

## Локализация общего и фосфорилированного $\alpha$ -синуклеина в периферической нервной системе интактных крыс (тестирование антител разных клонов)

Д.Н. Воронков, О.В. Сальникова, Р.М. Худоерков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

Контактная информация: Воронков Дмитрий Николаевич, voronkovdm@gmail.com

---

Развитию двигательных симптомов при болезни Паркинсона предшествует накопление  $\alpha$ -синуклеина в периферической нервной системе, что позволяет рассматривать  $\alpha$ -синуклеин как биомаркер этой патологии. Вместе с тем, для совершенствования экспериментальных моделей и разработки эффективных диагностических тестов требуются более точные знания о локализации  $\alpha$ -синуклеина в норме. Иммуногистохимически в периферической нервной системе интактных крыс исследовали локализацию  $\alpha$ -синуклеина и вариант его формы, фосфорилированной по остатку серина 129, с помощью панели антител разных производителей и обнаружили его локализацию в пресинаптических нервных окончаниях дорсальных рогов спинного мозга, в телах нейронов превертебральных ганглиев, сплетениях стенок сосудов и GFAP-негативных глиальных клетках. Разные антитела к фосфорилированному  $\alpha$ -синуклеину давали неоднозначную реакцию: у отдельных нейронов спинального ганглия окрашивались тела клеток, их отростки и ядра, но ни одно из изучаемых антител не давало реакцию связывания в мелких ноцицептивных неперепетидергических нейронах. Неоднозначность результатов может быть обусловлена как разной доступностью эпитопов, выявляемых антителами при взаимодействиях  $\alpha$ -синуклеина с другими белками, так и в результате неспецифического связывания антител с неидентифицированными мишенями.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -синуклеин, периферическая нервная система, спинальный ганглий, крыса, иммуногистохимия.

---

### Введение

Альфа-синуклеин ( $\alpha$ -Syn) – белок, широко распространенный в нервной системе. Внимание исследователей к роли  $\alpha$ -Syn в патогенезе нейродегенеративных заболеваний привлекло обнаружение его фрагмента в составе амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера [21] и выявление фосфорилированного  $\alpha$ -Syn как основного компонента телесцев Леви – нейрональных включений, характерных для болезни Паркинсона (БП) [5]. Мутации гена  $\alpha$ -Syn (SNCA) ассоциированы с БП, а его нокаут приводит к синаптической дисфункции в

нигростриатной системе, нарастающей с возрастом [3]. В связи со способностью  $\alpha$ -Syn к формированию токсических олигомерных форм и образованию внутриклеточных нерастворимых агрегатов, считается, что прионоподобное распространение патологических форм белка от нейрона к нейрону может являться причиной прогрессирования нейродегенеративного процесса при БП, мультисистемной атрофии и др. заболеваниях, относимых к синуклеинопатиям [5, 21].

Функции  $\alpha$ -Syn и характер его молекулярных взаимодействий до настоя-

щего времени полностью не выяснены. Обнаружены сплайсинговые варианты белка и посттрансляционные модификации С-концевого фрагмента, в т.ч. и его фосфорилированная форма [8, 17, 18]. Показано взаимодействие  $\alpha$ -Syn с белками, ассоциированными с микротрубочками, синаптическими везикулами и митохондриальными мембранами [8, 21]. При этом данные о его внутриклеточной локализации разнятся: наряду с пресинаптической, описывают ядерную, перинуклеарную и митохондриальную, в зависимости от используемых антител [12, 14, 18, 22, 24]. Медиаторные характеристики нейронов, содержащих  $\alpha$ -Syn, могут быть различными, что указывает на его локализацию в катехоламинергических, холинергических и ГАМК-ергических нервных окончаниях [21, 22].

Повышенное содержание в нейронах  $\alpha$ -Syn, фосфорилированного по остатку серина 129 (Ser-129), обнаруживается в патологических условиях [19, 21]. Предполагается, что фосфорилирование служит сигналом для протеасомного расщепления  $\alpha$ -Syn и снижает образование его нерастворимых агрегатов [4, 8], но увеличивает формирование его токсических олигомерных форм [16]. В нормальных условиях содержание  $\alpha$ -Syn в фосфорилированной форме составляет в мозге около 4-5%, и наблюдается динамическое равновесие процесса фосфорилирования и дефосфорилирования белка, по-видимому, имеющее значение для его связывания с мембранами [4, 17]. В целом функциональное значение фосфорилирования  $\alpha$ -Syn остается предметом дискуссии [19, 21].

Вероятно, накопление  $\alpha$ -Syn при идиопатической БП начинается в структу-

рах периферической нервной системы, в особенности – в энтеральных сплетениях [6], также выявлено образование его агрегатов и в чувствительных нервных окончаниях кожи [11]. В связи с этим предпринимаются попытки клинико-морфологических исследований на биопсийном материале больных [1, 2, 11] для обоснования возможности ранней патоморфологической диагностики БП.

