

Устюгов Алексей Анатольевич

**Стратегия поиска препаратов для лечения нейродегенеративных
заболеваний на основе трансгенных клеточных и животных моделей
протеинопатий**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в лаборатории биологических испытаний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук

Научный консультант:

Бачурин Сергей Олегович, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела медицинской и биологической химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Гудашева Татьяна Александровна, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель отдела химии лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Пинелис Всеволод Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мухамедьяров Марат Александрович, доктор медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский Государственный Медицинский Университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина»

Защита состоится «18» февраля 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д001.003.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://niiopp.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д001.003.01
кандидат медицинских наук

Скуратовская Лариса Николаевна

Актуальность темы исследования

Общемировая тенденция к увеличению средней продолжительности жизни и повышение частоты заболеваний нервной системы, сопровождающихся прогрессирующими дегенеративными процессами, обусловили рост как фундаментальных, так и клинических исследований данного типа расстройств. Особое внимание уделяется выявлению молекулярных и клеточных механизмов развития нейрональной патологии, так как их понимание необходимо для разработки ранней диагностики и новых эффективных методов терапии неизлечимых в настоящее время нейродегенеративных заболеваний (НДЗ). Нейродегенеративные болезни – крайне неоднородная группа, к которой относятся как социально значимые расстройства, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, фронтотемпоральная лобарная дегенерация (ФТЛД), деменция с тельцами Леви, хорея Гентингтона, так и более редкие тяжёлые заболевания, такие как боковой амиотрофический склероз (БАС) и прионные болезни. Однако, несмотря на гетерогенность этой группы, в патогенезе многих из этих заболеваний выделен ряд общих механизмов, одним из которых является патологическая агрегация конформационно-изменённых и часто потенциально амилоидогенных белков, таких как тау, β -амилоидные пептиды, синуклеины, TDP-43, FUS и др., сопровождающаяся образованием характерных патогистологических включений. Несмотря на то, что каждое заболевание характеризуется нарушением метаболизма и агрегацией определенного белка или набора белков, а распределение белковых включений как внутри клетки, так и по отделам нервной системы значительно варьирует, схожий молекулярный механизм патогенеза позволил объединить подобные заболевания в группу протеинопатий. Под протеинопатиями понимаются формы нейродегенеративных заболеваний, в основе патогенеза которых лежит изменение структуры, нарушение метаболизма и агрегация ряда белков, сопровождаемая формированием характерных гистопатологических белковых включений в разных отделах нервной системы.

Сформированные патогистологические структуры и все отдельные этапы каскадного процесса агрегации белков являются потенциальными мишенями для разработки новых терапевтических подходов и создания болезнь-модифицирующих препаратов. В связи с этим представляется исключительно актуальной задача подробного изучения общего звена патогенеза протеинопатий, а также разработки элемента патогенетической терапии, направленной на модулирование и коррекцию механизмов, инициирующих и

поддерживающих протеинопатию. Важным инструментом для исследования молекулярных изменений, ведущих к развитию протеинопатий, является их моделирование в *in vitro* и *in vivo* моделях с использованием клеточных линий и генетически модифицированных лабораторных животных. Использование современных биотехнологических подходов позволяет изучать физиологические функции и нарушения метаболизма склонных к агрегации белков, лежащие в основе патогенеза протеинопатий, а также применять их для первичного отбора эффективных терапевтических средств. Однако при том, что разработано уже достаточно большое количество как клеточных, так и животных моделей протеинопатий, оценка адекватности их применения к конкретным формам НДЗ человека и возможностей выработки конкретных протоколов для тестирования новых соединений применительно к данным конкретным формам НДЗ человека остаётся актуальной задачей современной патофизиологии и медицинской химии в целом. Решение этой задачи позволит существенно оптимизировать разработку патогенетической терапии НДЗ.

Цели и задачи исследования

Основной целью данной работы было создание моделей протеинопатий для изучения патологических свойств белков, вовлечённых в патогенез нейродегенеративных процессов, и поиск на этой основе новых потенциальных лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний.

В задачи работы входило:

- детально изучить динамику экспрессии и внутриклеточную локализацию склонных к агрегации белков;
- провести генетические модификации неамилоидогенных, склонных к агрегации белков для последующего их использования в качестве мишеней при создании модельных протеинопатий;
- установить изменения компартиментализации склонных к агрегации белковых молекул при генетической модификации доменной структуры;
- воспроизвести основные молекулярные звенья протеинопатии в клеточных и животных моделях путём модификации генома, позволяющей изменить метаболизм и внутриклеточную локализацию отобранных белков-мишеней для создания клеточных и животных моделей с фенотипическими проявлениями нейродегенеративного процесса;

- провести сравнительную характеристику созданных линий трансгенных мышей с использованием молекулярно-биологических, биохимических, гистологических и поведенческих методов исследования;
- осуществить поиск и отбор потенциальных лекарственных препаратов в ряду производных гамма-карболинов и сравнить их действие с модельным препаратом Димебон, проявляющим выраженные антиагрегационные свойства;
- определить основные критерии отбора лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит явление протеинопатии.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В настоящее время используются разные подходы для разработки новых терапевтических агентов, которые позволили бы модифицировать процессы, лежащие в основе развития и прогрессии нейродегенерации. Сложность разработки патогенетической терапии спонтанных протеинопатий, которые составляют абсолютное большинство НДЗ с диагностическими патогистологическими включениями обусловлена отсутствием валидных *in vivo* и *in vitro* моделей, адекватно воспроизводящих молекулярные механизмы патологических процессов, ассоциированных с неконтролируемой агрегацией белков в нервной системе. В связи с этим, создание и валидация новых моделей протеинопатий способствует дальнейшему прогрессу при поиске молекулярных мишеней и выработке новых стратегий для создания специфической таргетной терапии подобных НДЗ. В рамках диссертационной работы получены клеточные и животные модели для изучения молекулярных механизмов нейропатологий, которые также можно использовать для исследования патологических механизмов агрегации белков и для тестирования соединений с заданными свойствами. В частности, разработаны клеточные модели на основе эктопной экспрессии склонных к агрегации белков TDP-43 и FUS, которые показали изменённую локализацию и накопление внутриклеточных отложений, содержащих данные белки. Впервые были созданы *in vivo* модели протеинопатий с изменённой экспрессией ключевых генов, участвующих в различных нейропатологиях. В частности, получены и охарактеризованы линии мышей с полной инактивацией альфа-синуклеина, а также изучены две новые трансгенные линии мышей, в нервной системе которых эктопно экспрессируется

укороченная аберрантная форма белка FUS человека. В этом заключается теоретическая значимость работы.

Практическая значимость работы заключается как в создании новых валидированных моделей ряда протеинопатий, так и в реальном использовании созданных моделей для исследования свойств и отбора наиболее перспективных соединений, способных блокировать развитие процессов патологической агрегации белков в нервной системе. С использованием линии животных ΔFUS(1-359) впервые были исследованы противоагрегационные и нейропротекторные свойства новых соединений – фторированных производных гамма-карболинов, а также их способность стимулировать собственные защитные внутриклеточные механизмы, обеспечивающие контролируемую деградацию конформационно изменённых белков и промежуточных продуктов. Выявлены соединения-лидеры, которые успешно прошли доклинические испытания (препарат DF-302) или переданы на доклинические исследования (препарат DF-402).

Полученные в рамках диссертационного исследования данные вносят существенный вклад в развитие и разработку новых подходов для изучения нейродегенеративных процессов, как на клеточном, так и на организменном уровне. С использованием разработанных модельных систем получены новые данные, которые существенно расширяют наши знания по ключевым звеньям патогенеза протеинопатий. Разработанные и охарактеризованные линии трансгенных животных, которые использовались в качестве тест-систем для направленного поиска и отбора новых соединений, позволили выявить новые препараты, способные замедлять прогрессию протеинопатии и развитие нейродегенеративного процесса в нервной системе модельных животных.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа выполнена с использованием широкого спектра методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и генетики на современном высокотехнологичном оборудовании. Основными объектами исследования являлись клеточные системы и животные с нормальным и трансгенным статусом, а также соединения с нейропротекторными свойствами из ряда гамма-карболинов.

Основные положения, выносимые на защиту

- Сформирована система отбора потенциальных нейропротекторных соединений, основанная на использовании разработанных и валидированных

моделей протеинопатий, представляющих основные патофизиологические звенья нейродегенеративных заболеваний человека, связанные с аномальной агрегацией белков;

- проведена характеристика мутантных изоформ склонных к агрегации РНК/ДНК-связывающих белков FUS и TDP-43. Проведена оценка их агрегационных свойств и исследованы биохимические и морфологические изменения локализации патологических агрегатов белков в клетках;
- получена новая линия трансгенных мышей с регулируемой экспрессией альфа-синуклеина, моделирующая патологические процессы при альфа-синуклеинопатиях, а также охарактеризованы две линии трансгенных мышей с эктопной экспрессией мутантного укороченного белка FUS, в которых удалось воспроизвести локомоторный и когнитивный фенотип нейродегенеративных заболеваний;
- на основании проведённого анализа экспрессии генов в линии животных ΔFUS(1-359) установлен рост факторов иммунного ответа на симптоматической фазе модельного заболевания;
- показана резко выраженная дисрегуляция в метаболизме сфингоидных оснований, включая сфингозин, сфинганин и сфингозин-1-фосфат, преимущественно в спинном мозге мышей на фоне отсутствия заметных изменений в содержании этих сфинголипидов в структурах головного мозга в процессе развития FUS-протеинопатии;
- использование гамма-карболинов, в частности отечественного препарата Димебон, в клеточных и животных моделях протеинопатий тормозило формирование внутриклеточных отложений в модельной клеточной системе, оказало положительный эффект на продолжительность жизни трансгенных животных;
- сделано заключение о высокой перспективности в качестве потенциальных терапевтических средств фторсодержащих производных гамма-карболинов, которые действуют не только как стимуляторы когнитивных функций, но и способны подавлять дисфункции опорно-двигательного аппарата у животных, моделирующих нейродегенеративные заболевания, связанные с развитием протеинопатии.

Личный вклад соискателя

Совместно с научным консультантом д.х.н., проф. Бачуриным С.О. были сформированы цели и задачи исследования. Все описанные в диссертационной

работе результаты, касающиеся выявления молекулярных механизмов моделируемых протеинопатий в клеточных культурах и животных, характеристика полученных животных моделей, включая поведенческое тестирование, и характеристика молекулярных механизмов с использованием биохимических и иммуногистологических методов получены автором лично либо под его руководством. Данные по характеристике новой модели фронтотемпоральной лобарной дегенерации на трансгенных мышах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией получены совместно с Лысиковой Е.А. (научный руководитель к.б.н. Устюгов А.А.). Эксперименты по созданию экспрессионных векторов и исследованию нейропротекторных свойств гамма-карболинов проведены совместно с лабораториями генетического моделирования нейродегенеративных процессов (д.м.н. Нинкина Н.Н.) и биомолекулярного скрининга (к.б.н. Шевцова Е.Ф.), фторированные производные гамма-карболинов предоставлены лабораторией синтеза физиологически активных соединений (д.х.н Соколов В.Б.) в ИФАВ РАН. Анализ экспрессии генов методом РНК-секвенирования проводился совместно с к.б.н. Фуниковым С.Ю. и Резвых А.П. (ИМБ РАН). Эксперименты с получением трансгенных животных моделей проведены совместно с к.б.н. Дейкиным А.В. (ИБГ РАН) и профессором Бухманом В.Л. (Университет Кардиффа, Великобритания).

Степень достоверности и апробация результатов

По материалам диссертационной работы издано 46 статей (16 в журналах Q1/Q2), из них 31 статья в журналах, которые рекомендованы ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ. Применение разработанных моделей отражены в ноу-хау №1-2012 «Методика отбора нейропротекторных препаратов, селективно действующих на системы клеточной защиты от патогенных белковых агрегатов, с использованием генетически-модифицированных животных» от 28.11.2012 (ИФАВ РАН), а также легли в основу патента РФ №2490268 (10.11.2011) WIPO (PCT): WO2009038764A1. Основные положения диссертационной работы были представлены в виде устных докладов или стендовых сообщений на российских и международных научно-практических конференциях: XI International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy (Женева, 2010); X International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (Барселона, 2011); конференции по научному направлению Российской Академии наук «Фундаментальные науки

– Медицине», раздел «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы»; 41st Annual Meeting for Society for Neuroscience (Вашингтон, 2011); Всероссийский медико-биологический конгресс молодых учёных «Симбиоз-Россия 2012»; Parkinson's UK Conference (Йорк, 2014); XXII World Congress of Neurology (Сантьяго, 2016); «Основные проблемы в современной медицине» (Волгоград, 2015); XXII Всероссийская конференция молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2015); IX Международная школа-конференция для студентов, аспирантов и молодых учёных (Уфа, 2015); III Russian Conference on Medicinal Chemistry (Казань, 2017); European Network to Cure ALS (Оксфорд, 2018); Conference on Neuroprotective Agents (Эстес Парк, 2018); 27th Euro-Global Neurologists Meeting (Москва, 2019); Современные проблемы нейропсихиатрии (Москва, 2019); IV Russian Conference on Medicinal Chemistry (Екатеринбург, 2019); VI Съезд Физиологов России и СНГ (Сочи, 2019); 18th Asian Chemical Congress (Тайвань, 2019).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты и обсуждение») заключения, выводов, приложения и списка литературы, содержащего 613 источников. Работа изложена на 290 страницах, содержит 89 рисунков, шесть таблиц, одну схему и одно приложение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Разработка клеточных моделей протеинопатии

Воспроизведение протеинопатий в клеточных культурах представляет собой удобную модель для изучения агрегационных свойств белков и тестирования и отбора новых соединений, способных влиять на процессы, ассоциированные с патогенной агрегацией белков. Особенностью FUS- и TDP-43-протеинопатий является то, что они, во-первых, формируют агрегаты неамилоидного типа, и, во-вторых, при этом всегда наблюдается изменение компарментализации данных белков в клетке. Поэтому при моделировании протеинопатий необходимо было воспроизвести перераспределение белка из ядра в цитоплазму и его накопление в составе нерастворимых цитоплазматических включений. При разработке клеточной модели TDP-43-протеинопатии были учтены данные молекулярно-генетического анализа наследственных форм TDP-43-протеинопатий и анализа белка TDP-43 из аутопсийного материала больных с ФТЛД. Особое внимание было уделено

использованию укороченной формы белка TDP-43, имеющей размер 25 кДа. Данная форма не содержит сигнала ядерной локализации, первого РНК-связывающего домена, линкерной последовательности, а также имеет укороченный второй РНК-связывающий домен. При флуоресцентной микроскопии экзогенный белок накапливался в многочисленных дисперсных цитоплазматических включениях, образуя крупные включения (рис. 1).

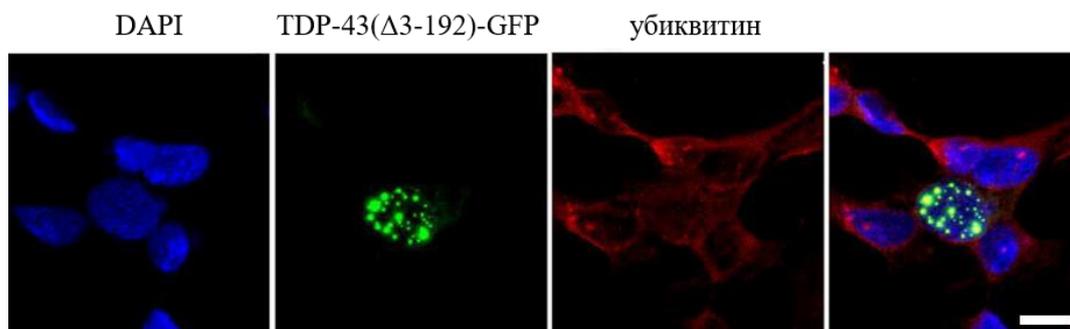


Рисунок 1 – Накопление и морфология агрегатов, образуемых С-концевым фрагментом белка TDP-43(Δ3-192). Шкала 15 мкм

Анализ накопления продуктов полученных конструкторов при временной трансфекции клеток нейробластомы SH-SY5Y выявил, что T5 форма образовывала множественные внутриклеточные цитоплазматические включения через 4 часа после трансфекции (рис. 2).

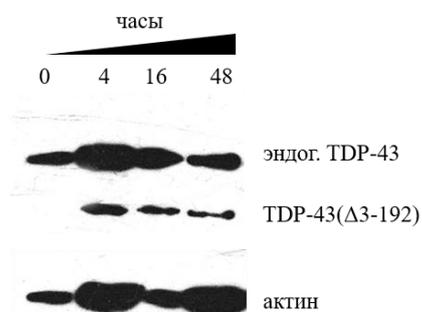


Рисунок 2 – Иммуноблоттинг экзогенного укороченного белка ΔTDP-43(3-192) – форма T5 в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y через 4, 16 и 48 часов после трансфекции

Сконструированная патогенная форма T5 оказалась высокотоксичной для клеток, как и большинство мутантных форм с модифицированным С-концом белковой молекулы TDP-43. Нами был проведён подсчёт числа живых клеток, содержащих кодирующую T5 форму, или же пустой pEGFP-C1 вектор без TDP-43 вставки (таблица 1).

