

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ

УДК 577.175.82

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ТРАНСПОРТА ДОФАМИНА  
В НИГРОСТРИАТНЫХ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ,  
КАК ПОКАЗАТЕЛЬ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ И НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ**

© 2019 г. Э. Р. Мингазов<sup>1, \*</sup>, М. В. Угрюмов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 16.05.2018 г.

После доработки 31.05.2018 г.

Принята к публикации 25.06.2018 г.

Одной из причин дегенерации дофаминергических (ДА-ергических) нейронов при болезни Паркинсона является избыточное накопление в цитозоле дофамина (ДА), который окисляясь превращается в цитотоксин. Учитывая то, что содержание ДА в цитозоле является результирующей нескольких процессов, включая везикулярное запасание и обратный захват ДА, целью данной работы явилась оценка экспрессии генов и синтеза белков “везикулярного моноаминового транспортера” 2-го типа (ВМАТ2) и “дофаминового мембранного транспортера” (ДАТ) в нигростриатных ДА-ергических нейронах. Данное исследование проведено на мышах в норме и при дегенерации 29% и 59% нигростриатных ДА-ергических нейронов, вызванной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) – протоксином, который в мозге превращается в токсин. При экстраполяции данных, полученных при исследовании черной субстанции, на нейрон оказалось, что при дегенерации трети нейронов экспрессия гена ДАТ в выживших нейронах увеличивается, а содержание ДАТ снижается, тогда как экспрессия гена ВМАТ2 уменьшается, а содержание ВМАТ2 увеличивается. Снижение содержания ДАТ и увеличение содержания ВМАТ2 свидетельствуют об уменьшении обратного захвата ДА и усилении его везикулярного запасания, что способствует уменьшению цитозольного накопления ДА. При дегенерации большего числа ДА-ергических нейронов в выживших нейронах увеличивается содержание ВМАТ2, что свидетельствует об усилении везикулярного запасания ДА и еще большего снижении риска цитозольного накопления окисленного ДА. При экстраполяции данных, полученных при изучении стриатума, на ДА-ергический аксон оказалось, что содержание ДАТ в сохранившихся аксонах не меняется по сравнению с контролем, а содержание ВМАТ2 снижается, что является показателем уменьшения везикулярного запасания ДА. Учитывая усиление синтеза ДА и не изменившийся уровень обратного захвата ДА, снижение содержания ВМАТ2 должно приводить к накоплению в цитозоле окисленных токсических форм ДА.

*Ключевые слова:* дофаминергические нейроны, мембранный транспортер дофамина, везикулярный транспортер моноаминов 2, нейродегенерация, нейропластичность

DOI: 10.1134/S1027813319010151

**ВВЕДЕНИЕ**

Дофамин (ДА), секретируемый дофаминергическими (ДА-ергическими) нейронами нигростриатной системы мозга, играет ключевую роль в регуляции моторной функции. В свою очередь, нарушение дофаминовой нейротрансмиссии в

стриатуме в результате гибели ДА-ергических нейронов приводит к возникновению болезни Паркинсона, причем моторные нарушения при гибели большей части ДА-ергических нейронов и снижении внутриклеточного и внеклеточного содержания ДА в стриатуме до порога – 30–20% от уровня ДА в норме [1]. Содержание ДА в нейронах и в межклеточном пространстве является результирующей нескольких процессов – синтез ДА в цитозоле, захват ДА из цитозоля в секреторные везикулы с помощью “везикулярного моноаминового транспортера второго типа” (ВМАТ2), выделение ДА путем экзоцитоза секреторных ве-

Список сокращений: ДА-ергические – дофаминергические, ДА – дофамин, ДАТ – мембранный транспортер дофамина, ВМАТ2 – везикулярный транспортер моноаминов 2-го типа, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин;

\* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26, тел.: 8-499-135-8842; e-mail: ed.min-gazov89@gmail.com.

зикул и обратный захват ДА из межклеточного пространства в ДА-ергические нейроны с помощью “дофаминового мембранного транспортера” (ДАТ) [2]. Отсюда следует, что ВМАТ2 и ДАТ являются ключевыми молекулярными маркерами двух сопряженных процессов — запасание-выделение ДА, определяющих уровень цитозольного ДА [2, 3].