Учитывая необходимость совершенствования подходов к анализу патологической агрегации  $\alpha$ -Syn в эксперименте и особенности его различной локализации, выявленные разными исследователями, **целью** настоящей работы стало охарактеризовать и уточнить локализацию  $\alpha$ -синуклеина и его фосфорилированной формы в спинальных ганглиях и сопоставить результаты, полученные с помощью антител разных производителей.

### Материалы и методы

Исследовали интактных самцов крыс Wistar (n=5, масса 280-300 г), полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в условиях свободного доступа к воде и корму с 12-часовым циклом освещения. Эксперименты выполняли в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными (директива Совета Европейского Союза от 24.11.1986 г., 86/609/ЕЕС, Национальный стандарт РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Крыс наркотизировали хлоралгидратом («Sigma», 350 мг/кг), декапитировали гильотиной и выделяли тройничный ганглий, спинной мозг со спинальными ганглиями на уровне CVII - ThIII и

чрежное сплетение. Образцы нервной ткани фиксировали 24 ч в 4% нейтральном формалине, промывали проточной водой и проводили через изопропанол для заливки в парафин или пропитывали средой Tissue Tek O.C.T для изготовления замороженных срезов. Срезы толщиной 10-15 мкм готовили на санном микротоме SR2000 («Leica», ФРГ) или криостате Tissue Tek Cryo3 («Sakura», США) и раскладывали на покрытые желатином стекла.

Антигены в срезах демаскировали, помещая их в цитратный буфер, с помощью тепловой обработки на протяжении 5-ти мин в микроволновой печи при температуре 90-95°C или в концентрированной муравьиной кислоте. Характер окрашивания, полученного при разных методах демаскировки, не различался. Для выявления нефосфорилированного  $\alpha$ -Syn применяли поликлональные кроличьи антитела Sigma (S3062). Для выявления  $\alpha$ -Syn, фосфорилированного по Ser-129, использовали моноклональные антитела разных производителей:

1) мышинные Abcam (кат. № ab184674) и Biolegend (кат. № 825701), относящиеся к одному клону P-syn/81A;

2) мышинные Wako (кат. № 015-25191), обозначаемые производителем как P-syn #64;

3) кроличьи Abcam (кат. № ab51253), клон EP1536Y.

Для всех антител производителями было указано специфическое связывание как с крысиным, так и с человеческим  $\alpha$ -Syn. Астроциты выявляли при помощи антител к кислому глиофибрилярному белку (GFAP, мышинные, моноклональные, конъюгированные с флуорохромом Cy3, «Sigma»). Субпопуляцию ноцицептивных, непепти-

дергических нейронов локализовали по связыванию с биотинилированным лектином IB4 («Sigma»). Растворы антител и лектина готовили на фосфатном солевом буфере (0,01 М, pH=7,2), содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X100. Продукт иммуногистохимической реакции визуализировали посредством соответствующих вторичных антител (1:150, «Sigma»), меченых флуорохромами CF448 или CF555, а связывание лектина выявляли при помощи стрептавидина, конъюгированного с Texas Red («Sigma»). Все иммуногистохимические реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителей антител, часть срезов докрашивали диамидинофенилиндолом (DAPI), после чего заключали в среду FluoroShield («Immunobioscience corp.»). При выполнении негативного контроля на срезы наносили только вторичные антитела. Позитивный контроль для антител к  $\alpha$ -Syn проводили на аутопсийных срезах черной субстанции мозга человека с БП: все использованные антитела выявляли агрегированный  $\alpha$ -Syn в тельцах и нейритах Леви [2]. Препараты исследовали и документировали под микроскопом «Nikon Eclipse Ni-u», оснащенным цифровой фотокамерой «Nikon Ds-Qi1» (1,5 Мп), при увеличении объектива x40 и x100.

### Результаты и их обсуждение

Поликлональные антитела Sigma на общий  $\alpha$ -Syn выявили его преимущественно в телах малых и средних размеров нейронов тройничного и спинального ганглиев (рис. 1А). Наиболее интенсивно окрашивалась цитоплазма в телах и отростках норадренергических нейро-

нов чревного сплетения. Также  $\alpha$ -Syn обнаружили в нервных сплетениях стенок сосудов, в цитоплазме сателлитной глии и в глиальных клетках нервных пучков. При этом совместную локализацию GFAP и  $\alpha$ -Syn не выявили (рис. 1Г).