Таблица 1 – Число живых клеток, содержащих флуоресцентный белок, на площади 10 000 мкм²

| Конструкты | 4 часа | 12 часов | 24 часа | 48 часов |
|-----------------|----------|-----------|-----------|----------|
| T5 форма | 79.8±9.5 | 51.0±5.8 | 23.1±6.6 | 9.8±2.10 |
| pEGFP-C1 вектор | 70.4±8.7 | 89.0±10.8 | 79.0±12.8 | 51.8±5.7 |

Через 12 часов после трансфекции наблюдалась гибель клеток с экспрессией патогенной формы T5, а через 48 часов число клеток снижалось почти в 10 раз.

Таким образом, было показано, что, обладая высокой способностью к агрегации, при исключительно цитоплазматической локализации, T5 форма белка TDP-43 ещё и высокотоксична. Патофизиологическая картина TDP-43 токсичности в клеточной модельной системе по этим основным параметрам соответствует картине, описанной для ряда форм ФТЛД и БАС, при которых гибель нейронов сопровождается потерей белком TDP-43 ядерной локализации и накоплением TDP-43-реактивных включений в дегенерирующих нейронах.

По аналогии с TDP-43 клеточными моделями протеинопатии для разработки клеточных моделей FUS-протеинопатии в качестве основы была использована клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y, метод временной трансфекции и генетические конструкции с привнесёнными мутациями в кодирующей части гена *FUS*, идентифицированные у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом, а также укороченные варианты с удалёнными сигналами ядерной локализации. Потеря нормальной ядерной локализации и накопление в цитоплазме приводят к формированию нерастворимых агрегатов и развитию протеинопатии. Несмотря на очевидную ассоциацию мутаций в гене *FUS* с наследственными и спорадическими формами БАС, биохимические различия свойств мутантных изоформ белка были мало исследованы. Модификации N-концевого фрагмента белка FUS показали, что мутантный укороченный белок FUS(1-359) был локализован исключительно в цитоплазме в виде множественных агрегатов и включений (рис. 3).

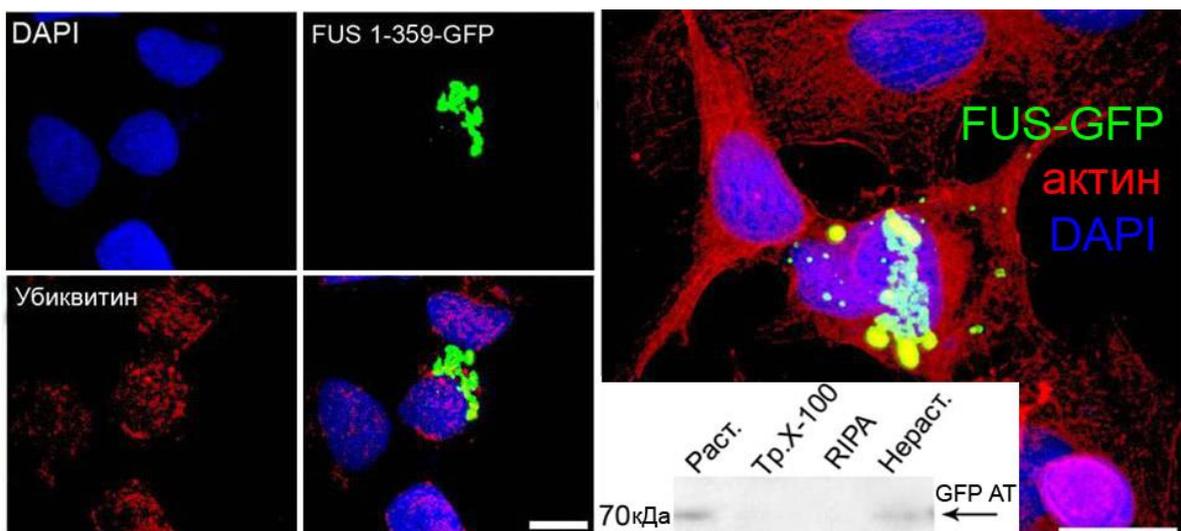


Рисунок 3 – Морфология, статус убиквитинирования и растворимость агрегатов, образуемых N-концевым фрагментом белка FUS (1-359). Вставка: иммуноблоттинг растворимой фракции (Раств.), растворимой в буфере с Triton X-100, RIPA и нерастворимой фракции (Нераств.) Шкалы 15 мкм

Агрегаты FUS(1-359) детектировались уже через 4 ч после трансфекции, таким образом, вероятно, эта форма белка начинает агрегировать

непосредственно после синтеза, не накапливаясь в цитоплазме, при этом аккумуляция критической массы белка в цитоплазме, после которой запускается процесс неконтролируемой агрегации, не является необходимой. Агрегаты FUS(1-359) также неубиквитинированы, это согласуется с литературными данными о том, что убиквитинирование является более поздним событием при формировании FUS положительных гистопатологических структур. Фракционирование и последующий иммуноблоттинг с антителами против GFP также выявили FUS(1-359) в детергент-нерастворимой фракции (см. рис. 3). Таким образом, при моделировании протеинопатии в клетках стоит учитывать потерю нормальной функции белка из-за мутации, например, при полной потере ядерной локализации, а также приобретением токсичности для клетки в результате образования промежуточных продуктов агрегации и крупных агрегатов в цитоплазме и ядре, как две стороны одного каскада. В результате проведённых исследований были охарактеризованы и изучены основные биохимические и генетические аспекты для клеточных моделей протеинопатий на основе двух склонных к агрегации белков. В разработанных клеточных моделях воспроизведены молекулярные патологии, обнаруживаемые у больных с боковым амиотрофическим склерозом и фронтотемпоральной лобарной дегенерацией. Такой подход позволяет не только исследовать механизм развития протеинопатий, но и даёт возможность использования разработанных клеточных систем для тестирования новых препаратов, корректирующих именно данный тип воспроизведённой патологии, тем самым разрабатывать методы лечения.

2 Трансгенные линии животных протеинопатий

Наряду с клеточными моделями протеинопатий, трансгенные мышинные модели являются мощным инструментом для изучения болезней и могут считаться одними из самых адекватных и востребованных средств для изучения молекулярных механизмов патологий, а также использоваться для характеристики эффективности потенциальных лекарственных средств. Исключительная особенность использования трансгенных мышинных моделей заключается в возможности воспроизведения патологических симптомов на фенотипическом и генетическом уровне.

2.1 Новая модель трансгенных мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина

Характерным патогистологическим признаком болезни Паркинсона являются классические цитоплазматические тельца Леви, выявляемые в аутопсийном материале больных, в первую очередь, в области черной

субстанции (ЧС). В составе этих эозинофильных включений в качестве основного компонента был обнаружен агрегированный альфа-синуклеин. Мутации в гене альфа-синуклеина (*SNCA*) часто являются причиной изменения его агрегационных свойств и формирования включений. Альфа-синуклеин присутствует в пресинаптических терминалах многих типов нейронов, где он может играть важную роль в нейротрансмиссии путём регуляции синтеза, высвобождения и повторного поглощения различных нейротрансмиттеров. Дефицит альфа-синуклеина может быть компенсирован в течение длительного времени либо за счёт гомологичности функций других членов семейства синуклеинов, либо за счёт включения какого-то другого механизма в развивающейся нервной системе, у стареющих животных с отсутствующим альфа-синуклеином (нокаут), развивается нейрональный и синаптический дефицит. Другое ограничение традиционных нокаутных мышинных моделей альфа-синуклеина заключается в том, что инактивация гена происходит во всех клетках организма. Поэтому даже несмотря на то, что альфа-синуклеин в основном присутствует в нейронах, невозможно исключить тот факт, что инактивация гена носит системный эффект, а истощение в других клетках, например, в эритроцитах, может иметь эффект на физиологию животных в целом, что может затруднить интерпретацию наблюдаемых фенотипов. Поэтому возможность целенаправленного истощения альфа-синуклеина в конкретной клеточной популяции имеет важное значение для лучшего понимания нормальной функции этого белка и его роли в патологии человека. Исключительно важной задачей стала разработка линий с кондиционным (регулируемым) нокаутом с использованием нейроспецифичной Cre-рекомбиназы. В ходе работ по созданию линии были также выведены и охарактеризованы дополнительные линии, а именно: (1) линия мышей с инактивированным геном *SNCA*, экспрессия которого может быть условно восстановлена FLP-рекомбиназной делецией неокассеты; (2) мыши с «чистым нокаутом» альфа-синуклеина, у которых нет дополнительных генетических элементов, таких как неокассеты, и других эктопических последовательностей, которые могли бы вмешиваться в функцию генома; а также (3) линия мышей с тем же «чистым нокаутом», но со связанным с репортерным локусом *Rosa26-stop-lacZ*, который расположен на той же 6-й хромосоме мыши.

Используя традиционные подходы по модификации генома, была создана новая линия мышей, которая для инактивации альфа-синуклеина задействует

Cre-рекомбиназу в транскрипционно активном локусе *Snca*^{floxΔneo}. Проведённый иммуноблоттинг показал, что в нервных тканях гомозиготных животных линии *Snca*^{floxΔneo/floxΔneo} с делетированной неокассетой уровень альфа-синуклеина восстанавливается до дикотипного уровня. Путём перекрёстного бридинга были получены гомозиготные животные [*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}/*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}], которые впоследствии были использованы для выведения новой линии. В этой мышинной линии экспрессия альфа-синуклеина в нейрональных тканях была такой же, как и у животных дикого типа [*Snca*⁺ *_Rosa26*^{wt}/*Snca*⁺ *_Rosa26*^{wt}], тогда как в нейрональных тканях у нового нокаута [*Snca*⁻ *_Rosa26*^{mod}/*Snca*⁻ *_Rosa26*^{mod}] альфа-синуклеин не обнаруживался (рис. 9А). Активация Cre-рекомбиназы в нейронах у линии мышей [*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}/*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}] приводила к экспрессии гена *lacZ* из модифицированного локуса *Rosa26* (рис. 4).

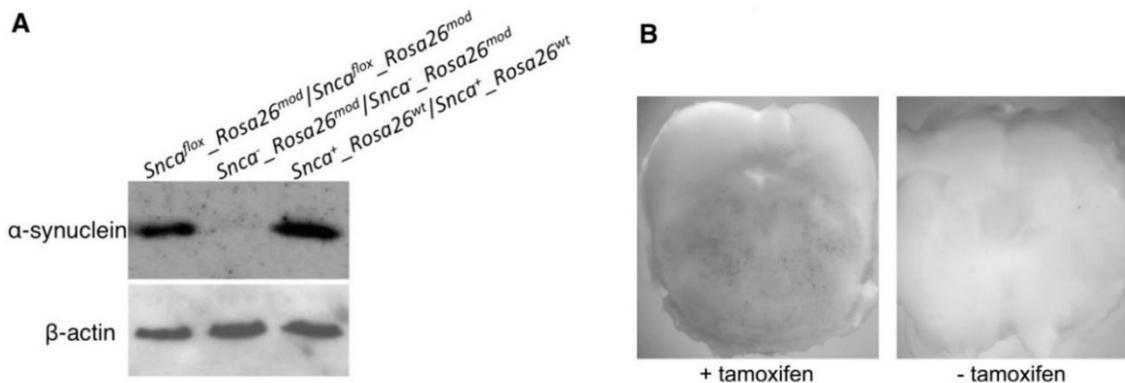


Рисунок 4 – Иммуноблоттинг альфа-синуклеина в стволе мозга полученных трансгенных животных (А) и определение активности β-галактозидазы методом X-gal в поперечных срезах ствола мозга мышей после индуцированной тамоксифеном активации Cre-ERT2 рекомбиназы (В)

Показано, что для получения экспериментальных когорт было достаточно скрестить линию животных с Cre-рекомбиназой, несущих копию *Snca*^{flox} аллеля, с животными линии *Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}/*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}. Линия трансгенных животных [*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}/*Snca*^{flox} *_Rosa26*^{mod}] предпочтительна для использования в экспериментах со стереотаксической доставкой Cre-рекомбиназы, например, для инактивации гена *Snca* вирусными конструктами или при трансфекции первичных нейрональных культур с последующей инактивацией гена *SNCA*.

Дальнейшее изучение линии *Snca*^{Δflox/Δflox} с нокаутом гена альфа-синуклеина позволило изучить патогенетические аспекты дифференциального поражения дофаминергических (ДА) нейронов при истощении пула функционального альфа-синуклеина. Иммуногистохимический анализ срезов

головного мозга выявил, что при формировании предшественников дофаминергических нейронов в чёрной субстанции (ЧС) у животных в период эмбриогенеза на стадии E11.5 количество ТГ-позитивных клеток одинаково в обеих группах (рис. 5). В раннем постнатальном периоде морфометрический анализ ДА нейронов в ЧС у *Sncα^{Afllox/Afllox}* мышей на 7-й день после рождения показал, что у нокаутных животных их число статистически достоверно выше (9%), чем у контрольных животных дикого типа. Однако при анализе ДА нейронов в вентральной области покрышки (ВОП) и на этом этапе развития nigrostriарной системы не было выявлено статистически достоверных различий у нокаутных животных и контрольных животных дикого типа. Было показано, что у молодых взрослых животных происходит компенсаторная нормализация количества ДА нейронов и статистически достоверной разницы в количестве клеток не обнаруживается ни в ВОП, ни в ЧС.

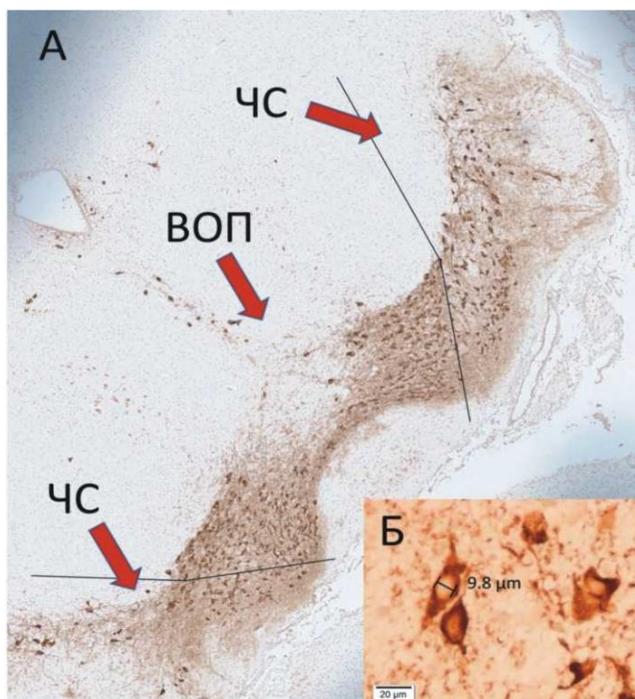


Рисунок 5 – Иммуногистохимическое окрашивание среза головного мозга мыши для подсчёта ТГ-позитивных нейронов. А. Общий план, локализация черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) в среднем мозге мыши на 7-й день постнатального развития. Окраску на тирозин-гидроксилазу проводили моноклональными антителами. Стрелками указаны области чёрной субстанции для левой и правой сторон и вентральной области покрышки. Увеличение 100×. Б. Измерение диаметра ядра нейрона. Увеличение 200×)

Инактивация альфа-синуклеина тамоксифеном в новой нокаутной линии

В возрасте 6 месяцев гетерозиготным мышам линии *Sncα^{flox/-}* с копией нейронспецифичной трансгенной кассеты NSE/Cre-ERT2 были сделаны инъекции тамоксифена. Через четыре месяца (т.е. в возрасте 10 месяцев) анализ уровня альфа-синуклеина методом иммуноблоттинга в полосатом теле показал, что альфа-синуклеин не детектировался у животных с инъекцией тамоксифеном, тогда как у контрольных животных уровень белка сохранялся на прежнем уровне как у самцов, так и самок (рис. 6).