Предполагается, что согласованная работа ДАТ и ВМАТ2 в норме не только способствует обеспечению нормальной дофаминовой нейротрансмиссии, но и предотвращает накопление в цитозоле ДА и его окисление в ДА-хиноны — эндогенный токсин, вызывающий дегенерацию ДА-ергических нейронов [4–11]. Эта гипотеза особенно актуальна для понимания этиологии и патогенеза болезни Паркинсона. Более того, глубокое понимание молекулярных механизмов функционирования транспортных систем ДА в ДА-ергических нейронах при болезни Паркинсона, могло бы способствовать разработке нейропротекторной терапии на ранней стадии развития этого тяжелого социально-значимого заболевания — задолго до появления моторных симптомов. Однако, учитывая отсутствие до сих пор диагностики болезни Паркинсона на ранней (до-симптомной) стадии, эти исследования можно проводить только на экспериментальных моделях. При этом особое внимание следует уделить сравнительному анализу экспрессии генов и синтеза ключевых молекул, вовлеченных в транспорт ДА — ВМАТ2 и ДАТ, при различном уровне дегенерации нигростриатной системы — на экспериментальных моделях досимптомной и симптомной стадий паркинсонизма, что и явилось целью данной работы.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались самцы мышей линии С57В1/6 в возрасте 2–2.5 мес. и весом 22–24 г. Мыши содержались в стандартных условиях вивария, со сменной светлой и темной фаз суток 12/12 ч при свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по охране животных Института биологии развития РАН, находящимся в соответствии с национальными и международными требованиями. Для воспроизведения доклинической стадии БП мышам двукратно вводили МФТП (Sigma, США) с 2-ч интервалом в дозе 8 мг/кг, для воспроизведения симптомной стадии — четырехкратно с 2-ч интервалом в дозе 10 мг/кг. Контрольной группе по такой же схеме вводили 0.9% раствор NaCl [12].

Через две нед. после введения МФТП животных декапитировали, извлекали мозг и выделяли стриатум и черную субстанцию согласно ранее описанной методики [13]. Выделенные структуры

взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до пробоподготовки.

Экспрессию генов ДАТ и ВМАТ2 в черной субстанции оценивали методом ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с применением TRI Reagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя. Для удаления примеси геномной ДНК выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (Fermentas, США). РНК переосаждали в 4 М LiCl, концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop8000 (ThermoScientific, США). кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы М-MLV и гексамерных олигонуклеотидов (Fermentas, США). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX (Fermentas, США) и специфических праймеров (“Литех”, Россия): для ДАТ смысловая последовательность 5'-GCCCTGCTTCCTTCTGTATGT-3'; антисмысловая последовательность 5'-CACTAGCTGGCGGTCTTCTCA-3'; для ВМАТ2 смысловая последовательность 5'-ACCCGGGCAGTGTG-GAGAT-3'; антисмысловая последовательность 5'-CTGGGAATGATGGGAАCTACGAC-3'. Значения, полученные для каждого образца, нормировали на экспрессию гена “домашнего хозяйства” HPRT. Уровень экспрессии гена HPRT определяли с использованием праймеров: смыслового — 5'-GCTAATCACGACGCTGGGACTGC-3' и антисмыслового — 5'-GCTAATCACGACGCTGGGACTGC-3'. Относительную экспрессию гена рассчитывали методом  $\Delta\Delta\text{Ct}$  с учетом эффективности ПЦР. Эффективность ПЦР определяли методом построения стандартных кривых [14].