В спинном мозге локализация  $\alpha$ -Syn соответствовала пресинаптическим

окончаниям сенсорных нейронов спинального ганглия дорсальных рогов спинного мозга: окрашивались нервные окончания в I-II пластинах Рекседа (рис. 2). При совместном окрашивании на  $\alpha$ -Syn и лектин IB4 выявили, что области окрашивания перекрывались лишь частично (рис. 2Г-Е). Согласно

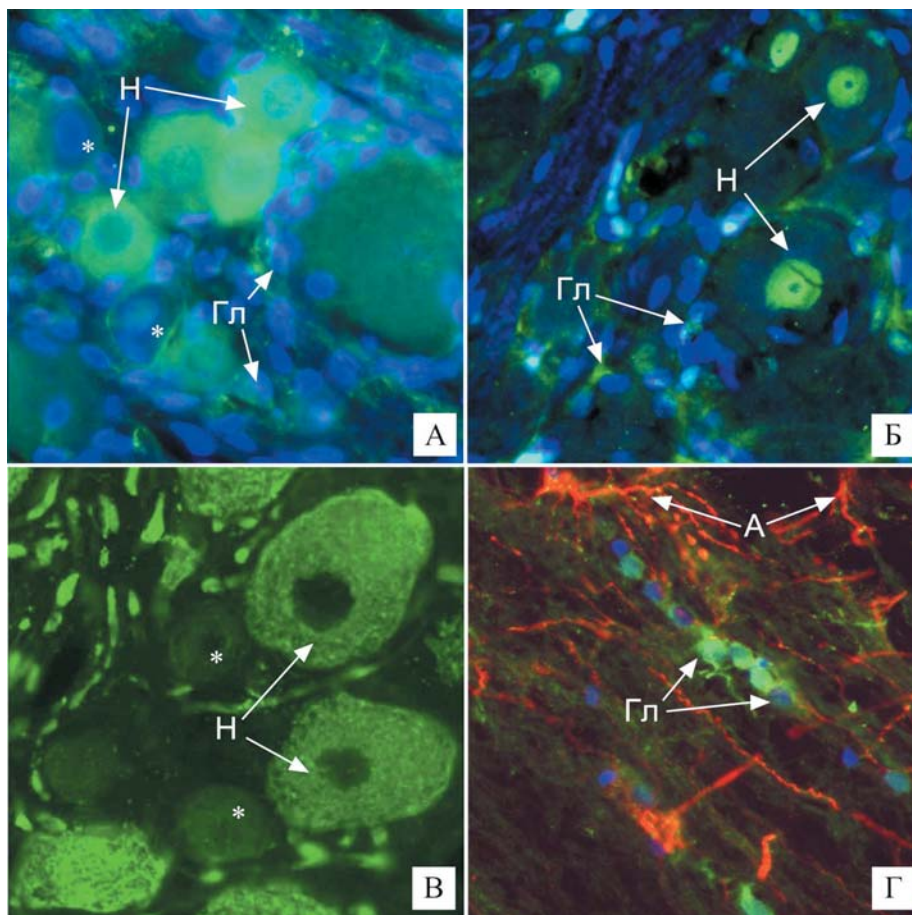


Рис. 1. Различия внутриклеточной локализации  $\alpha$ -Syn и его фосфорилированной формы, выявляемой разными антителами в спинальном ганглии: А – перинуклеарное окрашивание, реакция с антителами к общему  $\alpha$ -Syn; Б – ядерное окрашивание, реакция с антителами SynP#64 к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn; В – перинуклеарное окрашивание, реакция с антителами P-syn/81A к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn; Г – окрашивание GFAP-негативных глиоцитов, реакция с антителами к общему  $\alpha$ -Syn (зеленым), GFAP (красным).

Обозначения: Н –  $\alpha$ -Syn позитивные нейроны; \* –  $\alpha$ -Syn негативные нейроны; Гл –  $\alpha$ -Syn позитивные глиоциты; А – отростки GFAP-позитивной глии; стрелками показаны  $\alpha$ -Syn негативные нейроны. Ядра клеток на А, Б, Г докрашены DAPI (синим). Ув.  $\times 40$ .