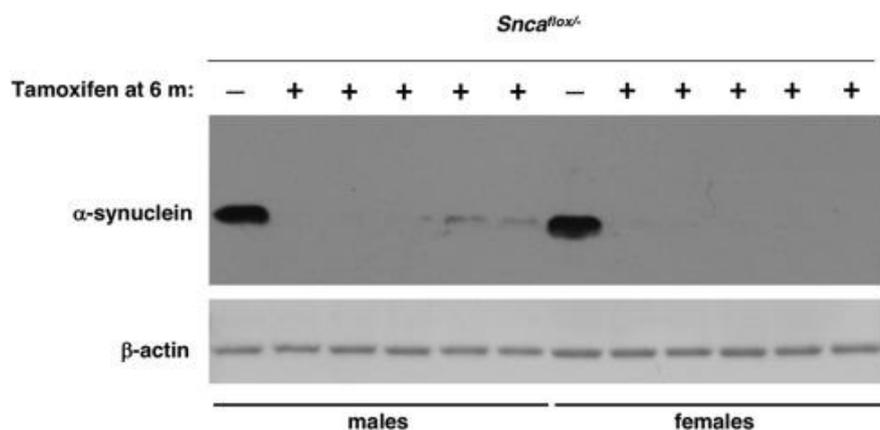


Рисунок 6 – Истощение альфа-синуклеина в полосатом теле после инактивации тамоксифеном. Анализ уровня белков методом иммуноблоттинга в образцах у 10-месячных мышей линии *Snca^{flox/-}* с копией трансгенной кассеты NSE/Cre-ERT2 после введения тамоксифена или носителя в возрасте 6 месяцев (β-актин – контроль)

Инактивация альфа-синуклеина не приводит к изменению числа ТГ-позитивных нейронов в полосатом теле и области покрышки, а также изменению координации и равновесия у трансгенных животных

Количественный и качественный анализ ТГ-позитивных нейронов у трансгенных животных в возрасте 14-ти и 18-ти месяцев в двух областях мозга – полосатом теле и вентральной области покрышки, показал, что у животных новой линии *Snca^{flox/-}* обработка тамоксифеном в 6-ти месячном возрасте не приводит к значимым изменениям в окраске нейронов. Это означает, что истощение пула функционального альфа-синуклеина в нейронах взрослых животных не должно приводить к их потере, что коррелирует с другими работами. Действительно, инактивация гена *SNCA* в возрасте 6-ти или 12-ти месяцев не привела к уменьшению количества ТГ-положительных нейронов в полосатом теле 18-месячных мышей. Поэтому, подобно большинству развивающихся нейронов, взрослые дофаминергические нейроны в полосатом теле способны эффективно компенсировать отсутствие альфа-синуклеина. Важным фенотипическим открытием было отсутствие значимых отличий в физиологических тестах моторных функций трансгенных животных на «ротароде» и «перевернутой сетке». Полученные данные согласуются с биохимическими и морфологическими результатами изучения нигростриарной системы и лишь подчёркивают, что отсутствие альфа-синуклеина не влияет на моторный фенотип полученных трансгенных животных.

Оценка двигательной активности стареющих нокаут-животных по альфа-синуклеину

Ранее было показано, что инактивация генов всех трёх членов семейства синуклеинов вызывает гиперактивность у молодых взрослых тройных нокаут-

мышей. Инактивация только альфа-синуклеина гена у взрослых животных вызвала постепенное развитие аналогичного фенотипа у 10-месячных мышей линии *Sncα^{fllox/-}* после введения тамоксифена в возрасте 6-ти месяцев при оценке двигательной активности по сравнению с контрольными животными (рис. 7).

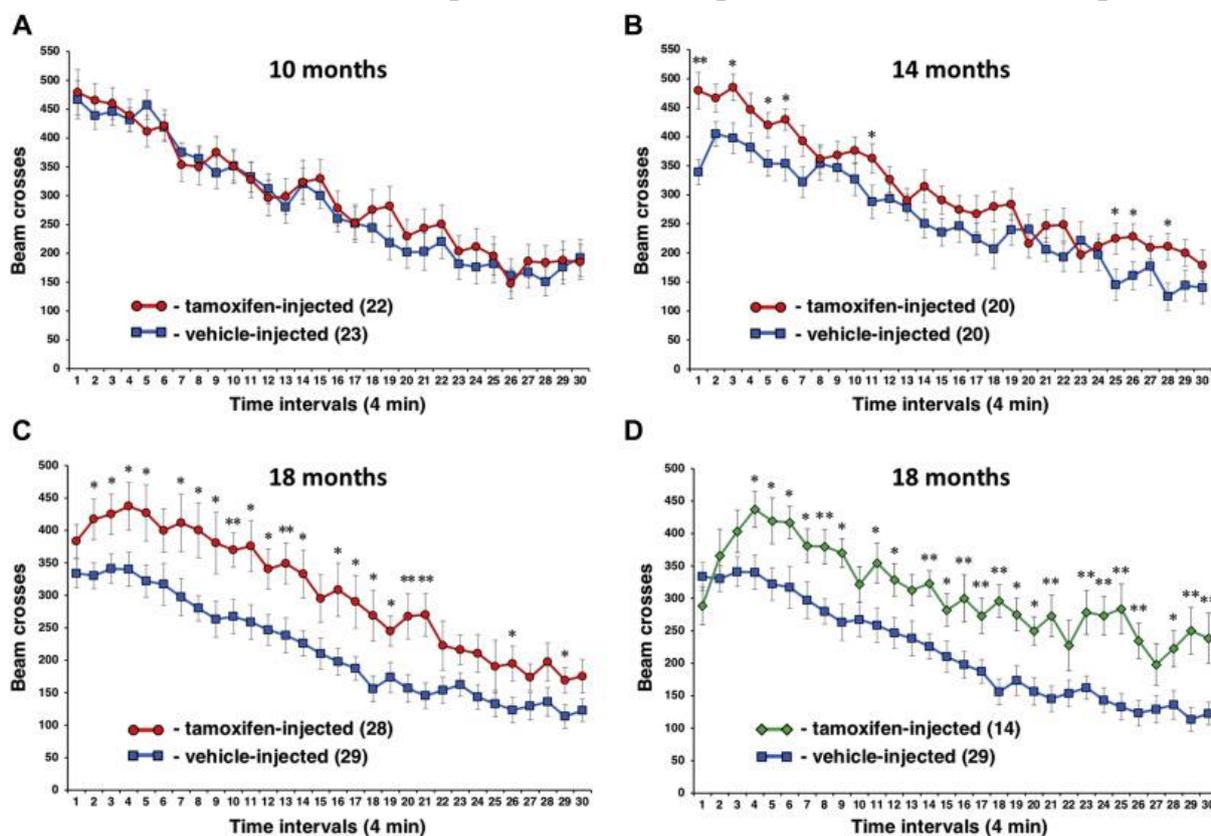


Рисунок 7 – Анализ локомоторных функций у трансгенных животных. Графики показывают среднее значение количества пересечений инфракрасного луча за 4-минутный интервал. Животные линии *Sncα^{fllox/-}* после инъекции тамоксифена в 6 месяцев, тестировались в возрасте 10-ти (A), 14-ти (B) и 18-ти (C) месяцев, при этом группа мышей *Sncα^{fllox/-}* с введением тамоксифена в возрасте 12 месяцев тестировалась в возрасте 18-ти месяцев (D). В скобках указано количество животных в каждой группе (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, тест Фишера)

Однако у 14-месячных мышей наблюдался гиперактивный фенотип, который усугубился к 18-ти месяцам. Схожие результаты были получены у животных с введением тамоксифена в возрасте 12-ти месяцев. Анализ ANOVA не выявил существенных различий между животными, обработанными тамоксифеном, и контрольных животных без введения, протестированных в возрасте 10-ти месяцев, но эта разница была значительной в группе 14-ти и в 18-ти месяцев, а также у животных с введением тамоксифена 12-ти месячного возраста и последующего тестирования в 18 месяцев (рис. 7D). Результаты проведённых исследований показывают, что снижение уровня альфа-синуклеина не вызывает долгосрочных неблагоприятных последствий для функциональности взрослых нейронов и поэтому может рассматриваться как безопасный вариант

терапевтического вмешательства. Однако истощение функционального пула альфа-синуклеина на поздних этапах развития может привести к незначительным функциональным изменениям в нигростриарной системе. Поэтому чтобы уменьшить вероятность нежелательных побочных эффектов, лечение, направленное на снижение уровня альфа-синуклеина, следует начинать на ранних стадиях заболевания. Таким образом, был создан набор уникальных линий трансгенных мышинных моделей с кондиционной экспрессией эндогенного альфа-синуклеина, а также новая улучшенная линия с конституционной инактивацией гена альфа-синуклеина. Эти линии могут быть использованы не только для изучения нормальной функции альфа-синуклеина в отдельных популяциях нейронов, но и для изучения его роли в развитии нейродегенеративных процессов и в качестве адекватных моделей для поиска новых терапевтических средств и оценки их эффективности.

2.2 Моделирование FUS-протеинопатии в трансгенных животных

Среди генов, ассоциированных с наследственными и спорадическими формами бокового амиотрофического склероза, описаны гены *SOD-1* (супероксиддисмутаза-1), *C9ORF72* с мультипликацией нуклеотидного повтора на 9-й хромосоме, ДНК/РНК-связывающие белки TDP-43 (Transactivation-responsive DNA-binding Protein-43) и FUS (fused in sarcoma), и ряд других менее изученных мутаций. Из всех наследственных случаев – 5% БАС связаны с мутацией в гене FUS с характерными FUS-реактивными включениями, обнаруживаемыми при патогистологическом анализе в цитоплазме нейронов. Основные БАС- и ФТЛД-ассоциированные мутации в гене FUS локализованы в экзоне, кодирующем сигнал ядерной локализации, в результате чего белок меняет компарментализацию и накапливается в цитоплазме и агрегирует. Цитотоксический эффект нарушения локализации белка обусловлен патологией метаболизма FUS и изменением регуляции процессинга РНК, транскрипции, сплайсинга и образования функциональных стресс-гранул, поскольку именно эти процессы в норме регулируются белком FUS.

2.2.1 Короткоживущая линия FUS-протеинопатии с делецией РНК-распознающего домена (FUS Δ RRM_{cyt})

Одной из самых ярких полученных моделей была линия животных с привнесённой мутацией R522G в домене сигнале ядерной локализации, а также делецией в домене распознавания РНК (RRM). У животных содержалась копия трансгенной кассеты с мутантным человеческим белком FUS и делецией в РНК-

распознающем домене (область 300-360 а.к.) под контролем пан-нейронального промотора Thy-1 (рис. 8).

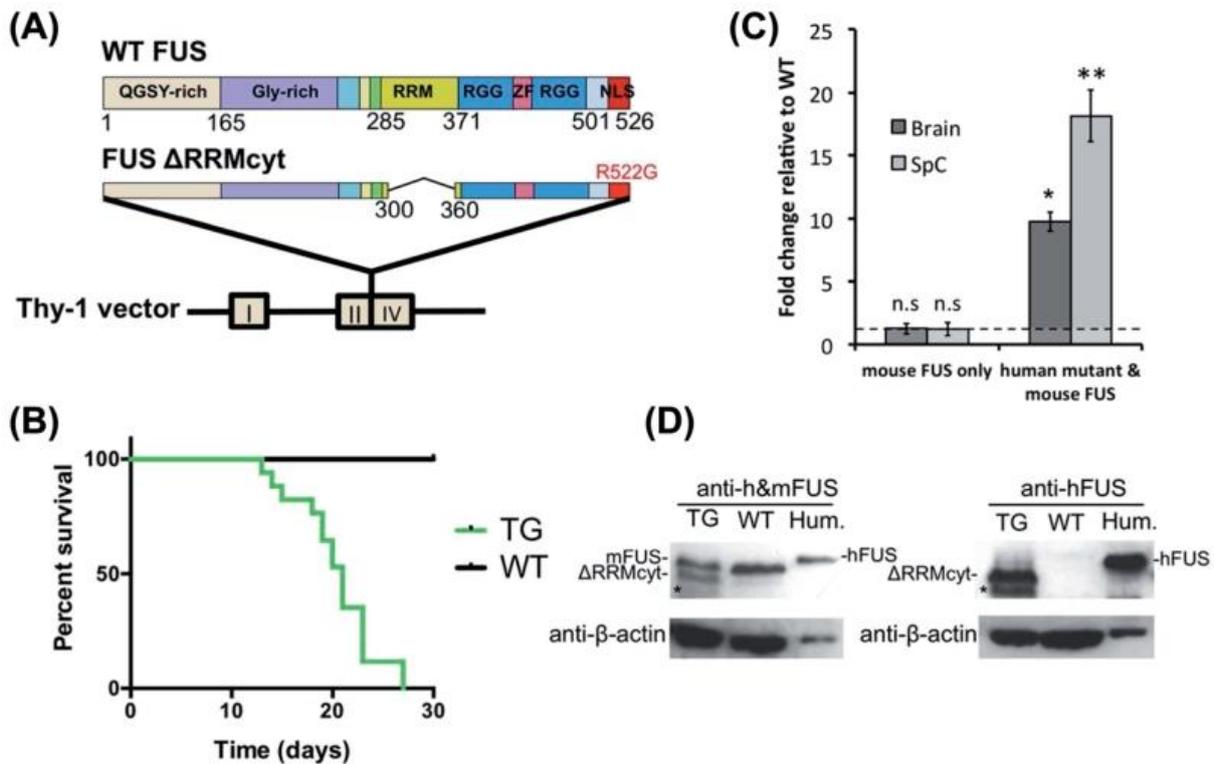


Рисунок 8 – Нейрональная экспрессия цитоплазматического белка FUS человека с делецией в домене распознавания РНК. (А) схема фрагмента ДНК для создания модели. (В) кривая выживания трансгенных животных F1 (TG) в сравнении с диким типом (WT) (TG, n = 17; WT, n = 18). (С) уровень экспрессии FUS в головном и спинном мозге мышей (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, n = 3, тест Манна-Уитни). (D) Анализ накопления белков FUS методом иммуноблоттинга в лизатах головного мозга мышей TG и WT с использованием антител против FUS человека или против FUS человека и мыши. В качестве положительного контроля (Hum) использовали клеточные лизаты клеток нейробластомы человека (SH-SY5Y) (β -актин – контроль)

Потомство линии FUS Δ RRMcyt (TG) было значительно меньше, чем животные дикого типа (WT) в тех же помётах (снижение массы тела $\sim 30\%$), с очень ранней летальностью – продолжительность жизни в среднем возрасте составляла 20 ± 1 дней (n = 17). Приблизительно 25% животных умерли внезапно до появления каких-либо детектируемых фенотипических признаков. У остальных трансгенных животных развивался выраженный тремор в среднем за два дня до смерти, причём продолжительность выживания после начала симптомов не превышала пяти дней. В результате скоротечной прогрессии симптоматической фазы было исключительно трудно провести детальный поведенческий анализ этих животных, а также невозможно было получить потомство, поэтому была охарактеризована экспрессия трансгена и связанная с ней патология в поколении F1. Анализ уровня экспрессии трансгенной кассеты

методом ОТ-ПЦР в образцах спинного и головного мозга у трансгенных и дикотипных животных с использованием пары праймеров, специфичных для эндогенного и мутантного человеческого FUS, показал, что уровни FUS в головном (9.8 ± 0.77) и спинном мозге (18.1 ± 2.07) были значительно выше у трансгенных животных по сравнению с дикотипными животными из тех же помётов. Поскольку уровень экспрессии эндогенного FUS у животных не был существенно изменён по сравнению с животными дикого типа в головном и спинном мозге, то увеличение уровня РНК FUS может быть вызвано непосредственно экспрессией трансгена. Анализ уровня мутантного человеческого трансгенного белка ΔRRM_{cyt} FUS в мозге трансгенных мышей методом иммуноблоттинга с использованием специфичных антител к человеческой изоформе FUS или антител, распознающих обе изоформы, показал, что интенсивность окрашивания бэндов, соответствующих белку ΔRRM_{cyt} FUS, сопоставима с интенсивностью полосы для эндогенного мышинового белка. Таким образом с использованием биохимических методов анализа было показано, что значительного различия в экспрессии эндогенного FUS белка мыши не обнаружено в лизатах головного и спинного мозга из однопомётных трансгенных и дикотипных животных. Это свидетельствует о том, что привнесение патогенного белка не повлияло на уровень эндогенного мышинового белка FUS. Также важно отметить, что наблюдаемый фенотип был прямым результатом экспрессии трансгена с делецией в РНК-связывающем домене и аминокислотной замене R522G.