Содержание белков ДАТ и ВМАТ2 оценивали методом Вестерн-блоттинга. Образцы черной субстанции и стриатума гомогенизировали в RIPA буфере содержащим 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.5% дезоксихолатанатрия, 0.1% лаурилсульфатомнатрия (SDS), 50 мМ Tris (pH8), (Sigma, США), леупептин (0.5 мкг/мл), пентостатин (1 мкг/мл), апротинин (1 мкг/мл). Затем смесь центрифугировали 20 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$  и 12000 g и определяли концентрацию общего белка в супернатанте методом BCA [15] с помощью набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США). После этого образцы денатурировали в SLB-буфере 5 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ . Электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [16] в камере для вертикального электрофореза Mini-Protein Tetra System (BioRad, США). На дорожки наносили одинаковое количество белка (20–40 мкг в зависимости от эксперимента), в качестве маркеров молекулярных масс использовали коммерческий препарат (Fermentas Page Ruler, Германия). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в течение

1 ч. Качество переноса оценивали после окрашивания Понсо С по ранее опубликованной методике [17]. Для предотвращения неспецифической сорбции антител мембраны блокировали 5% молоком на TNT буфере (10 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20). Далее мембраны последовательно инкубировали: а) в TNT буфере, содержащем 1% обезжиренного молока, антитела крысы к ДАТ (1 : 300, Santa Cruz Biotechnology, США) или антитела кролика к VMAT2 (1 : 200, Phoenix Pharmaceuticals, США) 2 ч при +4°C; б) с козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена к иммуноглобулинам крысы или кролика (1 : 50000, JacksonImmunoResearchLab, США). После инкубации мембраны несколько раз промывали в TNT буфере и проявляли стандартным методом усиленной хемилюминесценции (ECL) с помощью набора Amersham (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, США). Рентгеновские пленки сканировали, и полученные изображения обрабатывали в стандартной программе ImageJ, оценивая интегральное поглощение белковых полос. Результаты определения уровня экспрессии исследованных веществ были нормированы на общее содержание белка.

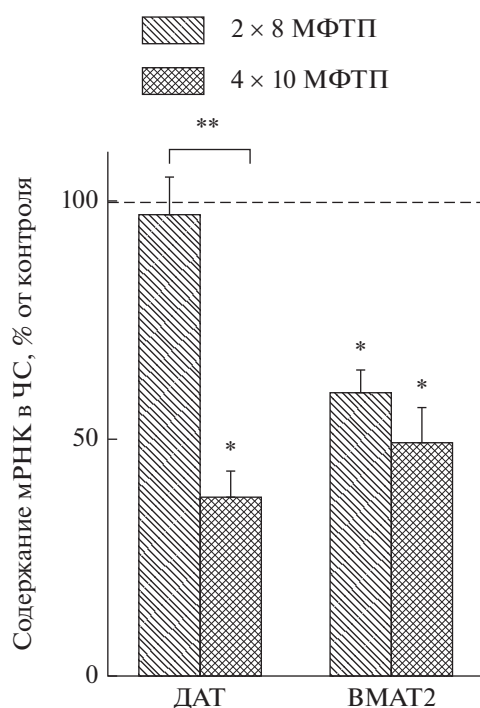
Для определения статистической значимости полученных данных использовали двухфакторный дисперсионный анализ (2-way ANOVA), с последующим использованием теста Тьюки для множественного сравнения средних, в программе GraphPadPrismVersion 5.0 (GraphPadSoftware, США). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что содержание мРНК ДАТ в черной субстанции у мышей на досимптомной стадии паркинсонизма не изменяется по сравнению с контролем, тогда как на симптомной стадии снижается на 63% (рис. 1). Содержание мРНК VMAT2 на досимптомной и симптомной стадиях снижено соответственно на 41 и 51% (рис. 1).

Экспрессия белка ДАТ в черной субстанции у мышей при паркинсонизме снижена по сравнению с контролем — на 48% на досимптомной стадии и на 28% на симптомной стадии (рис. 2). В стриатуме у мышей на досимптомной и симптомной стадиях паркинсонизма экспрессия белка ДАТ была снижена по сравнению с контролем соответственно на 35 и 58% (рис. 3).