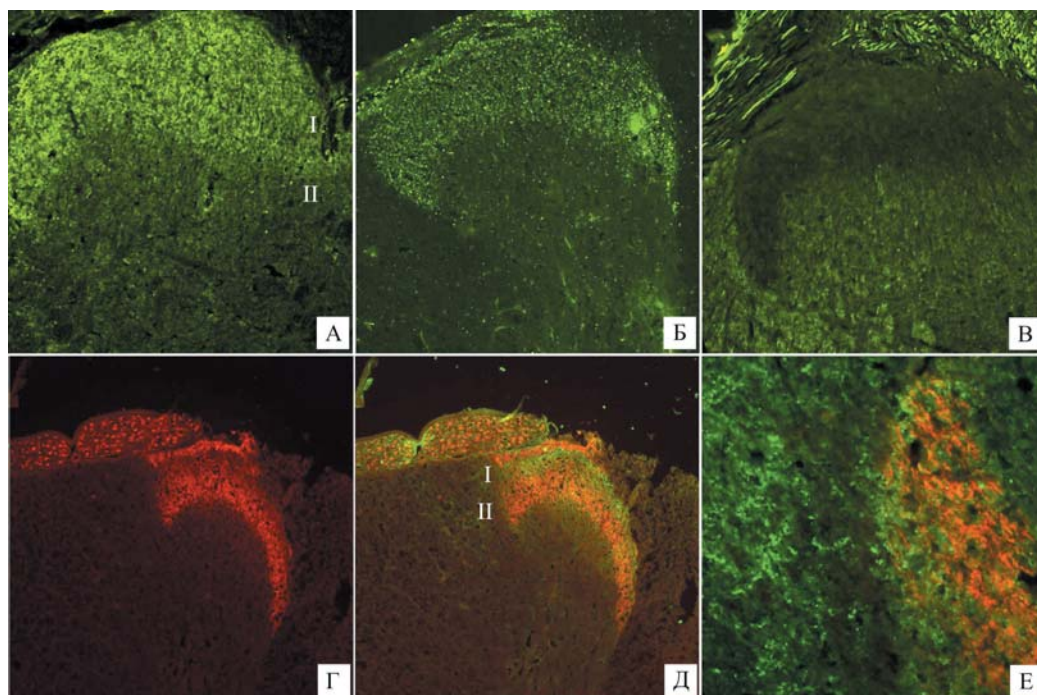


Рис. 2. Пресинаптическая локализация  $\alpha$ -Syn и его фосфорилированной формы, выявляемая в дорсальных рогах спинного мозга: А – реакция с антителами к нефосфорилированному  $\alpha$ -Syn; Б – реакция с антителами EP1536Y к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn; В – реакция с антителами P-syn/81A к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn; Г, Д, Е – локализация IB4-позитивных окончаний и  $\alpha$ -Syn в дорсальных рогах спинного мозга (Г – красный канал, лектин IB4, Д – совмещенное изображение, зеленый канал – нефосфорилированный  $\alpha$ -Syn, Е – фрагмент рис. Д, ув. x100). Обозначения: I, II – пластины по Рекседу. А, Б, В, Г, Д – ув. x40.

нашим результатам, отростки нейронов, связывающих IB4, в основном приходят во внутреннюю часть пластины II дорсальных рогов спинного мозга, тогда как распределение  $\alpha$ -Syn преимущественно соответствует IB4-негативным окончаниям, приходящим во внешнюю часть пластины II и первую пластину Рекседа, что, по данным литературы, согласуется с проекциями пептидергических нейронов [7]. Следовательно, окончания большинства пептидергических (IB4-негативных) нейронов, по-видимому, характеризуются высоким содержанием  $\alpha$ -Syn, тогда как в популяции

непептидергических нейронов его экспрессия незначительна или отсутствует.

Использованные нами моноклональные антитела к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn не всегда давали однотипную реакцию (рис. 1). Сходную локализацию с общим  $\alpha$ -Syn наблюдали при применении антител EP1536Y, однако интенсивность окрашивания пресинаптических окончаний (рис. 2Б) и тел сенсорных нейронов при этом была более слабой, хотя тела глиальных клеток выявлялись отчетливо. У части нейронов спинального ганглия антитела EP1536Y и P-syn#64 давали однотипную реакцию

с компонентами клеточных ядер, но в др. структурах ПНС антитела P-syn#64 при исследовании сходных разведений реакции связывания не выявляли. В то же время антитела P-syn/81A (рис. 3) разных фирм («Abcam» и «Biolegend») не связывались с пресинаптическими окончаниями в дорсальных рогах спинного мозга (рис. 1) и ядрами нейронов, но выявляли часть IB4-негативных нейронов спинального ганглия с отростками (рис. 3), причем окрашивались нейроны разных размеров. Следовательно, наиболее близкие результаты по сравнению с окрашиванием на общий  $\alpha$ -Syn показали антитела EP1536Y, тогда как характер окрашивания антителами P-syn/81A предполагает наличие неспецифического связывания, кроме того, все использованные антитела демонстрировали избирательное связывание с популяцией IB4-негативных нейронов.

Таким образом, локализация  $\alpha$ -Syn в ПНС intactных животных различа-

ется в зависимости от типа нейронов и может быть как пресинаптической, так и цитоплазматической (табл.). В спинальном ганглии и спинном мозге распределение  $\alpha$ -Syn соответствовало пептидергическим (IB4-негативным) ноцицептивным нейронам и их окончаниям. Антитела к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn также продемонстрировали разный характер связывания, но, как и антитела к общему  $\alpha$ -Syn, избирательно выявляли клеточные структуры IB4-негативных сенсорных нейронов спинального ганглия. За исключением клона P-syn/81A, все антитела связывались с периферическими GFAP-негативными глиальными клетками.