Иммуногистологический анализ трансгена ΔRRM_{cyt} FUS и оценка отложений в нервных тканях

Проведённое иммуногистологическое исследование срезов головного мозга с использованием моноклональных антител, распознающих как эндогенную, так и мутантную человеческую изоформу белка FUS, показало выраженное цитоплазматическое окрашивание клеток коры и ствола головного мозга трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий FUS ΔRRM_{cyt} , но при этом у животных дикого типа эндогенный белок FUS был преимущественно локализован в ядре (рис. 9). У трансгенных животных наблюдалось перераспределение мутантного белка FUS в цитоплазме с формированием круглых и плотных включений различного вида, напоминающих патологические включения в нейронах пациентов с БАС. Иммуногистохимический анализ показал, что характер и локализация включений специфична к белку FUS,

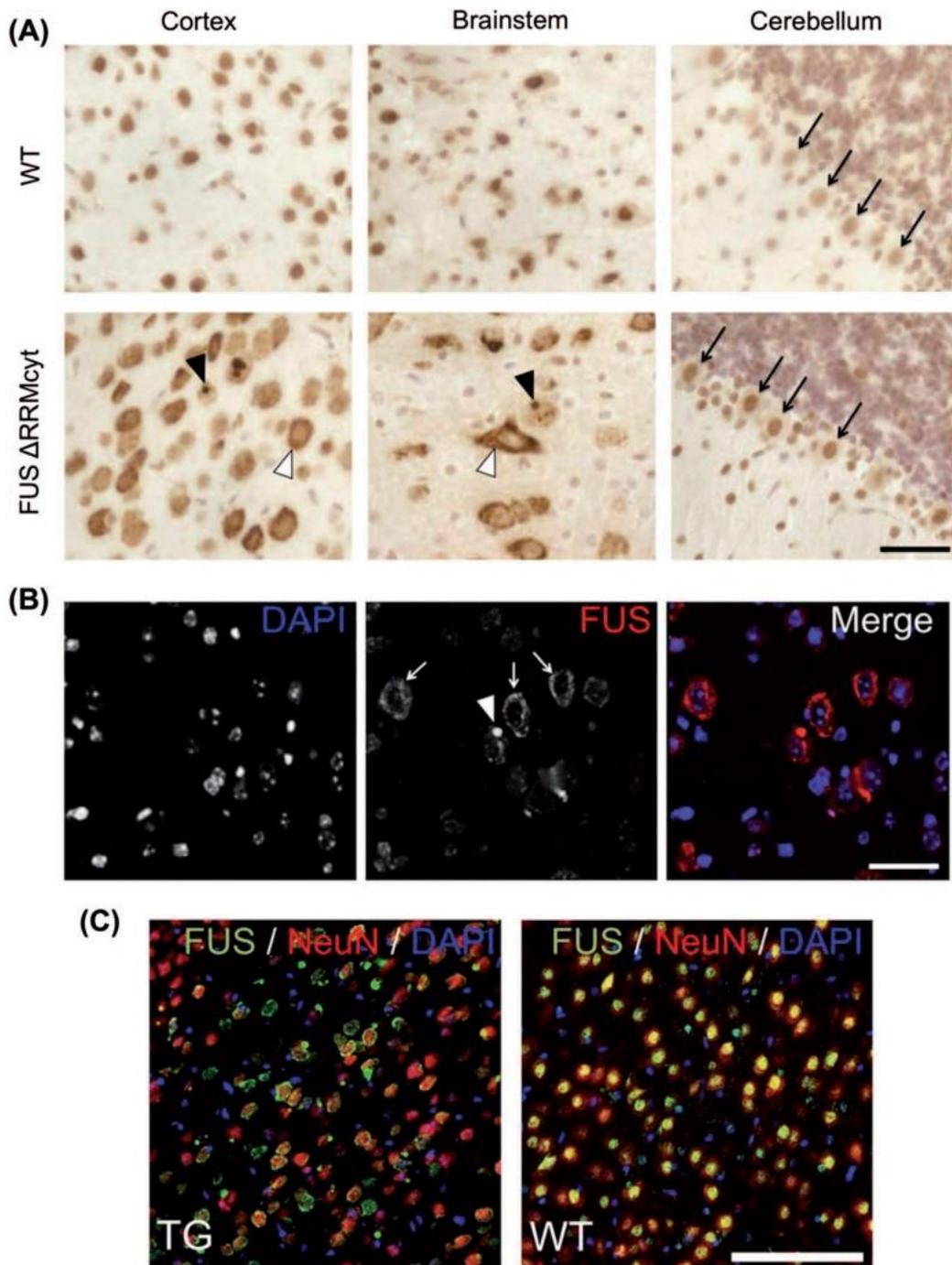


Рисунок 9 – Перераспределение белка FUS в нейронах коры и ствола головного мозга у трансгенных животных. (А) Цитоплазматическое распределение белка FUS клетках мозжечка, коры и ствола. (В) Иммунофлуоресцентное окрашивание FUS с контрастирующим DAPI. (С) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание FUS и нейронального ядерного маркера – NeuN. Шкалы: (А) и (В) – 25 мкм, (С) – 100 мкм

при этом у мышей дикого типа локализация FUS преимущественно ядерная. Результаты экспериментов с коиммуноокрашиванием белка FUS и нейронального маркера NeuN показали, что перераспределение мутантной изоформы белка FUS происходит в значительной доле в нейронах коры головного мозга (рис. 10). У однопомётных животных дикого типа наблюдалось диффузное окрашивание маркера стрессовых гранул TIAR в ядре и цитоплазме,

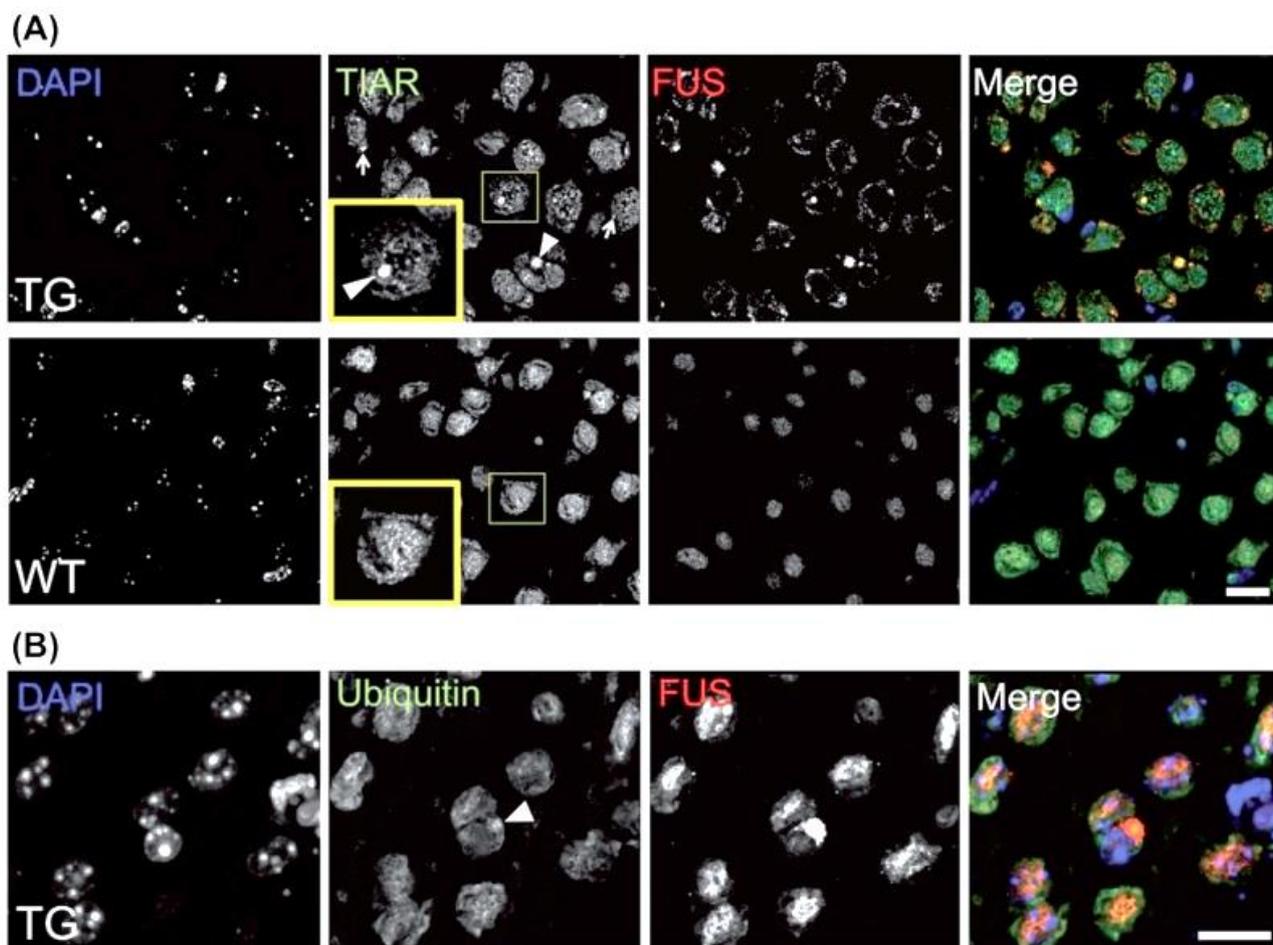


Рисунок 10 – Характеристика FUS-положительных отложений в трансгенной модели протеинопатии FUS Δ RRM_{cut}. (A) Колокализация FUS-положительных включений с маркером TIAR в клетках головного мозга трансгенных мышей (TG) и животных дикого типа (WT). (B) FUS-положительные включения (стрелки) иммунореактивны к убиквитину. Шкалы: 15 мкм

однако у трансгенных мышей детектировалась колокализация TIAR и FUS. Было также отмечено, что в нейронах с цитоплазматической локализацией FUS существенно снижалось ядерное окрашивание FUS. В клетках Пуркинье окрашивание белка FUS было слабым без наличия FUS-положительных включений или отложений, характерных для клеток коры головного мозга. У трансгенных животных большинство крупных FUS-положительных включений и мелких гранулоподобных скоплений стресс-маркера TIAR также содержали убиквитинированные белки. Все проанализированные области спинного мозга у трансгенных животных FUS Δ RRM_{cut} не содержали каких-либо характерных для БАС структурных изменений, которые затрагивают верхние мотонейроны коры и ствола мозга, а также нижние мотонейроны спинного мозга.

Несмотря на выраженную протеинопатию, тремор и раннюю летальность, вызванную экспрессией мутантного FUS Δ RRM_{cut} в цитоплазме, не удалось обнаружить никаких признаков нейродегенерации или сопровождающего

воспалительного глиального ответа в моторных нейронах коры или ствола мозга, которые обычно поражаются при БАС. Полученные результаты схожи с данными от другой мышинной модели со сверхэкспрессией полноразмерного FUS человека у гомозиготных мышей, которая приводит к тремору с ранним началом симптоматики и параличу конечностей, и летальному исходу у молодых животных чуть более старшего возраста, чем у мышей FUS Δ RRMcut. Трудно определить точный молекулярный механизм развития смоделированной тяжёлой патологии, но можно предположить, что очень ранняя смерть мышей FUS Δ RRMcut до или вскоре после развития тремора, но до появления каких-либо двигательных симптомов, отражает драматические изменения внутриклеточных регуляторных или сигнальных процессов, которые приводят нейроны всей нервной системы к дисфункции, прежде чем какое-либо структурное детектируемое повреждение этих клеток станет очевидным. Такая системная дисрегуляция может оказывать непреодолимые последствия на функции организма, например, вызывая нарушение регуляции дыхательного контроля, приводя к гибели животного до того, как изменения, более типичные для патологии БАС, станут очевидными в моторных нейронах. Тем не менее, было впервые показано, что перераспределение белка FUS с нарушенной РНК-связывающей способностью вызывает яркую и фатальную патологию в нервной системе мыши. Такие модели позволяют более точно воспроизвести пространственную и временную регуляцию изоформ FUS с различными модификациями и крайне необходимы для полного понимания взаимосвязи между патологической агрегацией и нарушенным связыванием РНК белка FUS в развитии нейрональной дисфункции.

2.2.2 Модель БАС на основе линии трансгенных мышей Δ FUS(1-359)

Созданная и протестированная в клеточных культурах ДНК-конструкция, кодирующая абберрантную форму белка FUS с удалённым сигналом ядерной локализации и неспособная к взаимодействию с РНК, легла в основу создания линии Δ FUS(1-359). Изменения в структуре гена привели к нарушению взаимодействия белка FUS с РНК и его перераспределению с накоплением в цитоплазме. Трансгенная кассета была сконструирована на основе вектора 323_PTSC-21K. Использование промотора Thy-1 обеспечило преимущественно нейроспецифическую экспрессию трансгенной кассеты, которая была введена в пронуклеус ранних эмбрионов мыши и получено поколение животных с модифицированным геномом в двух независимых линиях, в которых введённая

модификация передавалась по наследству. Анализ белка из тканей спинного мозга, ствола и коры головного мозга Δ FUS(1-359) мышей подтвердил присутствие укороченной абберрантной формы белка FUS человека, которая кодировалась трансгенной кассетой (рис. 11).

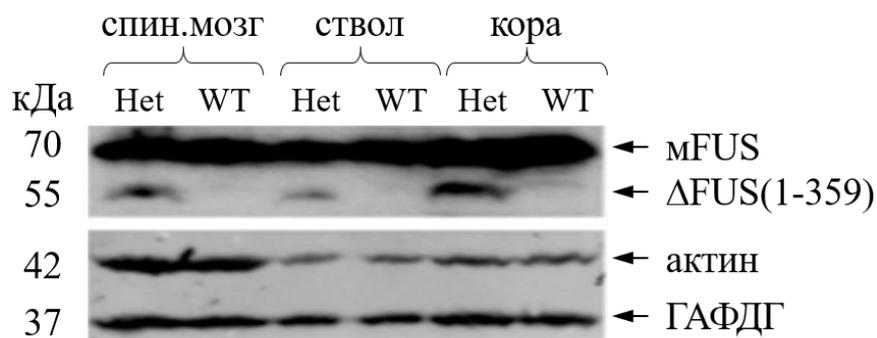


Рисунок 11 – Анализ содержания эндогенной мышинной (mFUS) и укороченной человеческой Δ FUS(1-359) изоформ белка FUS в тканях нервной системы трансгенных (Het) и дикотипных животных (WT) (актин и ГАФДГ – контроль)

Существенное преимущество полученной модели заключается в развитии патологического фенотипа при исключительно низком уровне трансгенной мутантной укороченной изоформы белка FUS человека, которое было достаточным для инициации и развития нейродегенеративного процесса. Животные были переведены на другой генетический фон путём обратного скрещивания с аутбредной линией лабораторных мышей CD1. Трансгены линии Δ FUS(1-359) рождались без внешних признаков патологии: они нормально развивались, были фертильны и оставляли жизнеспособное потомство. С возрастом у них проявлялись признаки развития нейродегенеративного процесса, выраженность и динамика которых не зависела от генетического фона линии Δ FUS(1-359). Первые признаки, наиболее часто выражавшиеся в прогрессирующих односторонних парезах задних и передних конечностей, отмечались у взрослых половозрелых животных, начиная с возраста 10-12 недель. Неврологическая симптоматика развивалась стремительно, модельное заболевание характеризовалось быстрой прогрессией и часто даже инструментальными методами не удавалось выявить у животных отклонения, предшествующие переходу из предсимптоматической в симптоматическую стадию. Не позднее, чем через две недели после выявления первых симптомов заболевание переходило в терминальную стадию с тетраплегией и к возрасту 25 недель все трансгенные животные погибали. Важным элементом доказательства нашей гипотезы о ключевой роли FUS-протеинопатии в развитии специфического нейродегенеративного процесса с преимущественным

поражением двигательных нейронов явился патогистологический анализ FUS-реактивных включений в спинном мозге Δ FUS(1-359) мышей, выявивший присутствие в составе включений эндогенного полноразмерного белка FUS мыши (рис. 12).

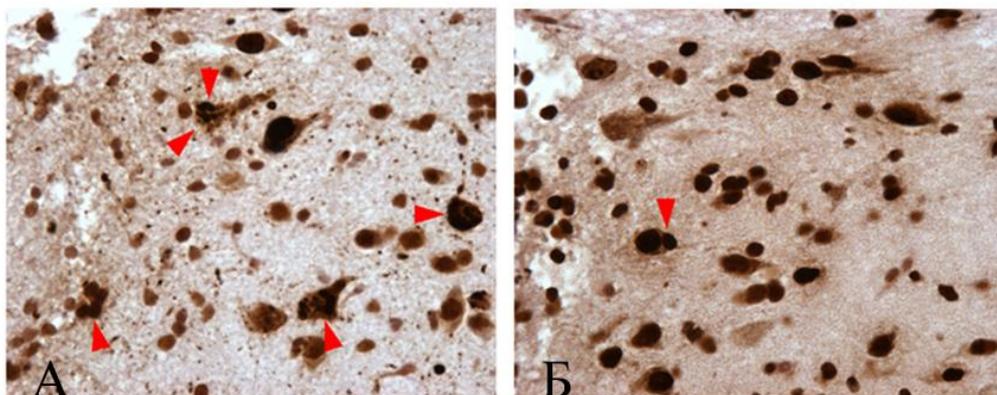


Рисунок 12 – Иммуногистохимическое окрашивание FUS-реактивных включений в нейронах передних рогов спинного мозга Δ FUS(1-359) мышей антителами против N-концевой части белка FUS человека (А) и С-концевой части белка FUS мыши (Б). Увеличение 200×

Таким образом, было показано, что aberrantная форма FUS(1-359) человека способна индуцировать агрегацию эндогенного белка FUS мыши и вовлекать его в состав патогистологических депозитов, т.е. инициировать протеинопатию. Исключение белка в результате индуцированной агрегации из нормального метаболизма и его последующая функциональная недостаточность приводят к необратимым патологическим изменениям.