В черной субстанции экспрессия белка VMAT2 достоверно не изменялась по сравнению с контролем на обеих стадиях паркинсонизма (рис. 2), тогда как в стриатуме на досимптомной стадии экспрессия VMAT2 снижается на 45%, а

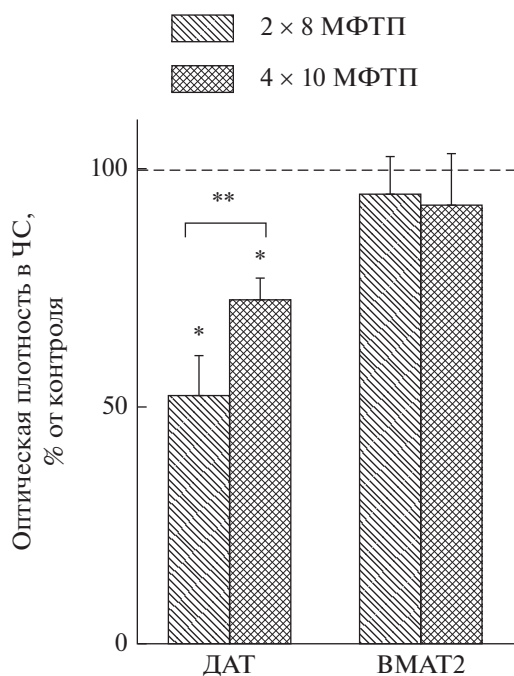


**Рис. 1.** Содержание мРНК дофаминового мембранного транспортера (ДАТ) и везикулярного моноаминового транспортера второго типа (VMAT2) в черной субстанции (ЧС) у мышей после двукратного введения МФТП в разовой дозе 8 мг/кг (досимптомная стадия) или четырехкратного введения МФТП в разовой дозе 10 мг/кг (симптомная стадия). Пунктирная линия — контроль. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем. \*\* $p < 0.05$  по сравнению с выбранным параметром.

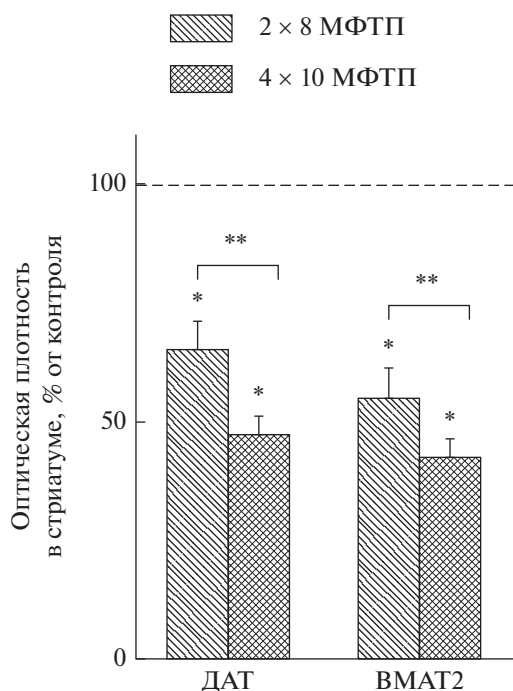
на симптомной стадии на — 53% по сравнению с контролем (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа продолжает наши исследования клеточных и молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности DA-ергических нейронов nigrostriатной системы мозга в норме и при выраженной в различной степени функциональной недостаточности этой системы у мышей при МФТП-вызванном паркинсонизме — на досимптомной и ранней симптомной стадиях [12, 13]. Для воспроизведения досимптомной стадии МФТП вводили подкожно дважды с интервалом два часа в разовой дозе 8 мг/кг, а для воспроизведения симптомной стадии — четырежды в разовой дозе 10 мг/кг. При этом в предыдущих работах было показано, что после двукратного введения МФТП происходит потеря 29% тел нейронов в черной субстанции, 59% аксонов в стриатуме и снижение концентрации ДА в стриатуме на 56% при отсутствии нарушения моторики (досимптомная стадия). При четырехкратном вве-



**Рис. 2.** Содержание дофаминового мембранного транспортера (ДАТ) и везикулярного моноаминового транспортера второго типа (ВМАТ2) в черной субстанции (ЧС) у мышей после двукратного введения МФТП в разовой дозе 8 мг/кг (досимптомная стадия) или четырехкратного введения МФТП в разовой дозе 10 мг/кг (симптомная стадия). Пунктирная линия – контроль. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем. \*\* $p < 0.05$  по сравнению с выбранным параметром.