В целом наши результаты продемонстрировали широкое распределение  $\alpha$ -Syn и его фосфорилированной формы в ПНС и согласуются с результатами др. работ, показавших их наличие в нейронах спинального ганглия и их отростках, приходящих в наружные пластины дор-

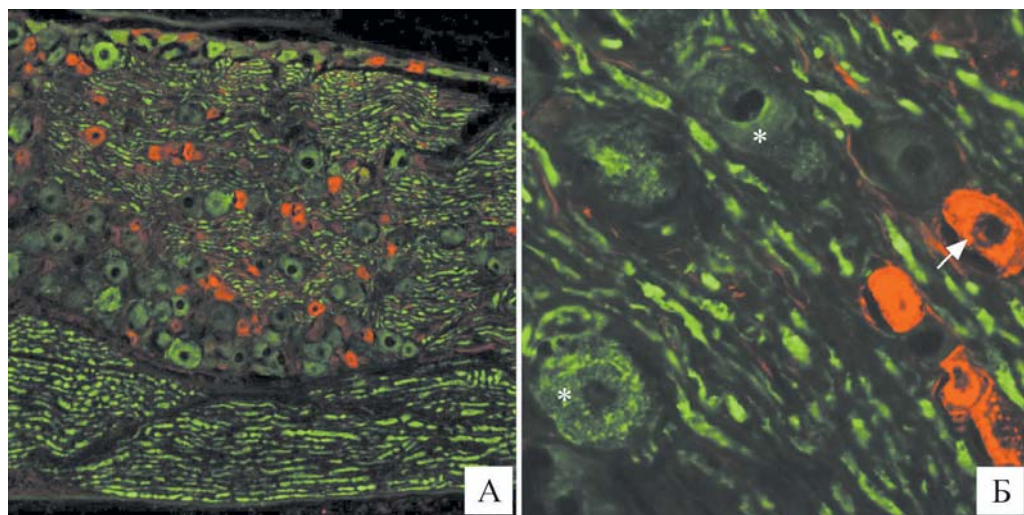


Рис. 3. Раздельное цитоплазматическое окрашивание крупных SynP-129 позитивных нейронов (клон антител P-syn/81A, зеленым) и IB4-позитивных нейронов (красным) спинального ганглия: А – ув.  $\times 10$ , Б – ув.  $\times 40$ .

Таблица

**Локализация связывания антител к  $\alpha$ -Syn и его фосфорилированной по Ser-129 форме в структурах периферической нервной системы интактных крыс Wistar**

| Исследованные структуры                                      | Использованные антитела                                   |                                |                           |                          |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                                                              | Антитела к $\alpha$ -Syn («Sigma», s3062) (1:200 -1:1000) | Антитела к $\alpha$ -Syn-P-129 |                           |                          |
|                                                              |                                                           | EP1536Y (1:100 - 1:500)        | P-syn/81A (1:100 - 1:500) | P-syn #64 (1:100 -1:500) |
| Нейроны ганглия дорсальных рогов спинного мозга (цитоплазма) | ++                                                        | +                              | +++                       | -                        |
| Нейроны ганглия дорсальных рогов спинного мозга (ядра)       | -                                                         | +                              | -                         | +++                      |
| Пресинаптические окончания                                   | +++                                                       | ++                             | -                         | -                        |
| Нервные волокна                                              | -                                                         | -                              | +++                       | -                        |
| Глиальные клетки                                             | ++                                                        | ++                             | -                         | +                        |
| Нейроны вегетативных превертебральных ганглиев (цитоплазма)  | +++                                                       | +                              | ++                        | не исследовали           |
| Нервные сплетения сосудов                                    | ++                                                        | -                              | ++                        | -                        |

Обозначения: «-» – отсутствие окрашивания, «+» – визуальная интенсивность окрашивания от слабой до интенсивной.

сальных рогов спинного мозга [13, 20, 23]. Высокое содержание  $\alpha$ -Syn в структурах, участвующих в болевой чувствительности, важно для лучшего понимания патогенеза БП, т.к. у человека при БП описано образование патологических агрегатов синуклеина в этих структурах, что связывают с наблюдаемой у пациентов болевой симптоматикой [6, 9]. Также выявлено повреждение тонких нервных волокон и изменение температурной и болевой чувствительности [15]. При исследовании биоптатов кожи при БП были найдены агрегаты  $\alpha$ -Syn в пептидергических нервных волокнах [12], что подтверждает наши результа-

ты. Патологическое накопление  $\alpha$ -Syn в олигодендроглии обнаруживают при БП и мультисистемной атрофии [10]. Полученные нами данные о наличии  $\alpha$ -Syn в GFAP-негативных глиальных клетках у интактных животных согласуются с работой [10], продемонстрировавшей экспрессию этого белка на разных стадиях созревания олигодендроглии.