Уменьшение продолжительности жизни и двигательная дисфункция у мышей линии Δ FUS(1-359)

Оценка продолжительности жизни трансгенных животных линии Δ FUS(1-359) выявила, что примерно половина животных погибают в возрасте трёх месяцев. Как правило гибель животных была связана с ярко выраженной симптоматической фазой с проявлением парезов и параличей конечностей. Иммуногистохимическое окрашивание срезов спинного мозга шейного отдела показало накопление FUS-позитивных включений у животных на симптоматической стадии (120 дней) и сравнительно меньшее количество включений в предсимптомной фазе (90 дней). Характеристику двигательной дисфункции и походки проводили ежедневно на системе Noldus CatWalk, начиная с предсимптоматической фазы и до появления первых видимых симптомов (парезы конечностей) (рис. 13). В результате определены параметры «средняя скорость» и «скорость передвижения конечностей», которые

изменялись в значительной степени в зависимости от стадии заболевания и прогрессированию патологии у животных линии $\Delta FUS(1-359)$.

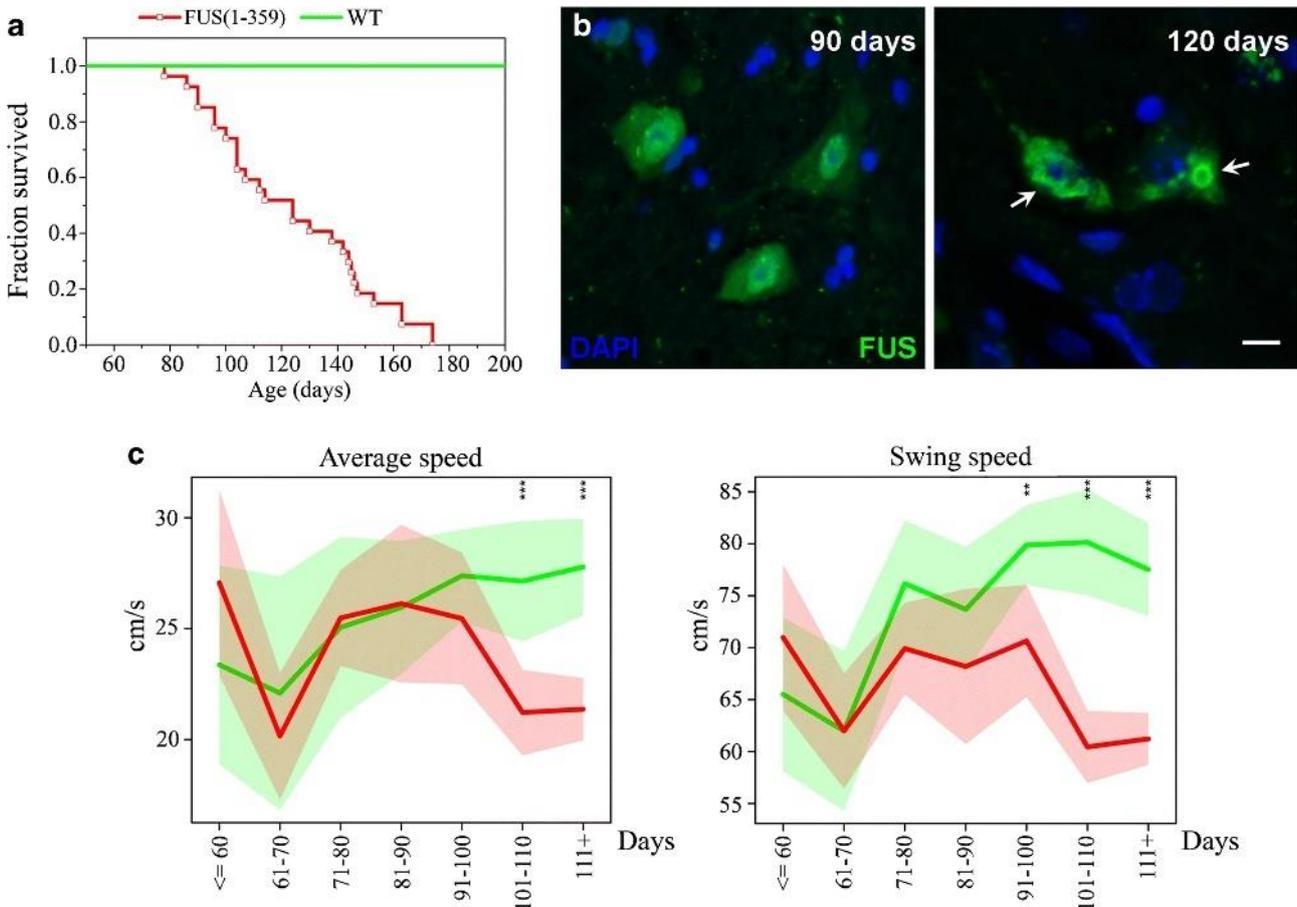


Рисунок 13 – Снижение продолжительности жизни и двигательной функции у трансгенных мышей со сверхэкспрессией aberrантной формы белка FUS(1-359). (A) График Каплана-Мейера выживаемости трансгенных мышей $\Delta FUS(1-359)$ ($n=27$) и животных дикого типа ($n=28$) в течение 200-дневного периода. (B) Двойное иммуногистохимическое окрашивание срезов антителами, распознающими N-концевой эпитоп мышиной и человеческой изоформ белка FUS в шейном отделе спинного мозга трансгенных мышей на предсимптомной (90 дней) и симптоматической (120 дней) фазе. Стрелки указывают на множественные внутриклеточные FUS-позитивные включения в цитоплазме. Ядра окрашены DAPI. (C) Параметры оценки двигательной функции на установке Noldus CatWalk у мышей дикого типа ($n=63$, зелёная) и $\Delta FUS(1-359)$ трансгенов ($n=122$, красная) на разных стадиях развития заболевания. Шкала (B) – 10 мкм

Потеря спинномозговых моторных нейронов и волокон периферических нервов у трансгенных мышей линии $\Delta FUS(1-359)$

Агрегация и отложения мутантной укороченной формы белка FUS сопровождалась серьёзным повреждением нейронов и их аксонов. На симптоматической стадии мыши $\Delta FUS(1-359)$ теряют приблизительно половину спинных моторных нейронов, при этом большинство оставшихся нейронов имеют изменённую морфологию (рис. 14).

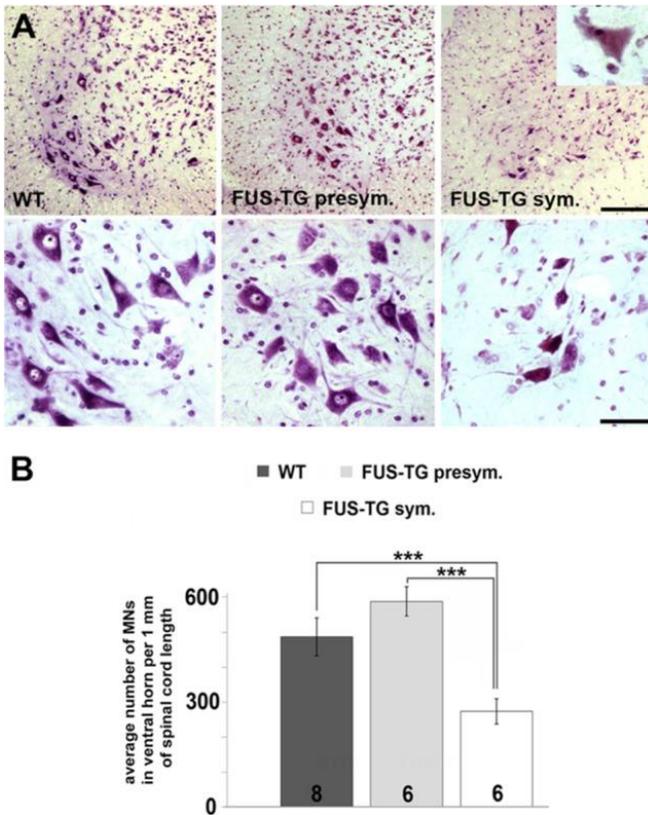


Рисунок 14 – Дегенерация и потеря спинномозговых моторных нейронов у симптомных мышей линии Δ FUS(1-359). (A) и (B) срезы вентральной части спинного мозга, окрашенных крезилом фиолетовым на предсимптомной (presym.) и симптоматической (sym.) фазах, а также животных дикого типа. (B) Среднее значение \pm SEM числа двигательных нейронов в вентральном роге спинного мозга. Вставка (A) показаны изменения в двигательных нейронах. Количество животных показано внизу каждого столбца (***) $p < 0.001$, тест Манна-Уитни). Шкалы: A (верхняя панель) – 100 мкм; A (нижняя панель) – 30 мкм

Однако наиболее вероятной причиной быстро развивающегося паралича мышц и мышечной атрофии у мышей линии Δ FUS(1-359) является поражение аксонов двигательных нейронов от концевых пластин мышц, поскольку значительная потеря нейронов и повреждение миелиновых волокон в периферических нервах могут наблюдаться только на финальных стадиях заболевания (рис. 15).

Для доказательства прямой связи прогрессии FUS-протеинопатии с развитием дегенеративного процесса в двигательных нейронах и их гибелью был проведён сравнительный морфометрический анализ нижних двигательных нейронов у модельных животных на разных стадиях заболевания. Результаты морфометрического анализа у линии Δ FUS(1-359) мышей при прогрессии FUS-протеинопатии показал, что во всех исследованных образцах уже на поздней предсимптоматической стадии отмечалось статистически достоверное ($p < 0.05$) уменьшение числа двигательных нейронов (до 40%) по сравнению с нетрансгенными контрольными животными того же возраста, а на терминальной стадии гибель составляла более 90% всех двигательных нейронов. Подобную картину наблюдают при патогистологическом анализе препаратов спинного мозга больных с БАС. Глиальный фибриллярный кислый белок, GFAP, был использован в качестве маркера активированных астроцитов, а для анализа микроглиоза был использован маркер Iba-1 – актин-связывающий белок,

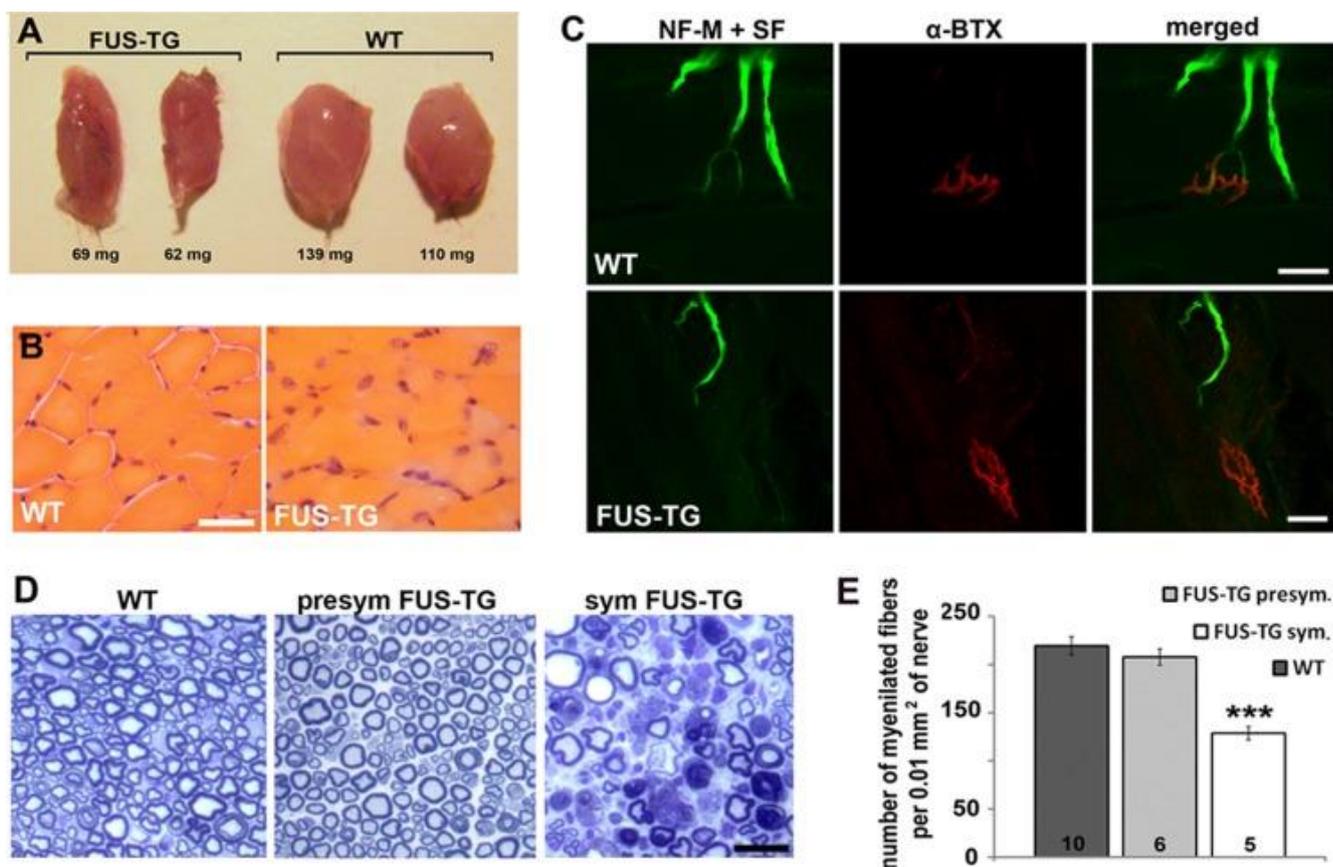


Рисунок 15 – Атрофия мышц, денервация и повреждение аксонов у мышей линии Δ FUS(1-359). (A) Атрофия скелетных мышц на терминальных стадиях заболевания: икроножные мышцы левой и правой конечностей (FUS-TG) в сравнении с тканями животного дикого типа (WT). (B) Повреждение мышечных волокон в икроножной мышце у парализованной конечности животного (FUS-TG) в сравнении с нормальными волокнами мышцы дикого типа (WT) (окрашивание гематоксилином и эозином). (C) Нервно-мышечный синапс в икроножных мышцах симптоматических (FUS-TG) и мышей дикого типа (WT). Концевая пластинка визуализирована окрашиванием α -бунгаротоксином (α -BTX), аксоны и пресинапсы визуализировали с помощью комбинации антител против нейрофиламента-M (NF-M) и синаптофизина (SF). (D) Срезы седалищного нерва у трансгенных мышей с симптомами (sym) и без симптомов (presym), окрашенных толуидиновым синим. (E) Уменьшение общего количества миелинизированных волокон в седалищном нерве у симптоматических животных. Гистограмма показывает среднее значение \pm SEM числа волокон, количество проанализированных нервных окончаний для группы указано внизу каждого столбца (***) $p < 0.001$, тест Манна-Уитни).

Шкалы: (B) – 50 мкм; (C) и (D) – 30 мкм

который усиливает передачу возбуждения по мембране и участвует в RAC-опосредованном сигнальном пути и в фагоцитозе (рис. 16). В зоне передних рогов спинного мозга у животных линии Δ FUS(1-359) на развитой симптоматической стадии заболевания был выявлен выраженный реактивный астроглиоз и признаки микроглиоза. Таким образом, было показано, что в данной

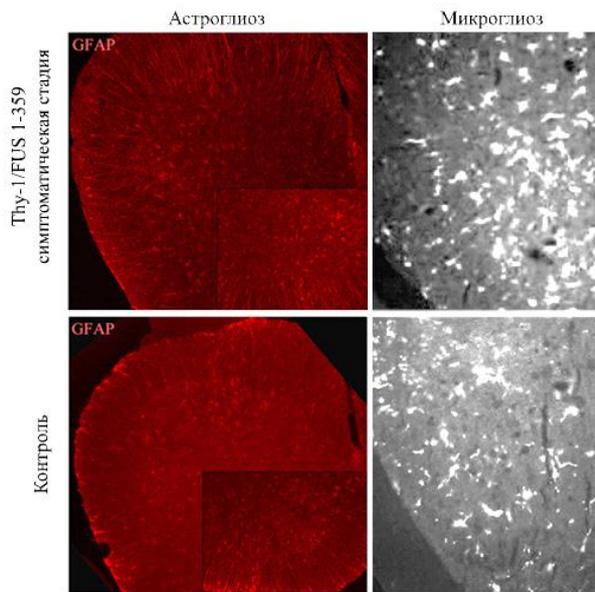


Рисунок 16 – Признаки нейровоспалительной реакции в передних рогах спинного мозга у $\Delta FUS(1-359)$ на поздней предсимптоматической стадии.

