

1. Reinhard C., Hebert S. S., De Strooper B. The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function // *EMBO J.* 2005. Vol. 24, N 2. P. 3996–4006.
2. Zheng H., Koo E. H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid // *Mol. Neurodegener.* 2006. Vol. 1, N 5. P. 1–12.
3. O'Brien R. J., Wong P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease // *Annu. Rev. Neurosci.* 2011. Vol. 34. P. 185–204.
4. Hoe H-S., Lee H-K., Pak D. T. S. The upside APP at synapses // *CNS Neurosci. Ther.* 2012. Vol. 18, N 1. P. 47–56.
5. Мухамедьяров М. А., Зефилов А. Л. Влияние β -амилоидного пептида на функции возбудимых тканей: физиологические и патологические аспекты // *Успехи физиол. наук.* 2013. Т. 44, № 1. С. 55–71.
6. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function / Tyan S.-H., Shih A. Y.-J., Walsh J. J., Maruyama H., Sarsoza F., Ku L., Eggert S., Hof P. R., Koo E. H., Dickstein D. L. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2012. Vol. 51, N 1–2. P. 43–52.
7. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein / Seabrook G. R., Smith D. W., Bowery B. J., Easter A., Reynolds T., Fitzjohn S. M., Morton R. A., Zheng H., Dawson G. R., Sirinathsingji D. J. Davies C. H., Collingridge G. L., Hill R. G. // *Neuropharmacology.* 1999. Vol. 38, N 3. P. 349–359.
8. Senechal Y., Larmet Y., Dev K. K. Unraveling in vivo functions of amyloid precursor protein: Insights from knockout and knockdown studies // *Neurodegener. Dis.* 2006. Vol. 3, N 3. P. 134–147.
9. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms / Ting J. T., Kelley B. G., Lambert J. T., Cook D. G., Sullivan J. M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. Vol. 104, N 1. P. 353–358.
10. Synaptic abnormalities in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease / Mhatre S. D., Satyasi V., Killen M., Paddock B. E., Moir R. D., Saunders A. J., Marenda D. R. // *Dis. Model. Mech.* 2014. Vol. 7. P. 373–385.
11. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects / Chakraborty R., Vepuri V., Mhatre S. D., Paddock B. E., Miller S., Michelson S. J., Delvadia R., Desai A., Vinokur M., Melicharek D. J., Utreja S., Khandelwal P., Ansaloni S., Goldstein Lee E., Moir R. D., Lee J. C., Tabb L. P., Saunders A. J., Marenda D. R. // *PLoS ONE.* 2011. Vol. 6. e20799.
12. Морфологические и функциональные нарушения в нейромышечных контактах *Drosophila melanogaster*, вызванные экспрессией гена *APP* человека / Саранцева С. В., Кислик Г. А., Ткаченко Н. А., Васильев А. Н., Шварцман А. Л. // *Цитология.* 2012. Т. 54, № 5. С. 421–429.
13. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease / Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O., Karaseva E., Rodin D., Schwarzman A. L., Vitek M. P. // *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, N 12. e8191.
14. Collins C. A., DiAntonio A. Synaptic development: insights from *Drosophila* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. Vol. 17, N 1. P. 35–42.

15. Van Dam D., De Deyn P.P. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease // Br. J. Pharmacol. 2011. Vol. 164, N 4. P. 1285–1300.
16. Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions / Stewart B. A., Atwood H. L., Renger J. J., Wang J., Wu C.-F. // J. Comp. Physiol. A. 1994. Vol. 175. P. 179–191.
17. Ramachandran P., Budnik V. Dissection of *Drosophila* larval body-wall muscles // Cold Spring Harb. Protoc. 2010. doi 10.1101/pdb.prot5469.
18. Zhang B., Stewart B. Electrophysiological recording from *Drosophila* larval body-wall muscles // Cold Spring Harb. Protoc. 2010. doi 10.1101/pdb.prot5487.
19. Karunanithi S., Marin L., Wong K., Atwood H. L. Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses // J. Neurosci. 2002. Vol. 22 (23). P. 10267–10276.
20. Long-term in vitro maintenance of neuromuscular junction activity of *Drosophila* larval / Ball R., Xing B., Bonner P., Shearer J., Cooper R. L. // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2003. Vol. 134, N 2. P. 247–255.
21. The resting membrane potential of *Drosophila melanogaster* larval muscle depends strongly on external calcium concentration / Krans J. L., Parfitt K. D., Gawera K. D., Rivlin P. K., Hoy R. R. // J. Insect Physiol. 2010. Vol. 56, N 3. P. 304–313.
22. Van der Kloot W. The regulation of quantal size // Prog. Neurobiol. 1991. Vol. 36, N 2. P. 93–130.
23. Зэфиров А. Л., Петров А. М. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора (экзо — эндоцитозный цикл). Казань: Арт-кафе, 2010. 323 с.
24. Sarantseva S. V., Rodin D. I., Schwarzman A. L. Human APP gene expression in nerve cells of *Drosophila melanogaster* causes alteration of synaptotagmin 1 mRNA level // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2012. Vol. 442. P. 19–21.