Неоднозначность результатов, полученных нами при локализации фосфорилированного  $\alpha$ -Syn, может быть обусловлена неспецифическим связыванием антител с мишенями, которые еще не идентифицированы, в т.ч. с др. белками семейства. В литературе от-

мечены различия в локализации  $\alpha$ -Syn, выявляемого разными клонами антител [21, 24] или у разных видов животных [13], что вызывает вопросы относительно его истинной локализации в клетке [21]. Так, утверждается, что ядерное окрашивание нейронов на  $\alpha$ -Syn имеет неспецифическую природу [14], хотя др. авторы предполагают, что различия во внутриклеточной локализации белка, выявляемого разными клонами антител, могут быть связаны с особенностями его пространственной структуры [18, 24]. Предполагается [18], что фосфорилирование и др. посттрансляционные модификации  $\alpha$ -Syn изменяют доступность выявляемых антителами эпитопов, что приводит к различиям в результатах окрашивания и отражает внутриклеточную динамику фосфорилированного и нефосфорилированного  $\alpha$ -Syn, а также его взаимодействия с молекулярными мишенями в ядре и цитоплазме [18, 21].

Таким образом, проведенное исследование показало, что в нейронах ПНС в зависимости от исследуемых структур наблюдается как пресинаптическая, так и цитоплазматическая локализация  $\alpha$ -Syn. В спинальном ганглии  $\alpha$ -Syn преимущественно экспрессируется пептидергическими сенсорными нейронами и обнаруживается в их терминалах в дорсальных рогах спинного мозга. Высокая экспрессия  $\alpha$ -Syn выявляется и в телах и отростках нейронов превертебральных ганглиев, а также в сплетениях стенок сосудов и в цитоплазме GFAP-негативных глиальных клеток.  $\alpha$ -Syn, фосфорилированный по Ser-129, в норме также обнаруживается в сенсорных нейронах спинального ганглия, однако антитела разных производителей значительно отличаются характером связывания и де-

монстрируют разную внутриклеточную локализацию, что может быть обусловлено как неспецифической реакцией, так и структурными особенностями исследуемого белка.

### Выводы

1. Альфа-синуклеин и его фосфорилированная форма широко распространены в периферической нервной системе интактных крыс и обнаруживаются в телах нейронов и пресинаптических окончаниях.

2. В спинальном ганглии альфа-синуклеин экспрессируется преимущественно пептидергическими сенсорными нейронами и локализован в их окончаниях, приходящих в дорсальные рога спинного мозга.

3. Выявлена неоднотипность связывания антител разных клонов с фосфорилированным альфа-синуклеином, что необходимо учитывать при оценке патологической агрегации белка на экспериментальных моделях болезни Паркинсона и при исследовании патоморфологического материала больных паркинсонизмом.

### Благодарность

Выражаем благодарность Соболеву Валерию Борисовичу за методическую помощь.

### Список литературы

1. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011. Т. 5. № 4. С. 46-51.
2. Соболев В.Б., Худоевков Р.М. Иммуногистохимическое выявление  $\alpha$ -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона // *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений*. 2017. № 2. С. 16-23.