трансгенной модели $\Delta FUS(1-359)$ прогрессия протеинопатии сопровождается развитием нейровоспалительной реакции и гибелью мотонейронов, которая вносит свой вклад в патогенез модельного заболевания. В созданной нами линии трансгенных мышей $\Delta FUS(1-359)$ удалось воспроизвести агрегацию патогенной формы белка FUS, которая привела к патофизиологической картине, наблюдаемой при БАС, что позволяет считать данную линию адекватной моделью.

Анализ экспрессии генов методом РНК-секвенирования и сортировка моторных нейронов и микроглия-специфических генов

Важным этапом характеристики трансгенной модели было использование современных методов анализа экспрессии генов, которая возникает в ходе развития патологического процесса при накоплении отложений в цитоплазме нервных клеток трансгенных животных. Поэтому был использован метод РНК-секвенирования для измерения транскрипции во время нейродегенерации у трансгенных мышей линии $\Delta FUS(1-359)$. Чтобы идентифицировать дифференциально экспрессируемые гены, демонстрирующие существенные изменения экспрессии, был установлен порог и рассмотрены только флуктуации экспрессии не менее чем $\log_2FC \geq 1$. Кроме того, были отброшены гены с показателем CPM (количество на миллион) менее 0.5, как умеренно выраженные. Также был проведён корреляционный и PCA-анализ, который показал высокую степень сходства экспрессии генов между биологическими образцами. Дифференциальный анализ экспрессии в образцах шейного отдела спинного мозга выявил 125 и 999 генов на предсимптомной (90 дней) и симптоматической (120 дней) стадиях, соответственно ($FDR < 0.05$). Чтобы определить изменение экспрессии генов, связанных с возрастными показателями, был проведён анализ между молодыми бессимптомными животными (60 дней) дикого типа и симптоматическими (120 дней) мышами. В результате был отобран 51 ген ($FDR < 0.05$). Кроме того, сравнивались профили

экспрессии генов мышей дикого типа и трансгенных животных $\Delta FUS(1-359)$ молодого возраста, которые представляли бессимптомную группу (60 дней). Этот анализ выявил три гена, демонстрирующих умеренное влияние генетического фона на экспрессию генов исследуемых мышей ($FDR < 0.05$). Для уточнения трансген-зависимых изменений экспрессии генов, были сопоставлены DE-гены в спинном мозге мышей $\Delta FUS(1-359)$ на предсимптомной и симптоматической стадиях, причём вышеупомянутые группы сравнения представляли специфичные для линии и возрастные изменения экспрессии генов. В результате был определён ряд трансген-зависимых генов на предсимптомной (59 генов) и симптоматической стадиях (727 генов) прогрессирования заболевания. Поскольку транскриптомный анализ был проведён на образцах всей шейной области спинного мозга, поэтому важным этапом было разделение на популяции генов специфичных для двигательных (моторных) нейронов и микроглиальных генов среди общего количества полученных транскриптов. В результате нам удалось отобрать гены, обогащённые специфично только для популяции двигательных нейронов, экспрессия которых была увеличена в 5 раз по сравнению с микроглией и, наоборот, гены, присущие для микроглиальной популяции по сравнению с двигательными нейронами. При сравнении дифференциально экспрессирующих генов из двух разных популяций клеток было выявлено 23 гена ассоциированных с экспрессией в микроглиальных клетках и 12 генов – с двигательными нейронами на предсимптоматической стадии. Тем же подходом было идентифицирован 371 ген в микроглиальной популяции и 161 ген в двигательных нейронах на симптоматической стадии.

Повышенная экспрессия генов CD-рецепторов у трансгенных животных линии $\Delta FUS(1-359)$

Проведённый анализ экспрессии генов показал, что на симптоматической фазе у животных линии $\Delta FUS(1-359)$ в спинном мозге наблюдается повышенная экспрессия генов CD-рецепторов, которые участвуют в формировании иммунного ответа и могут быть кластеризованы в несколько групп в зависимости от их роли (рис. 17). К ним относятся рецепторы, участвующие в клеточной адгезии и регуляции межклеточных взаимодействий ($CD33$, $CD34$, $CD37$, $CD44$, $CD48$, $CD86$, $CD180$), фагоцитоза ($CD68$), активации лейкоцитов ($CD84$), и комплемент-опосредованный лизис клеток ($CD52$). Ранее было показано, что нарушение спинномозгового гематологического барьера

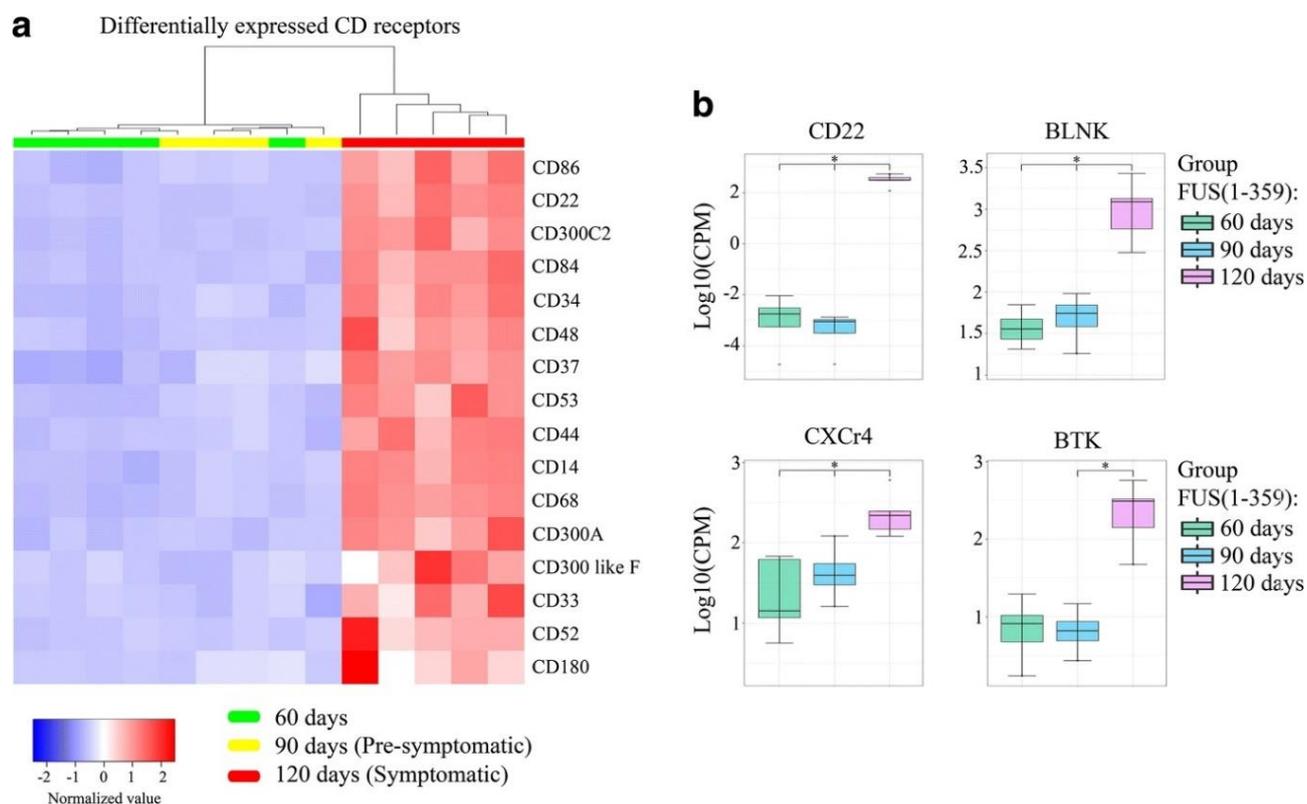


Рисунок 17 – Анализ дифференциальной экспрессии генов CD-рецепторов в спинном мозге мышей линии Δ FUS (1-359). (A) Тепловая карта дифференциально экспрессированных генов CD-рецепторов. (B) Боксплоты транскриптов, связанных с миграцией и созреванием В-клеток (* $p \leq 0.05$, тест Фишера)

в животных моделях БАС приводит к инфильтрации В и Т-клеток в спинной мозг из кровеносного русла. Повышенная экспрессия генов ряда рецепторов CD, вероятно, указывает на привлечение иммунных клеток к месту воспаления. Например, *CD86*, экспрессия которого повышается при активации микроглии в SOD-модели БАС и экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках, по-видимому, обеспечивает сигналы костимуляции для активации Т-клеток.

В нашей модели наблюдалось повышение экспрессии транскриптов *CD22*, который является специфическим маркером активации В-клеток, что коррелирует с исследованиями на другой модели БАС в линии *SOD1^{G93A}* животных. *CD22*, также известный как Siglec-2, является специфическим маркером активации В-клеток. Помимо *CD22*, также была увеличена экспрессия для *CXCr4*, который является рецептором хемокина CXCL12, одна из функций которого включает поддержание миграции В-клеток. Кроме того, была обнаружена положительная регуляция BLNK (белок-линкер В-клеток) и фактора созревания В-клеток BTK (тирозинкиназа Брутона), которые играют важную роль в передаче сигналов и созревании рецепторов В-клеток. Хорошо известно, что клетки микроглии экспрессируют многие факторы Siglecs (иммуноглобулиноподобные лектины, связывающие сиаловые кислоты),

включая *CD33*, *Siglec-E*, *Siglec-F* и *Siglec-H*. Было показано, что экспрессия *Siglec-F* и *Siglec-H* во время нейровоспаления подавляет воспалительный ответ, предотвращая чрезмерное поглощение апоптотических клеток. В нашей модели $\Delta FUS(1-359)$ было отмечено повышение экспрессии *CD33*, *Siglec-F*, *Siglec-1* и *CD22* в микроглии на терминальной стадии заболевания. *CD22*, также известный как *Siglec-2*, был описан как специфический корецептор В-клеток. В качестве рецептора В-лимфоцитов *Siglec-2* играет ключевую роль в активации В-клеток, способствуя ингибирующему эффекту контакта рецепторов В-клеток с антигенами. Это может свидетельствовать о привлечении иммунных клеток к воспалённым участкам спинного мозга. Напротив, в контексте нейрональных тканей *CD22* экспрессируется в нейронах для подавления выработки провоспалительных цитокинов в микроглии. Учитывая описанные функции *Siglecs*, можно предположить, что *Siglec-2* играет противовоспалительную роль в активации микроглии, поэтому вектором будущих исследований будет служить оценка активации этих факторов в развивающейся протеинопатии.

Изменения в метаболизме жиров у трансгенных животных линии $\Delta FUS(1-359)$

Нарушение липидного баланса оказывает негативное влияние на структурные и физиологические свойства мозга, функции нейронов и нейроглии, включая мембранный транспорт и контроль над активностью ферментов. Разрушение клеточной мембраны является характерной чертой нейродегенерации, возникающей при хронических заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС). Регуляторная роль липидов как вторичных мессенджеров выявляется при исследовании воспалительных процессов при БАС, которые сопровождаются активацией микроглии, потерей нейромышечных соединений и последующей дегенерацией мотонейронов. Среди липидов особое место занимают сфинголипиды, которые являются наиболее важными источниками вторичных мессенджеров, передающих сигналы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Дефекты метаболизма сфинголипидов обнаружены во многих нейродегенеративных заболеваниях, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера.

Анализ сфингозина, способного вызывать апоптоз в клетках ЦНС, проводили в возрасте 2, 3 и 4 месяцев. Количество сфингозина определяли в расчёте на вес ткани и на количество фосфора (мг) в липидном образце. Изменений в количестве сфингозина по отношению к контрольным значениям в расчётах на ткань в мозжечке, коре и гиппокампе практически не наблюдается, в

то время как в структурах спинного мозга на терминальной стадии (4 месяца) происходит четырёхкратное повышение уровня сфингозина (рис. 18).

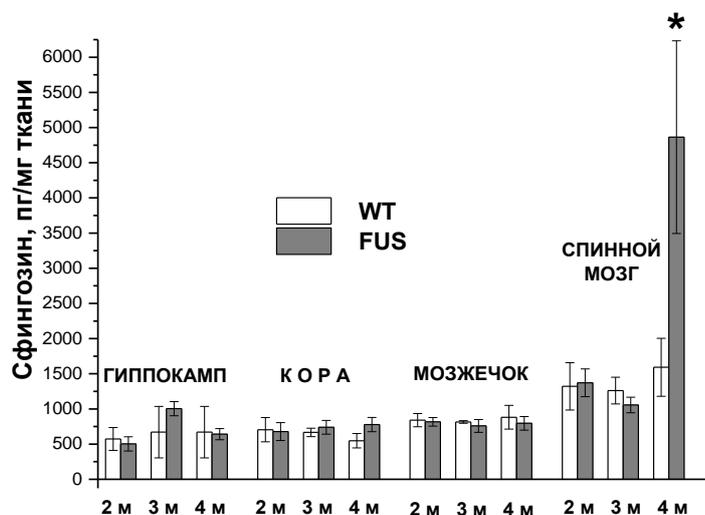


Рисунок 18 – Изменение уровня сфингозина в структурах головного мозга и в спинном мозге в процессе развития БАС у мышей.

(* $p < 0.05$, однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета)

В этот период происходит резкая гибель клеток именно в спинном мозге. Вполне возможно, что индуктором этой гибели является сфингозин. При анализе изменений сфингозина в расчёте на 1 мг фосфора можно отметить небольшое повышение в гиппокампе через 3 месяца и в коре через 4 месяца, однако в мозжечке никаких изменений не наблюдается. Такие изменения в содержании сфингозина были в спинном мозге на терминальной стадии.

Анализ экспрессии генов метаболизма сфингозина, дигидросфингозина (сфинганина) и сфингозин-1-фосфата в спинном мозге мышей при развитии БАС

В связи с тем, что был обнаружен высокий исходный уровень сфингозина (СФЗ), сфинганина и сфингозин-1-фосфата (СФЗ-1-Ф) и изменения в содержании сфингозина и сфинганина только в спинном мозге, была проанализирована экспрессия генов ферментов, участвующих непосредственно в их метаболизме. Была проанализирована экспрессия генов ферментов 3-KSR, церамидазы, сфингозин киназы, сфингозин-1-фосфат фосфатазы и СФЗ-1-Ф-лиазы. 3-KSR превращает 3-кетосфинганин непосредственно в сфинганин. С помощью дигидроцерамидсинтазы сфинганин превращается в дигидроцерамид, который метаболизируется в церамид. Церамид с помощью церамидаз превращается в сфингозин. Обнаружено, что у 4-х месячных мышей уровень мРНК гена 3-KSR имеет тенденцию к повышению по сравнению с контрольными значениями. Далее исследовался уровень экспрессии 4-х генов, кодирующих церамидазу, и было обнаружено, что уровень мРНК кислой церамидазы *Asah1*, локализованной в лизосомах, повышается, тогда как уровень экспрессии нейтральной церамидазы *Asah2*, которая находится на поверхности

плазматической мембраны, достоверно снижается в ходе прогрессии FUS-опосредованной протеинопатии (рис. 19).