**Рис. 3.** Содержание дофаминового мембранного транспортера (ДАТ) и везикулярного моноаминового транспортера второго типа (ВМАТ2) в стриатуме мышей после двукратного введения МФТП в разовой дозе 8 мг/кг (досимптомная стадия) или четырехкратного введения МФТП в разовой дозе 10 мг/кг (симптомная стадия). Пунктирная линия – контроль. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем. \*\* $p < 0.05$  по сравнению с выбранным параметром.

дении МФТП происходит снижение уровня ДА в стриатуме на 75% и потеря 43% тел нейронов, что приводит к нарушению моторного поведения (симптомная стадия) [12, 13].

Функциональное состояние нигростриатной системы в данной работе оценивали через две недели после введения МФТП, т.е. примерно через 12 дней после того, как заканчивается дегенерация ДА-ергических нейронов и доминируют компенсаторные процессы [18]. Если в предыдущих работах нами изучено изменение синтеза ДА в выживших ДА-ергических нейронах после действия МФТП [13, 14], то в данной работе дана оценка экспрессии генов и синтеза белков ДАТ и ВМАТ2 – молекулярных маркеров транспорта ДА. Экспрессию генов ДАТ и ВМАТ2 оценивали в черной субстанции, где расположены тела ДА-ергических нейронов, а содержание (синтез) белков этих транспортеров оценивали как в черной субстанции, так и в стриатуме, куда проецируются ДА-ергические аксоны из черной субстанции. Следует иметь в виду, что, в отличие от ДАТ, ВМАТ2 в стриатуме содержится не только в ДА-ергических аксонах, но также в норадренергических и серотонинергических аксонах. Однако содержанием ВМАТ2 в недофаминергических аксонах в стриату-

ме можно пренебречь, т.к. их количество несоизмеримо меньше, чем количество ДА-ергических аксонов [19].

У мышей на досимптомной стадии паркинсонизма в черной субстанции, несмотря на потерю трети тел ДА-ергических нейронов, не было выявлено изменений в экспрессии гена ДАТ, тогда как содержание белка ДАТ было снижено. В отличие от гена ДАТ, в черной субстанции значительно снижена экспрессия гена ВМАТ2, содержание белка ВМАТ2 сохраняется на уровне контроля. Подсчет в нашем ранее проведенном исследовании числа тел ДА-ергических нейронов в черной субстанции и ДА-ергических аксонов в стриатуме у мышей в норме, а также на досимптомной и симптомной стадиях паркинсонизма [12], позволяют экстраполировать данные, относящиеся к черной субстанции в целом, на тело нейрона. При этом оказалось, что на досимптомной стадии экспрессия гена ДАТ в отдельных нейронах увеличивается на 51%, а содержание белка ДАТ снижается на 30%. Прямо противоположенные данные были получены в отношении ВМАТ2 – экспрессия гена на нейрон уменьшилась на 18%, а содержание белка ВМАТ2 увеличилось на 25%. Снижение содержания белка ДАТ и увеличение содер-

жания белка VMAT2 в нейроне свидетельствуют соответственно об уменьшении обратного захвата ДА и усилении его везикулярного запасаения. На фоне усиления синтеза ДА в телах нейронов на досимптомной стадии [13], предполагаемое нами усиление везикулярного запасаения ДА и снижение его обратного захвата должны предотвращать цитозольное накопление ДА и его превращение в токсин – ДА-хиноны. Другими словами, повышение уровня VMAT2 и снижение уровня ДАТ, по всей вероятности, способствуют нейропротекции, хотя приводят к снижению внеклеточной концентрации ДА и, возможно, к нарушению нейротрансмиссии.