3. *Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L.* Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family // *J. of Neurosci.* 2011. No. 31(20). Pp. 7264-7274.
4. *Arawaka S., Sato H., Sasaki A., Koyama S., Kato T.* Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in alpha-synuclein aggregates // *Acta Neuropathologica Communications.* 2017. No. 1(5). P. 48.
5. *Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol. Aging.* 2003. No. 24(2). Pp. 197-211.
6. *Braak H., Sastre M., Bohl J.R., de Vos R.A., Del Tredici K.* Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons // *Acta Neuropathol.* 2007. No. 113(4). Pp. 421-429.
7. *Braz J.M., Nassar M.A., Wood J.N., Basbaum A.I.* Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor // *Neuron.* 2005. Vol. 47(6). Pp. 787-793.
8. *Burre J., Sharma M., Sudhof T.C.* Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2017. pii: a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091.
9. *Del Tredici K., Braak H.* Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease // *Acta Neuropathol.* 2012. No. 124(5). Pp. 643-64.
10. *Djelloul M., Holmqvist S., Boza-Serrano A., Azevedo C., Yeung M.S., Goldwurm S., Frisén J., Deierborg T., Roybon L.* Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models // *Stem Cell Reports.* 2015. No. 5(2). Pp. 174-84.
11. *Donadio V., Incensi A., Rizzo G., Scaglione C., Capellari S., Fileccia E., Avoni P., Liguori R.* Spine Topographical Distribution of Skin  $\alpha$ -Synuclein Deposits in Idiopathic Parkinson Disease // *J. of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2017. No. 5(76). Pp. 384-389.
12. *Doppler K., Ebert S., Üçeyler N., Trenkwalder C., Ebentheuer J., Volkmann J., Sommer C.* Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology // *Acta Neuropathol.* 2014. No. 128(1). Pp. 99-109.
13. *Giasson B.I., Duda J.E., Forman M.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q.* Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons // *Exp. Neurol.* 2001. No. 172(2). Pp. 354-362.
14. *Huang Z., Xu Z., Wu Y., Zhou Y.* Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains // *Neuroscience.* 2011. No. 199. Pp. 318-32.
15. *Lin C.H., Chao C.C., Wu S.W., Hsieh P.C., Feng F.P., Lin Y.H., Chen Y.M., Wu R.M., Hsieh S.T.* Pathophysiology of Small-Fiber Sensory System in Parkinson's Disease: Skin Innervation and Contact Heat Evoked Potential // *Medicine (Baltimore).* 2016. No. 95(10). E3058. doi: 10.1097/MD.0000000000003058.
16. *Ma M.R., Hu Z.W., Zhao Y.F., Chen Y.X., Li Y.M.* Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation // *Scientific Reports.* 2016. No. 6. P. 37130. doi: 10.1038/srep37130.
17. *Muntané G., Ferrer I., Martinez-Vicente M.*  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain // *Neuroscience.* 2012. No. 200. Pp. 106-119.
18. *Nam M.K., Han J.H., Jang J.Y., Yun S.E., Kim G.Y., Kang S., Rhim H.* A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of alpha-synuclein // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2015. No. 12(1850). Pp. 2497-2505.
19. *Oueslati A.* Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? // *J. Parkinsons Dis.* 2016. No. 6(1). Pp. 39-51.
20. *Papachroni K., Ninkina N., Wanless J., Kalofoutis A.T., Gnuchev N.V., Buchman V.L.* Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha- and gamma-synucleins // *J. Mol. Neurosci.* 2005. No. 25(2). Pp. 157-64.
21. *Surguchov A.* Intracellular Dynamics of Synucleins: "Here, There and Everywhere" // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2015. No. 320. Pp. 103-169.
22. *Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M.* Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein // *J. Comp. Neurol.* 2016. No. 524(6). Pp. 1236-58.
23. *Tiunova A.A., Anokhin K.V., Saha A.R., Schmidt O., Hanger D.P., Anderton B.H., Davies A.M., Ninkina N.N., Buchman V.L.* Chicken synucleins: cloning and expression

in the developing embryo // *Mech. Dev.* 2000. No. 99(1-2). Pp. 195-198.

24. **Vivacqua G., Casini A., Vaccaro R., Fornai F., Yu S., D'Este L.** Different sub-cellular localization of alpha-synuclein in the C57BL/6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies // *J. Chem. Neuroanat.* 2011. No. 41(2). Pp. 97-110.