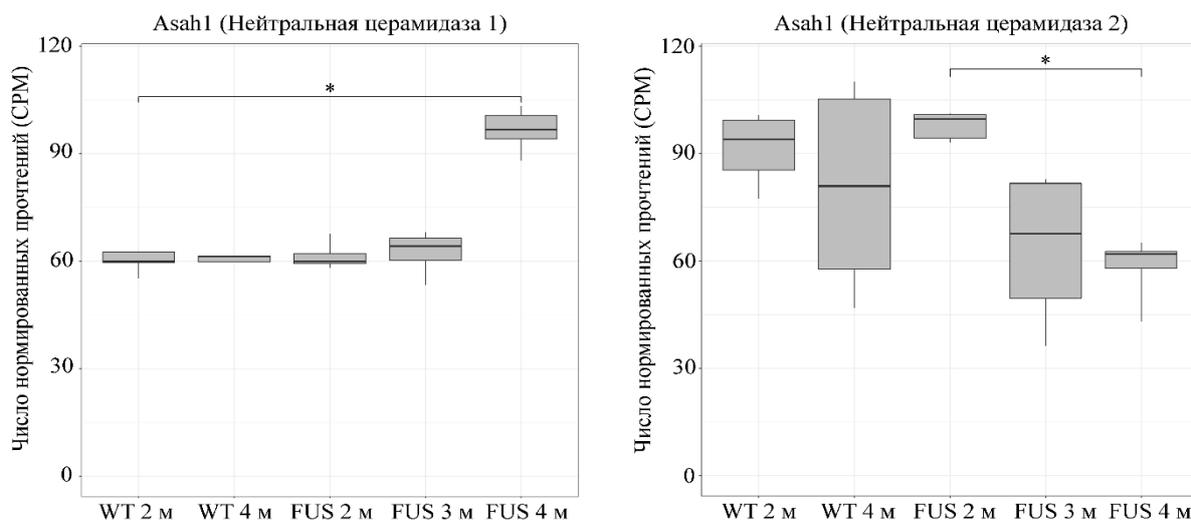


Рисунок 19 – Уровень мРНК нейтральных церамидаз у трансгенных мышей (FUS) и мышей дикого типа (WT) (* $p < 0.05$, тест Фишера)

Следует также отметить, что уровень мРНК щелочных церамидаз (*Acer2* и *Acer3*) остаётся без изменений, а экспрессия *Acer1*, вообще отсутствует в клетках спинного мозга. Анализ изменения экспрессии генов СФЗ-1-Ф-лиазы (*Sgpl*), СФЗ-1-Ф-фосфатазы (*Sgpp*), СФЗ-1-Ф-киназ (*Sphk1* и *Sphk2*) показал, что резко активируется распад СФЗ-1-Ф СФЗ-1-Ф-лиазой до конечных продуктов этаноламинфосфата и гексадеценаля, падает фосфатазная активность и наблюдается тенденция к снижению киназной активности. Эти данные указывают на то, что, несмотря на резкий рост СФЗ и сфинганина, метаболизм СФЗ-1-Ф сдвинут в сторону его деградации. Кроме того, отношение содержания СФЗ-1-Ф к сфингоидным основаниям резко падает, создавая условия для активного апоптоза. Представленные результаты исследований демонстрируют резко выраженную дисрегуляцию в метаболизме сфингоидных оснований, включая сфингозин, сфинганин и сфингозин-1-фосфат преимущественно в спинном мозге мышей, в то время как содержание этих сфинголипидов оказывается на низком уровне и практически не меняется в структурах головного мозга в процессе развития нейропатологии у животных. При этом резко снижается отношение антиапоптотического агента – СФЗ-1-Ф к проапоптотическим СФЗ и сфинганину, что указывает на резкую интенсификацию гибели клеток в структурах спинного мозга. Из 4-х изученных генов, кодирующих церамидазу, повышается уровень мРНК кислой церамидазы *Asah1*, локализованной в лизосомах, тогда как уровень экспрессии нейтральной

церамидазы *Asah2* достоверно снижается в ходе прогрессии FUS-протеинопатии. Таким образом, впервые было продемонстрировано участие сфингоидных оснований в гибели клеток спинного мозга при развитии нейропатологии у трансгенных животных Δ FUS(1-359). Более глубокое понимание биологических путей, регулирующих метаболизм различных сфинголипидов, может привести к идентификации мишеней для лекарственных препаратов. В качестве таких мишеней могут выступить ферменты метаболизма сфингоидных оснований, участвующих в патогенезе, например, ингибиторы кислой церамидазы, ответственной за генерацию сфингозина. Таким образом, подробное изучение изменений в метаболизме сфингоидных оснований позволит более подробно понять его патологические аспекты и создать новые лекарственные средства для лечения данной нейродегенеративной патологии.

2.3 Модель фронтотемпоральной лобарной дегенерации на основе линии с Δ FUS(1-359)

Выделение из оригинальной трансгенной линии Δ FUS(1-359) группы животных с увеличенной продолжительностью жизни

На основе описанной ранее линии Δ FUS(1-359) (далее по тексту обозначенная как tg_hFUS[1-359]) была получена сублиния трансгенных мышей. Полученную сублинию обозначили как L-FUS[1-359] и далее проводили обратное скрещивание этих животных и через семь поколений получили мышей со стабильно увеличенной продолжительностью жизни (рис. 20).

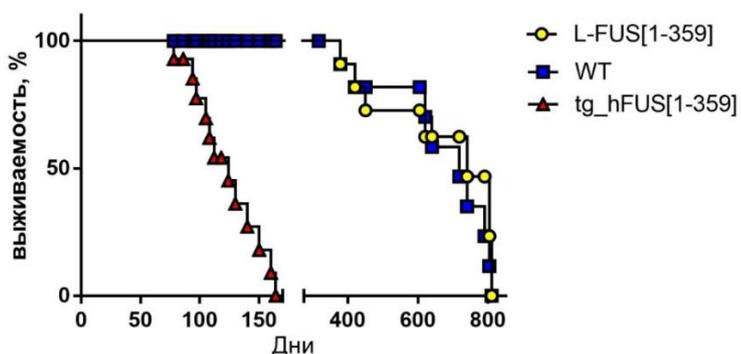


Рисунок 20 – Показатели продолжительности жизни по Каплан-Майер для гемизиготных мышей оригинальной линии tg_hFUS[1-359], гемизиготных мышей полученной сублинии L-FUS[1-359] и животных дикого типа (WT)

Отсутствие двигательных расстройств у L-FUS[1-359] мышей

У мышей L-FUS[1-359] была исследована двигательная функция в батарее физиологических тестов, включающих тесты «перевёрнутая сетка» и «ускоряющийся ротород». Стареющие животные, в геноме которых трансгенная кассета находилась в гомозиготном состоянии ($n = 10$), и контрольные животные дикого типа (WT) ($n = 10$). Животные обеих групп в возрасте 12 месяцев на протяжении 250 секунд тестирования (среднее значение), были способны

удерживаться на «ротароде» в ускоряющемся режиме, причём разницы между показателями в группах L-FUS[1-359] и WT выявлено не было. Также не было разницы в расстоянии, пройденном животными обеих групп за 5 минут в режиме с ускорением. Также не различаются между группами и координация движений, и мышечная сила конечностей, оценённые по способности мышцей удерживаться на «перевернутой сетке»: все животные успешно удерживались в течение всего времени теста (60 секунд). Таким образом, было показано, что даже у стареющих L-FUS[1-359] мышцей двигательная функция не нарушена и у них не проявляются ключевые признаки фенотипа БАС, характерные для оригинальной линии.

Сравнительный анализ уровней экспрессии трансгенной кассеты в спинном мозге L-FUS[1-359] и tg_hFUS[1-359] мышей

В обеих линиях сохранение одинакового числа копий трансгенной кассеты в геноме не означало сохранения одинакового уровня транскрипции трансгена. Проведённый анализ уровня экспрессии мРНК FUS человека в препаратах тотальной РНК из поясничного отдела спинного мозга мышцей обеих линий показал, что произошло значительное снижение уровня транскрипции трансгенной кассеты у L-FUS[1-359] по сравнению с tg_hFUS[1-359] (рис. 21).

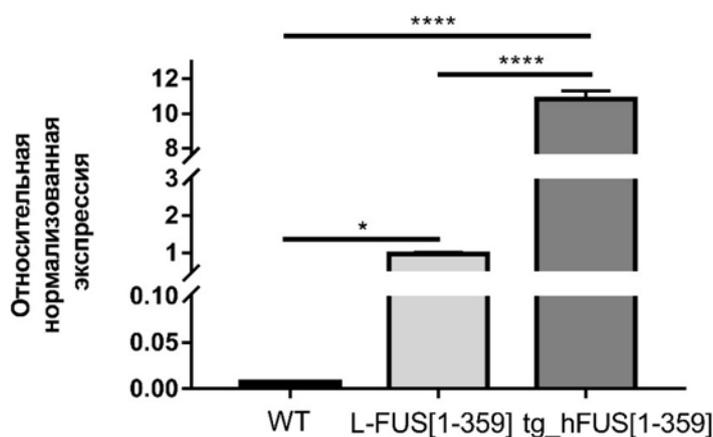


Рисунок 21 – Сравнение уровней экспрессии трансгенной кассеты в поясничном отделе спинного мозга у L-FUS[1-359], tg_hFUS[1-359] и животных дикого типа (WT) (* $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, тест Манна-Уитни)

При этом у L-FUS[1-359] мышцей уровень экспрессии трансгенной кассеты оставался достаточно высоким. Данные этого анализа указывают на то, что снижение уровня экспрессии трансгенной кассеты в тканях спинного мозга L-FUS[1-359] мышцей скорее всего и является причиной потери у них моторного фенотипа.

Анализ экзогенного белка FUS человека в нервных тканях животных линии L-FUS[1-359]

Методом иммуноблоттинга была проведена оценка содержания экзогенного белка FUS человека в препаратах тотального белка из тканей спинного мозга L-FUS[1-359] мышцей по сравнению с мышцами tg_hFUS[1-359] и дикого типа в

возрасте 9 недель. Детекцию aberrантной формы белка FUS человека, размер которой составляет 55 кДа, проводили с использованием высокоспецифичных антител по отношению к белку FUS человека и не реагирующих на полноразмерный эндогенный мышинный белок FUS, размер которого составляет 75 кДа. В результате было установлено, что снижение экспрессии трансгена приводило к существенному снижению уровня синтеза патогенной формы белка FUS человека и уменьшению его содержания в нейронах в спинном мозге. Напротив, измерения синтеза патогенной формы белка в образцах головного мозга у мышей L-FUS[1-359] выявили увеличенное количество по сравнению с животными tg_hFUS[1-359]. Вероятно, что у L-FUS[1-359] животных снижение концентрации экзогенного белка в цитоплазме привело к замедлению скорости прогрессии FUS-протеинопатии и оказалось недостаточным для развития нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах спинного мозга – другими словами, сниженный уровень синтеза aberrантной изоформы белка FUS нивелирует появление клинической картины БАС у L-FUS[1-359] мышей.

Исследование тревожного поведения у L-FUS[1-359] мышей

В результате проведённого сравнительного анализа стареющих гомозиготных по трансгенной кассете самцов линии L-FUS[1-359] и самцов дикого типа (контроль), имеющих общих производителей, в возрасте 5 месяцев были обнаружены различия в показателях когнитивных функций и социального поведения. В тесте «открытое поле» были выявлены изменения показателей тревожного поведения в группе L-FUS[1-359] мышей: расстояние, пройденное в центральной зоне, и общее время, проведённое в центральной зоне, были достоверно снижены, что, возможно, является признаком увеличенного тигмотаксиса и показателем повышенной тревожности. В тесте «приподнятый «О-лабиринт» у трансгенных животных L-FUS[1-359] время латентного выхода в открытый сектор было достоверно меньше, а число выходов в открытый сектор было достоверно больше (рис. 22). Трансгенные животные L-FUS[1-359] имеют достоверно больший показатель проведённого в открытом секторе времени. Из этого следует, что для гомозиготных животных L-FUS[1-359] данные двух тестов коррелируют и показывают сниженную тревожность. Уменьшение показателей латентного времени выхода в светлый сектор и открытый рукав экспериментальных установок у L-FUS[1-359] мышей является показателями увеличенной импульсивности. Сравнение увеличения количества выходов животных L-FUS[1-359] и животных дикого типа в эти зоны установок из тёмных

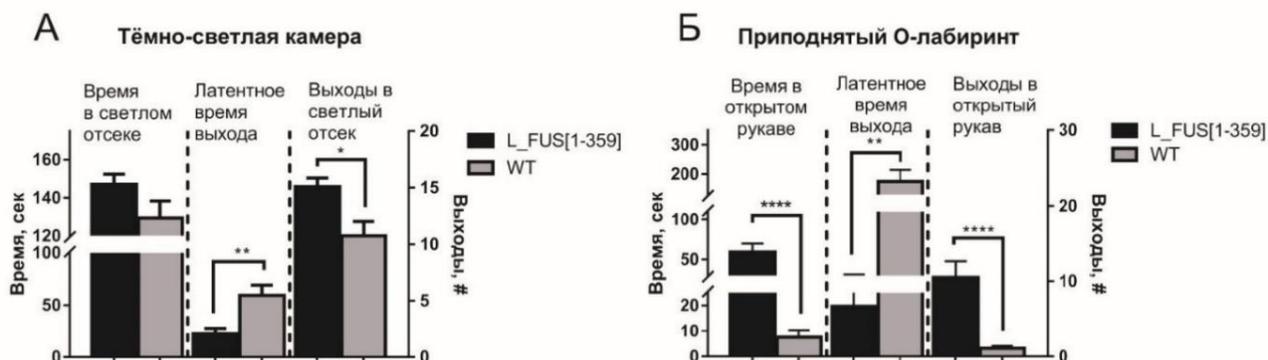


Рисунок 22 – Исследование тревожного поведения L-FUS[1-359] и контролей дикого типа в возрасте 5 месяцев. (А) тест «тёмно-светлая камера». (Б) тест приподнятый «О-лабиринт» ($n = 12$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, тест Манна-Уитни)

и закрытых безопасных зон говорят о снижении показателей тревожности. В совокупности изменения в поведении животных L-FUS[1-359] можно интерпретировать как проявление эмоциональных нарушений, свойственных пациентам с ФТЛД.

3 Гамма-карболины как базисная структура для разработки нейропротекторных соединений с мультитаргетным механизмом действия

Для создания препаратов нового поколения, действующих непосредственно на патогенез заболевания, необходимо учитывать все компоненты каскада патологической агрегации ключевых белков протеинопатии. В настоящее время в стадии разработки находятся препараты, эффективные при протеинопатиях *in vitro* и/или *in vivo*. Здесь прежде всего следует отметить отечественный препарат Димебон, способный влиять на формирование и стабильность белковых агрегатов, а также активировать процессы аутофагии и в исследованиях на животных существенно улучшать их общее состояние. Очевидно, что прогресс, наметившийся в этом направлении, во многом стал возможным благодаря выработке современной концепции патогенеза нейродегенеративных заболеваний, объединённых общим механизмом, в основе которого лежит патологическая агрегация белков.

3.1 Димебон замедляет прогрессию протеинопатии

Исследования действия препарата Димебон проводились на ранее описанной трансгенной модели FUS-протеинопатии Δ FUS(1-359). У животных данной линии в нервной системе экспрессируется укороченная, мутантная форма белка FUS человека, такая форма является наиболее склонной к агрегации. Экспериментальная группа была разделена на две когорты. Первая получала препарат на ранней (предсимптоматической) фазе (на 35-й день после

рождения), другая – на близкой к симптоматической стадии, когда в нервной системе трансгенных мышей уже выявляются FUS-реактивные патогистологические включения (63-й день после рождения) (рис. 23).

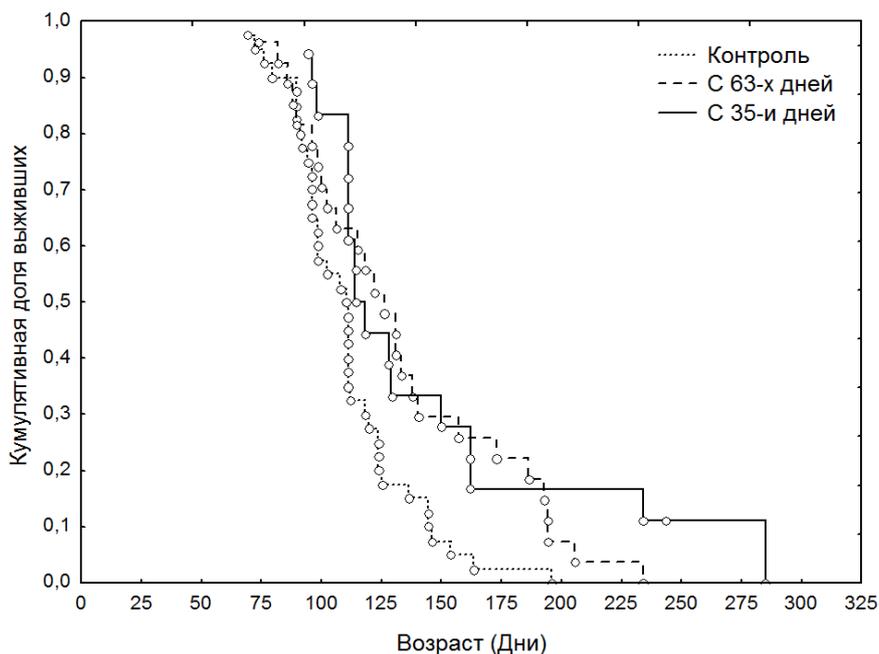


Рисунок 23 – Сравнение кривых выживаемости по Каплану-Мейру между группами модельных животных, получавших Димебон в дозе 11 мг/кг, начиная с возраста 35 дней ($n = 18$) и 63 дней ($n = 27$), и контрольной группой ($n = 40$)

Многочисленное применение Димебона, начатое на ранней предсимптоматической стадии модельной FUS-протеинопатии, обеспечивает увеличение средней продолжительности жизни трансгенных животных.

Другим важным показателем эффективности применения Димебона на животной модели Δ FUS(1-359) является выявленный более поздний дебют манифестации клинических симптомов нейродегенеративного процесса. В группе трансгенных животных, получавших препарат начиная с 63-го дня, средний возраст дебюта модельного заболевания составлял 126 ± 7 дней, что на 22% позже, чем в контрольной группе ($p = 0.023$). При этом наблюдали незначительное, но статистически достоверное снижение скорости прогрессии нейродегенеративного процесса на терминальной стадии модельного заболевания, что выражалось в увеличении продолжительности симптоматической стадии (рис. 24).