Особый интерес представляет наблюдаемое в данной работе рассогласование транскрипции и трансляции ДАТ и VMAT2. Аналогичные рассогласования обнаружены и по отношению к другим функционально значимым белкам, например, по отношению к ТГ при нейродегенеративных заболеваниях [13, 20]. Увеличение уровня мРНК ТГ при отсутствии изменения в содержании белка ТГ было описано Leviel et al. [21] при действии форсколина – активатора аденилатциклазы, на черной субстанции. Данный эффект авторы объясняют тем, что считывание информации с мРНК происходит при помощи мультитрибосом, на которые “не загружается” повышенное число копий мРНК для дальнейшей трансляции [20].

У мышей на симптомной стадии паркинсонизма экспрессия гена и белка VMAT2 в черной субстанции сохраняется на том же уровне, что при более низком уровне деградации нигростриатной системы. В отличие от VMAT2, на симптомной стадии экспрессия гена ДАТ значительно снижается, а содержание белка ДАТ увеличивается, но не достигает контрольного уровня. При экстраполяции полученных данных на нейрон становится очевидным, что на симптомной стадии по сравнению с досимптомной экспрессия гена VMAT2 не меняется, а содержание белка VMAT2 возрастает. Эти данные позволяют предположить усиление везикулярного запасаения ДА и, таким образом, снижение риска избыточного накопления в цитозоле окисленных форм ДА, обладающих цитотоксическим действием. С другой стороны, эти же данные свидетельствуют о потенциальной способности нейронов к компенсаторному массивированному выделению ДА экзоцитозом везикул в ответ на деполаризацию мембраны, что показано в нашем предыдущем исследовании [21].

При экстраполяции данных, относящихся к ДАТ, на нейрон становится очевидным, что у мышей на симптомной стадии по сравнению с досимптомной стадией снижается экспрессия гена ДАТ, однако при этом зеркально возрастает содержание (синтез) белка ДАТ. Увеличение содержания ДАТ в нейронах должно приводить, с од-

ной стороны, к цитозольному накоплению ДА и его окислению в ДА-хиноны – токсин ДА-ергических нейронов, а с другой – к снижению межклеточной концентрации ДА и, таким образом, к нарушению нейротрансмиссии. В обоих случаях увеличение содержания ДАТ в нейронах следует рассматривать как показатель функциональной декомпенсации и, возможно, как триггер нарушения моторики.

Следует подчеркнуть, что наша нейротоксическая модель паркинсонизма на симптомной стадии полностью воспроизводит по выбранным нами молекулярным маркерам транспорта ДА патогенетические процессы при болезни Паркинсона. Так, у больных в черной субстанции обнаружено снижение экспрессии генов и синтезов ДАТ и VMAT2 [22, 23].

С функциональной точки зрения особый интерес представляют данные, полученные при изучении стриатума, т.к. именно в этом отделе нигростриатной системы ДА играет ключевую роль в регуляции моторного поведения. В данной работе показано снижение содержания VMAT2 и ДАТ в стриатуме у мышей на досимптомной стадии паркинсонизма по сравнению с контролем, что согласуется с данными, полученными на обезьянах с помощью позитронно-эмиссионной томографии при моделировании той же стадии паркинсонизма [24] и на больных при БП [25–28].

При экстраполяции данных полученных при изучении стриатума на аксон, оказалось, что внутриаксональное содержание ДАТ на обеих стадиях паркинсонизма не меняется по сравнению с контролем, в то время как содержание VMAT2 на обеих стадиях снижается примерно на треть. Учитывая то, что содержание VMAT2 в телах нейронов увеличено у мышей на обеих стадиях паркинсонизма, снижение внутриаксонального содержания VMAT2, вероятно, обусловлено нарушением аксоплазматического транспорта, что было также отмечено в предыдущих работах при моделировании болезни Паркинсона [13, 29].