References

1. Reinhard C., Hebert S. S., De Strooper B. The amyloid- β precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.*, 2005, vol. 24, no. 2, pp. 3996–4006.
2. Zheng H., Koo E. H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.*, 2006, vol. 1, no. 5, pp. 1–12.
3. O'Brien R. J., Wong P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2011, vol. 34, pp. 185–204.
4. Hoe H.-S., Lee H.-K., Pak D. T. S. The upside APP at synapses. *CNS Neurosci. Ther.*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 47–56.
5. Mukhamed'iarov M. A., Zefirov A. L. Vliianie β -amiloidnogo peptida na funktsii vozbudimykh tkanei: fiziologicheskie i patologicheskie aspekty [The influence of beta-amyloid peptide on the functions of excitable tissues: physiological and pathological aspects]. *Uspekhi fiziol. Nauk* [Advances Fiziol. sciences], 2013, vol. 44, no. 1, pp. 55–71. (In Russian)
6. Tyan S.-H., Shih A. Y.-J., Walsh J. J., Maruyama H., Sarsoza F., Ku L., Eggert S., Hof P. R., Koo E. H., Dickstein D. L. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2012, vol. 51, no. 1–2, pp. 43–52.
7. Seabrook G. R., Smith D. W., Bowery B. J., Easter A., Reynolds T., Fitzjohn S. M., Morton R. A., Zheng H., Dawso G. R., Sirinathsinghi D. J., Davies C. H., Collingridge G. L., Hill R. G. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*, 1999, vol. 38, no. 3, pp. 349–359.
8. Senechal Y., Larmet Y., Dev K. K. Unraveling in vivo functions of amyloid precursor protein: Insights from knockout and knockdown studies. *Neurodegener. Dis.*, 2006, vol. 3, no. 3, pp. 134–147.
9. Ting J. T., Kelley B. G., Lambert J. T., Cook D. G., Sullivan J. M. Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, vol. 104, no. 1, pp. 353–358.
10. Mhatre S. D., Satyasi V., Killen M., Paddock B. E., Moir R. D., Saunders A. J., Marena D. R. Synaptic abnormalities in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Dis. Model. Mech.*, 2014, vol. 7, pp. 373–385.
11. Chakraborty R., Vepuri V., Mhatre S. D., Paddock B. E., Miller S., Michelson S. J., Delvadia R., Desai A., Vinokur M., Melicharek D. J., Utreja S., Khandelwal P., Ansaloni S., Goldstein Lee E., Moir R. D., Lee J. C., Tabb L. P., Saunders A. J., Marena D. R. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6. e20799.

12. Sarantseva S. V., Kislik G. A., Tkachenko N. A., Vasil'ev A. N., Shvartsman A. L. Morfologicheskie i funktsional'nye narusheniia v neiromyshechnykh kontaktakh *Drosophila melanogaster*, vyzvannye ekspressiei gena *APP* cheloveka [Morphological and functional impairment in neuromuscular contacts *Drosophila melanogaster*, caused by the human *APP* gene expression]. *Tsitologiya* [Cytology], 2012, vol. 54, no. 5, pp. 421–429. (In Russian)
13. Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O., Karaseva E., Rodin D., Schwarzman A. L., Vitek M. P. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 12. e8191.
14. Collins C. A., DiAntonio A. Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2007, vol. 17, no. 1, pp. 35–42.
15. Van Dam D., De Deyn P. P. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2011, vol. 164, no. 4, pp. 1285–1300.
16. Stewart B. A., Atwood H. L., Renger J. J., Wang J., Wu C.-F. Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J. Comp. Physiol. A*, 1994, vol. 175, pp. 179–191.
17. Ramachandran P., Budnik V. Dissection of *Drosophila* larval body-wall muscles. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2010. doi 10.1101/pdb.prot5469.
18. Zhang B., Stewart B. Electrophysiological recording from *Drosophila* larval body-wall muscles. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2010. doi 10.1101/pdb.prot5487.
19. Karunanithi S., Marin L., Wong K., Atwood H. L. Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. *J. Neurosci.*, 2002, vol. 22 (23), pp. 10267–10276.
20. Ball R., Xing B., Bonner P., Shearer J., Cooper R. L. Long-term in vitro maintenance of neuromuscular junction activity of *Drosophila* larval. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 2003, vol. 134, no. 2, pp. 247–255.
21. Krans J. L., Parfitt K. D., Gawera K. D., Rivlin P. K., Hoy R. R. The resting membrane potential of *Drosophila melanogaster* larval muscle depends strongly on external calcium concentration. *J. Insect Physiol.*, 2010, vol. 56, no. 3, pp. 304–313.
22. Van der Kloot W. The regulation of quantal size. *Prog. Neurobiol.*, 1991, vol. 36, no. 2, pp. 93–130.
23. Zefirov A. L., Petrov A. M. *Sinapticheskaia vezikula i mekhanizm osvobozhdeniia mediatora (ekzo — endotsitoznyy tsikl)* [Synaptic vesicles and mechanism of neurotransmitter release (exo — endocytosis vesicular cycle)]. Kazan: Art-kafe Publ., 2010, 323 p. (In Russian)
24. Sarantseva S. V., Rodin D. I., Schwarzman A. L. Human *APP* gene expression in nerve cells of *Drosophila melanogaster* causes alteration of synaptotagmin 1 mRNA level. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2012, vol. 442, pp. 19–21.

Статья поступила в редакцию 30 января, принята 31 марта 2015 г.

Сведения об авторах:

Сабурова Екатерина Андреевна — магистр биологии
 Васильев Александр Николаевич — кандидат биологических наук, стажер-исследователь
 Кравцова Виолетта Васильевна — кандидат биологических наук, доцент
 Большакова Ольга Игоревна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
 Саранцева Светлана Владимировна — доктор биологических наук
 Кривой Игорь Ильич — доктор биологических наук, профессор

Saburova Ekaterina A. — Master of Biology
 Vasiliev Alexander N. — Ph.D., Postdoctoral Researcher
 Kravtsova Violetta V. — Ph.D., Associate Professor
 Bolshakova Olga I. — Ph.D., Senior Researcher
 Sarantseva Svetlana V. — Doctor of Biology, Deputy Director for Sciences
 Krivoi Igor I. — Doctor of Biology, Professor