## References

1. **Pchelina S.N.** Alfa-sinuklein kak biomarker bolezni Parkinsona [Alpha-synuclein as biomarker of Parkinson's disease]. *Annaly klinicheskoy i ehksperimental'noj nevrologii* [Annals of clinical and experimental neurology]. 2011. T. 5. No. 4. Pp. 46-51. (In Russian).
2. **Sobolev V.B., Khudoerov R.M.** Immunogistohimicheskoe vyavlenie  $\alpha$ -sinukleina v slyunnoj zheleze kak biomarker bolezni Parkinsona [Immunohistochemical detection of alpha-synuclein in salivary gland as biomarker of Parkinson disease]. *Byulleten' Nacionalnogo obshchestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstrojstv dvizhenij* [Bulletin of the National Society for the Study of Parkinson's Disease and Movement Disorders]. 2017. No. 2. Pp. 16-23. (In Russian).
3. **Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L.** Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. of Neurosci.* 2011. No. 31(20). Pp. 7264-7274.
4. **Arawaka S., Sato H., Sasaki A., Koyama S., Kato T.** Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in alpha-synuclein aggregates. *Acta Neuropathologica Communications.* 2017. No. 1(5). P. 48.
5. **Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E.** Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2003. No. 24(2). Pp. 197-211.
6. **Braak H., Sastre M., Bohl J.R., de Vos R.A., Del Tredici K.** Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol.* 2007. No. 113(4). Pp. 421-429.
7. **Braz J.M., Nassar M.A., Wood J.N., Basbaum A.I.** Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron.* 2005. Vol. 47(6). Pp. 787-793.
8. **Burre J., Sharma M., Sudhof T.C.** Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2017. pii: a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091.
9. **Del Tredici K., Braak H.** Spinal cord lesions in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2012. No. 124(5). Pp. 643-64.
10. **Djelloul M., Holmqvist S., Boza-Serrano A., Azevedo C., Yeung M.S., Goldwurm S., Frisén J., Deierborg T., Roybon L.** Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem Cell Reports.* 2015. No. 5(2). Pp. 174-84.
11. **Donadio V., Incensi A., Rizzo G., Scaglione C., Capellari S., Fileccia E., Avoni P., Liguori R.** Spine Topographical Distribution of Skin  $\alpha$ -Synuclein Deposits in Idiopathic Parkinson Disease. *J. of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2017. No. 5(76). Pp. 384-389.
12. **Doppler K., Ebert S., Üçeyler N., Trenkwalder C., Ebentheuer J., Volkmann J., Sommer C.** Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta Neuropathol.* 2014. No. 128(1). Pp. 99-109.
13. **Giascon B.I., Duda J.E., Forman M.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q.** Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons. *Exp. Neurol.* 2001. No. 172(2). Pp. 354-362.
14. **Huang Z., Xu Z., Wu Y., Zhou Y.** Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains. *Neuroscience.* 2011. No. 199. Pp. 318-32.
15. **Lin C.H., Chao C.C., Wu S.W., Hsieh P.C., Feng F.P., Lin Y.H., Chen Y.M., Wu R.M., Hsieh S.T.** Pathophysiology of Small-Fiber Sensory System in Parkinson's Disease: Skin Innervation and Contact Heat Evoked Potential. *Medicine (Baltimore).* 2016. No. 95(10). E3058. doi: 10.1097/MD.0000000000003058.
16. **Ma M.R., Hu Z.W., Zhao Y.F., Chen Y.X., Li Y.M.** Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation. *Scientific Reports.* 2016. No. 6. P. 37130. doi: 10.1038/srep37130.
17. **Muntané G., Ferrer I., Martínez-Vicente M.**  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience.* 2012. No. 200. Pp. 106-119.

18. *Nam M.K., Han J.H., Jang J.Y., Yun S.E., Kim G.Y., Kang S., Rhim H.* A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of alpha-synuclein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2015. No. 12(1850). Pp. 2497-2505.
19. *Oueslati A.* Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J. Parkinsons Dis*. 2016. No. 6(1). Pp. 39-51.
20. *Papachroni K., Ninkina N., Wanless J., Kalofoutis A.T., Gnuchev N.V., Buchman V.L.* Peripheral sensory neurons survive in the absence of alpha- and gamma-synucleins. *J. Mol. Neurosci*. 2005. No. 25(2). Pp. 157-64.
21. *Surguchov A.* Intracellular Dynamics of Synucleins: "Here, There and Everywhere". *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 2015. No. 320. Pp. 103-169.
22. *Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M.* Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J. Comp. Neurol*. 2016. No. 524(6). Pp. 1236-58.
23. *Tiunova A.A., Anokhin K.V., Saha A.R., Schmidt O., Hanger D.P., Anderton B.H., Davies A.M., Ninkina N.N., Buchman V.L.* Chicken synucleins: cloning and expression in the developing embryo. *Mech. Dev*. 2000. No. 99(1-2). Pp. 195-198.
24. *Vivacqua G., Casini A., Vaccaro R., Fornai F., Yu S., D'Este L.* Different sub-cellular localization of alpha-synuclein in the C57BL/6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies. *J. Chem. Neuroanat*. 2011. No. 41(2). Pp. 97-110.

## Localization of total and Ser 129 phosphorylated $\alpha$ -synuclein in the rat peripheral nervous system (testing of different antibodies)

D.N. Voronkov, O.V. Salnikova, R.M. Khudoerkov

The deposition of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -Syn) in the peripheral nervous system precedes the motor symptoms of Parkinson's disease and is considered as a pathological sign and biomarker. However, data on the localization of  $\alpha$ -Syn in the intact nervous system require clarification for the future development of experimental models and diagnostic tests. Localization of  $\alpha$ -Syn and its the remainder of serine 129 phosphorylated form in peripheral nervous system of intact rats were studied by immunohistochemistry with use of different commercially available antibodies.  $\alpha$ -Syn were found in presynaptic terminals of spinal dorsal horn, neuronal somata of prevertebral ganglia, nerve plexuses of vascular wall and GFAP-negative glial cells. Different antibodies to phosphorylated  $\alpha$ -Syn shown uneven binding. Staining of processes, somata or nuclei of certain dorsal root ganglia neurons were found. No one of used antibodies detected small nociceptive IB4-positive neurons. The ambiguity of the obtained results can be related both to the different availability of epitopes detected by antibodies as a result of  $\alpha$ -Syn interactions with other proteins, and with non-specific binding of antibodies to unidentified targets.

**Key words:**  $\alpha$ -synuclein, peripheral nervous system, dorsal root ganglion, rat, immunohistochemistry.