Снижение внутриаксонального содержания VMAT2 является показателем уменьшения везикулярного запасаения ДА. На фоне обнаруженного ранее усиления синтеза ДА [13] и неизменного уровня обратного захвата ДА (см. “Результаты”), снижение содержания VMAT2 должно приводить к накоплению цитозольного ДА и появлению его окисленных форм, и вызывать дегенерацию ДА-ергических нейронов. Это предположение хорошо согласуется с предыдущими исследованиями, проведенными на трансгенных мышах, у которых экспрессируется лишь 5% VMAT2 по сравнению с нормальными мышами. У трансгенных мышей к 8–10 мес. жизни наблюдается деградация ДА-ергической нигростриатной системы на фоне агрегации альфа-синуклеина – ключевого маркера

БП [8, 30, 31]. Снижение содержания молекул ВМАТ2 в мембране везикул обнаружено также при оценке скорости захвата ДА в везикулы у пациентов при БП [33], что является прямым доказательством снижения везикулярного запаса ДА. По мнению ряда авторов, дефицит ВМАТ2 является одной из причин возникновения БП [3]. В этом контексте, ВМАТ2 при БП является потенциальной мишенью для фармакотерапии, направленной на компенсацию дефицита этого белка.

Таким образом, повышение внутринейронального содержания ВМАТ2 и снижение содержания ДАТ в ДА-ергических нейронах при компенсаторном усилении синтеза ДА предотвращают гибель ДА-ергических нейронов, снижая риск избыточного накопления цитозольного ДА и его превращения в цитотоксин.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ (17-04-00479).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agid Y. // *Lancet*. 1991. V. 337. № 8753. P. 1321–1324.
2. Storch A., Ludolph A.C., Schwarz J. // *J. Neural Transm.* 2004. V. 111. № 10–11. P. 1267–1286.
3. German C.L., Baladi M.G., McFadden L.M., Hanson G.R., Fleckenstein A.E. // *Pharmacol Rev.* 2015. V. 67. № 4. P. 1005–1024.
4. Nirenberg M.J., Chan J., Liu Y., Edwards R.H., Pickel V.M. // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. № 13. P. 4135–4145.
5. Erickson J.D., Eiden L.E. // *J. Neurochem.* 1993. V. 61. № 6. P. 2314–2317.
6. Sulzer D., Zecca L. // *Neurotox. Res.* 1999. V. 1. № 3. P. 181–195.
7. Nirenberg M.J., Chan J., Liu Y., Edwards R.H., Pickel V.M. // *Adv. Pharmacol.* 1997. V. 42. P. 240–243.
8. Mooslehner K.A., Chan P.M., Xu W., Liu L., Smadja C., Humby, T., Emson P. C. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. № 16. P. 5321–5331.
9. Caudle W.M., Richardson J.R., Wang M.Z., Taylor T.N., Guillot T.S., McCormack A.L., Miller G. W. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 30. P. 8138–8148.
10. Salahpour A., Ramsey A.J., Medvedev I.O., Kile B., Sotnikova T.D., Holmstrand E., Sesack S.R. // *PNAS.* 2008. V. 105. № 11. P. 4405–4410.
11. Masoud S.T., Vecchio L.M., Bergeron Y., Hossain, M. M., Nguyen L.T., Bermejo M.K., Wightman R.M. // *Neurobiol. Dis.* 2015. V. 74. P. 66–75.
12. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Pronina T.S. // *Neuroscience.* 2011. V. 181. P. 175–188.
13. Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G., Kucheryanu V.G., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N., Ugrumov M.V. // *J. Neurol. Sci.* 2014. V. 340. № 1. P. 198–207.
14. Bookout A.L., Cummins C.L., Mangelsdorf D.J., Pesola J.M., Kramer M.F. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2006. P. 8–15.
15. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M., Klenk D.C. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 150. № 1. P. 76–85.
16. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
17. Romero-Calvo I., Ocón B., Martínez-Moya P., Suárez M.D., Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., de Medina F.S. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 401. № 2. P. 318–320.
18. Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. // *Нейрохимия.* 2014. Т. 31. № 3. С. 225–235.
19. De Deurwaerdère P, Di Giovanni // *Prog. Neurobiol.* V. 151. P. 175–236.
20. Leviel V., Guibert B., Mallet J., Faucon-Biguier N. // *J. Neurosci. Res.* 1991. V. 30. № 2. P. 427–432.
21. Хакимова Г.П., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. // *Нейрохимия.* 2011. Т. 28. № 1. С. 42–48.
22. Harrington K.A., Augood S.J., Kingsbury A.E., Foster O.J.F., Emson, P.C. // *Mol. Brain Res.* 1996. V. 36. № 1. P. 157–162.
23. Uhl G.R., Walther D., Mash D., Faucheux B., Javoy-Agid F. // *Ann. Neurol.* 1994. V. 35. № 4. P. 494–498.
24. Blesa J., Pifl C., Sánchez-González M.A., Juri C., García-Cabezas, M.A., Adán R., Rodríguez-Oroz M.C. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 48. № 1. P. 79–91.
25. Miller G.W., Staley J.K., Heilman, C.J., Perez J.T., Mash D.C., Rye D.B., Levey A.I. // *Ann. Neurol.* 1997. V. 41. № 4. P. 530–539.
26. Miller G.W., Erickson J.D., Perez J.T., Penland S.N., Mash D.C., Rye D.B., Levey A.I. // *Exp. Neurol.* 1999. V. 156. № 1. P. 138–148.
27. Wilson J.M., Levey A.I., Rajput A., Ang L., Guttman M., Shannak K., Kish S.J. // *Neurology.* 1996. V. 47. № 3. P. 718–726.
28. Okamura N., Villemagne V.L., Drago J., Pejaska S., Dhamija R.K., Mulligan R.S., Kung H.F. // *J. Nucl Med.* 2010. V. 51. № 2. P. 223–228.
29. Hinckelmann M.V., Zala D., Saudou F. // *Trends Genet.* 2013. V. 23. № 12. P. 634–643.
30. Takahashi N., Miner L.L., Sora I., Ujike H., Revay R.S., Kostic V., Uhl G.R. // *PNAS.* 1997. V. 94. № 18. P. 9938–9943.
31. Patel, J., Mooslehner, K. A., Chan, P. M., Emson, P. C., Stamford, J. A. // *J. Neurochem.* 2003. V. 85. № 4. P. 898–910.
32. Pifl C., Rajput A., Reither H., Blesa J., Cavada C., Obeso J.A., Hornykiewicz O. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 24. P. 8210–8218.

## Molecular Markers of Dopamine Transport in Nigrostriatal Dopaminergic Neurons as an Index of Neurodegeneration and Neuroplasticity

E. R. Mingazov<sup>a</sup> and M. V. Ugryumov<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia*

Excessive accumulation of cytosolic dopamine (DA) which becomes cytotoxic after oxidation causes degeneration of dopaminergic (DA-ergic) neurons in Parkinson's disease. The cytosolic DA content is a result of several processes, including vesicular deposition and DA re-uptake. Taking this into account, in the present study, we examined expression of genes and proteins of type 2 vesicular monoamine transporter (VMAT2) and DA membrane transporter (DAT) in nigrostriatal DA-ergic neurons. We studied normal mice and mice with 29 or 59% degeneration of DA-ergic neurons induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine (MPTP), a precursor which is converted into toxin in the brain. When extrapolating data of the study in the substantia nigra to the neuron, we showed that the degeneration of one third of neurons resulted in the increased expression of DAT gene in survived neurons and the reduced content of DAT; however, the expression of gene decreased whereas the content of VMAT2 increased. The decrease in the content of DAT and the increase in the content of VMAT2 indicate a decrease in DA reuptake and an increase in DA vesicular storage, which contributes to a decrease in cytosol accumulation of DA. Degeneration of larger number of DA-ergic neurons was followed by the increased content of VMAT2, which indicates an increase in vesicular storage and even greater reduction in the risk of cytosolic accumulation of oxidized DA. When extrapolating the data of the study in the striatum to the DA-ergic axon, we found that the content of DAT in the preserved axons did not change compared to the control, whereas the content of VMAT2 decreased, which indicates a decrease in vesicular storage of DA. Given the increased DA synthesis and the unchanged level of DA reuptake, a decrease in the content of VMAT2 should lead to the accumulation of oxidized toxic forms of DA in the cytosol.

*Keywords: dopaminergic neurons, membrane dopamine transporter, vesicular monoamine transporter 2, neurodegeneration, neuroplasticity*