3.2 Фторированные гамма-карболины замедляют развитие когнитивных и моторных дисфункций на мышинной модели протеинопатии

Особое внимание уделяется фторзамещённым производным Димебона, в частности, соединениям DF-302 и DF-402, которые характеризуются лучшей

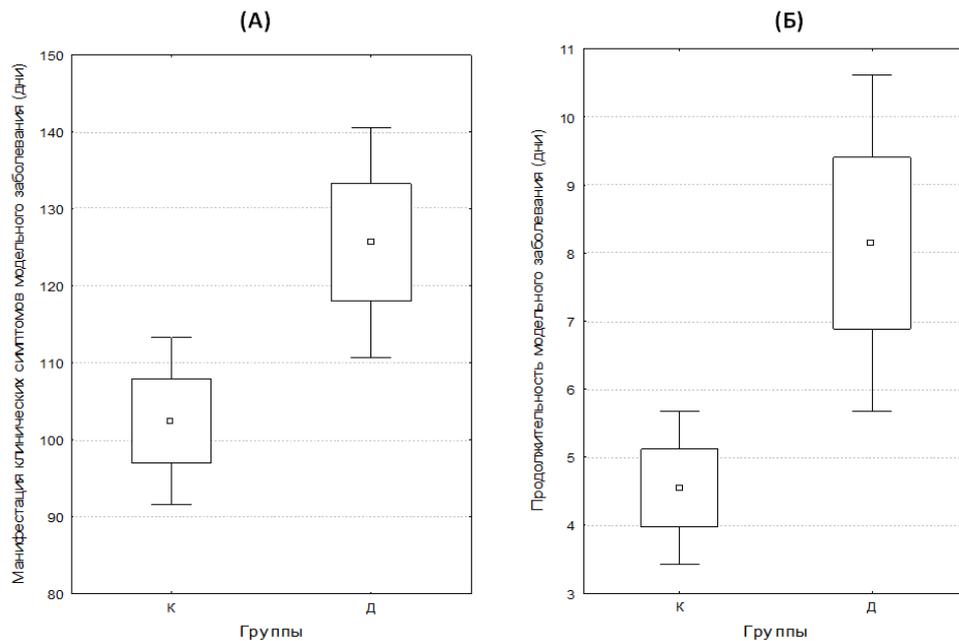


Рисунок 24 – Манифестация клинических симптомов у трансгенных животных. Средний возраст начала (А) и продолжительности (Б) симптоматического периода в группах, получавших препарат с возраста 63-х дней (Д), и контрольной группе (К). Данные представлены как среднее значение среди групп: начиная с возраста 35 дней ($n = 18$) и 63 дней ($n = 27$), и контрольной группой ($n = 40$). Сравнение количественных признаков данных проводилось на основе t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0.05$

фармакокинетикой, чем оригинальный препарат Димебон. Сравнительный анализ базовых физиологических показателей фторированных производных препарата Димебона на трансгенной модели FUS-протеинопатии показал Δ FUS(1-359), что оба производных увеличивают среднюю продолжительность жизни, продолжительность симптоматической фазы, а также средний возраст начала заболевания, тем самым свидетельствуют о наличии у этих препаратов болезнь-модифицирующих свойств (рис. 25). Такие свойства являются ключевыми для успешной разработки потенциальных нейропротекторных препаратов для лечения нейродегенеративных болезней. Более того, сравнительный анализ продолжительности жизни и длительности симптоматической фазы у трансгенных животных FUS-протеинопатии Δ FUS(1-359) при многократным введением препарата Рилузол в сопоставимой терапевтической дозе, который на данный момент используется в клинической практике в качестве средства для лечения бокового амиотрофического склероза, но обладает рядом токсических свойств, показал, что фторированные производные, не имеющие токсических побочных эффектов, в значительной степени сопоставимы по эффективности с выраженным терапевтическим свойствами препарата Рилузол (рис. 26).

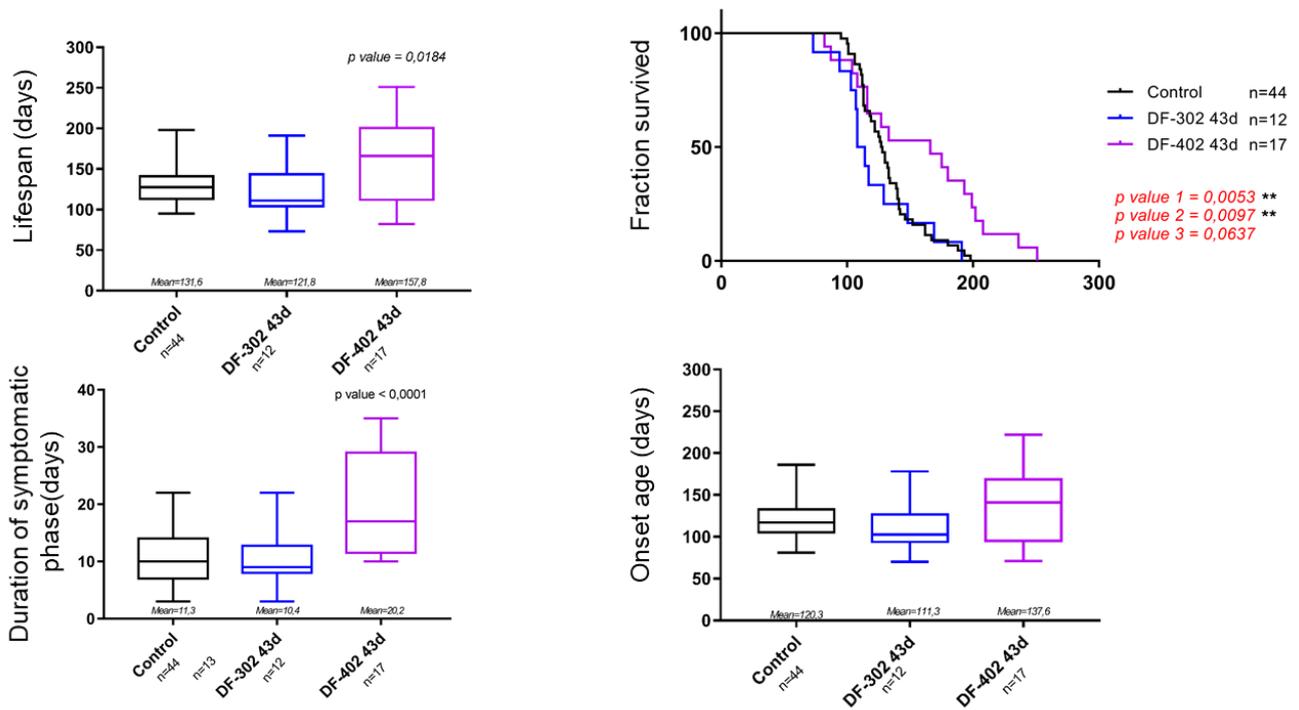


Рисунок 25 – Производные Димебона задерживают проявление симптомов у трансгенных животных с FUS-протеинопатией, продлевают продолжительность симптоматической фазы, а также увеличивают продолжительность жизни

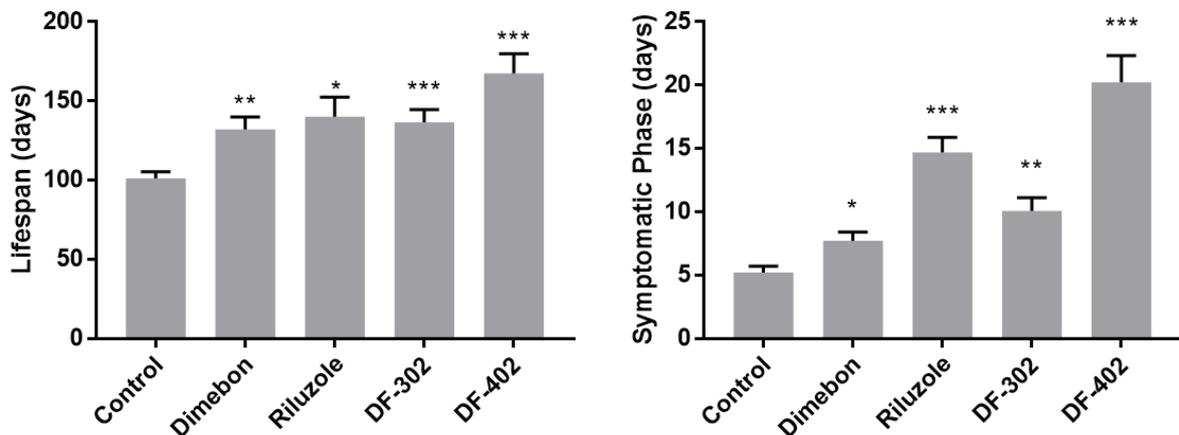


Рисунок 26 – Сравнительный анализ продолжительности жизни и длительности симптоматической фазы трансгенных животных с FUS-протеинопатией при многократном введении препаратов Рилузол и Димебон, а также фторированных производных гамма-карболинов (DF-302 и DF-402) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, тест Манна-Уитни)

Другим доказательством действия фторированных производных на улучшение двигательных функций трансгенных животных с FUS-протеинопатией Δ FUS(1-359) стал анализ походки на установке Noldus Catwalk. Сравнительный статистический анализ 507 экспериментов, в которых было измерено 369 параметров животных при многократном введении препарата DF-402 выявил, что коэффициент корреляции Спирмана (z-score) при многомерном шкалировании смещается в сторону показателей дикотипных животных (рис. 27).

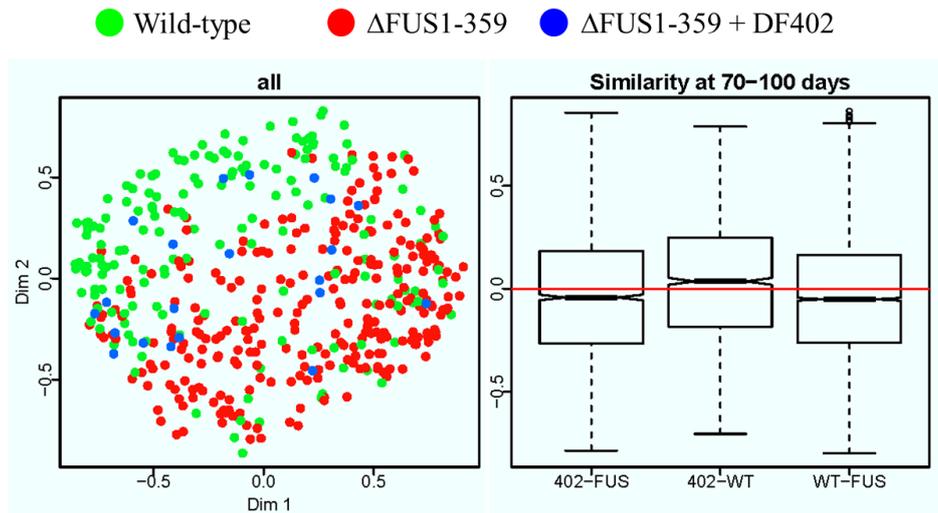


Рисунок 27 – Многомерное шкалирование коэффициентов корреляции параметров походки животных. Многократное введение фторированного производного Димебона DF-402 приводит к сдвигу парных корреляций в сторону группы дикого типа, что свидетельствует о восстановлении общего двигательного поведения трансгенных животных линии $\Delta FUS(1-359)$

Несомненно, исследования интегральных показателей двигательной активности животных не дают количественной оценки, тем не менее качественные показатели свидетельствуют о том, что фторированные производные гамма-карболинов перспективны в качестве потенциальных терапевтических средств не только как стимуляторы когнитивных функций, но и для подавления опорно-двигательных дисфункций при нейродегенеративных заболеваниях, связанных с развитием протеинопатии.

Выводы

1. Идентифицированы и установлены мутации в домене сигнала ядерной локализации и распознавания РНК, которые являются основными патологическими факторами, приводящими к агрегации белков TDP-43 и FUS в трансгенных клеточных и животных моделях нейродегенеративных процессов.
2. Выявлено, что в клеточных и животных моделях протеинопатий цитоплазматические отложения схожи с включениями, обнаруживаемыми в аутопсийном материале больных.
3. Созданные уникальные линии трансгенных мышечных моделей с регулируемой экспрессией эндогенного альфа-синуклеина могут быть использованы не только для изучения нормальной функции альфа-синуклеина, но и для изучения его роли в развитии патологических нейродегенеративных процессов и в качестве адекватных моделей для поиска новых терапевтических средств и оценки их эффективности.

4. Впервые показано, что использование укороченной изоформы белка FUS приводит к появлению локомоторных и когнитивных расстройств, моделирующих различные виды протеинопатий в зависимости от локализации патогенной формы белка в нервной системе.
5. Детальная фенотипическая характеристика с использованием молекулярно-биологических, биохимических, гистологических и поведенческих методов исследований показала, что патологические изменения в нервной системе трансгенных животных глобально изменяют профиль экспрессии генов, приводят к накоплению патологических белковых агрегатов, изменяют метаболические процессы в клетках и являются характерными признаками протеинопатий.
6. Использование модельного препарата Димебон с мультитаргетным механизмом нейротропного действия существенно меняет ход нейродегенеративного заболевания у трансгенных животных.
7. На основе комплексной системы разработанных и валидированных животных моделей протеинопатий, проведена оценка и отбор перспективных структур в ряду оригинальных производных фторсодержащих гамма-карболинов, что позволило выявить соединения-лидеры, стимулирующие когнитивные функции и способных корректировать дисфункции опорно-двигательного аппарата у животных, моделирующих нейродегенеративные заболевания, связанные с развитием протеинопатий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Устюгов А.А.**, Аксиненко А.Ю., Вихарев Ю.Б., Малеев Г.В., Небогатилов В.О., Васильева Н.А., Шевцова Е.Ф., Бачурин С.О. Фторированные γ -карболины – соединения, замедляющие развитие когнитивных и моторных дисфункций в трансгенной модели нейродегенеративных заболеваний // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2020. – №4. – С. 781-786.
2. Ninkina N., Tarasova T.V., Chaprov K.D., Roman A.Y., Kukharsky M.S., Kolik L.G., Ovchinnikov R., **Ustyugov A.A.**, Durnev A.D., Buchman V.L. Alterations in the nigrostriatal system following conditional inactivation of alpha-synuclein in neurons of adult and aging mice // *Neurobiology of Aging*. – 2020. – Vol. 91. – P. 76-87.
3. Lysikova E.A., Funikov S., Rezykh A.P., Chaprov K.D., Kukharsky M.S., **Ustyugov A.A.**, Deykin A.V., Flyamer I.M., Boyle S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. Low Level of Expression of C-Terminally Truncated Human FUS Causes Extensive Changes in the Spinal Cord Transcriptome of Asymptomatic Transgenic Mice // *Neurochemical Research*. – 2020. – Vol 45. – № 5. – P. 1168-1179.

4. Гутнер У.А., Шупик М.А., Малошицкая О.А., Соколов С.А., Резвых А.П., Фуников С.Ю., Лебедев А.Т., **Устюгов А.А.**, Алесенко А.В. Изменение метаболизма сфингоидных оснований в структурах головного и спинного мозга трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих боковой амиотрофический склероз // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 10. – С. 1437-1449.
5. Vorobyov V., Bakharev B., Medvinskaya N., Nesterova I., Samokhin A., Deev A., Tatarnikova O., **Ustyugov A.A.**, Bobkova N. Altered intracerebral interplay and dopaminergic mediation in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: EEG study // Journal of Alzheimer's disease. – 2019. – Vol. 70. – № 1. – P. 241-256.
6. Lysikova E.A., Funikov S., Rezvykh A.P., Chaprov K.D., Kukharsky M.S., **Ustyugov A.A.**, Deykin A.V., Flyamer I.A., Boyle S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. Low level of expression of C-terminally truncated human FUS causes extensive changes in spinal cord transcriptome of asymptomatic transgenic mice // bioRxiv. – 2019. – P. 689414.
7. Hwu J.R., Huang W.C., Lin S.Y., Tan K.T., Hu Y.C., Shieh F.K., Bachurin S.O., **Ustyugov A.**, Tsay S.C. Chikungunya virus inhibition by synthetic Coumarin-Guanosine conjugates // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 15. – № 166. – P. 136-143.
8. Лысикова Е.А., Чапров К.Д., Иванова Т.А., **Устюгов А.А.**, Овчинников Р.К., Кухарский М.С., Коршунов Е.А., Дейкин А.В., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Нарушение когнитивной функции у трансгенных мышей со сниженным уровнем экспрессии патогенной формы белка FUS человека // Патогенез. – 2019. – Т.17. – № 1. – С. 41-49.
9. Aliev G., Ashraf G.M., Tarasov V.V., Chubarev V.N., Leszek J., Gasirowski K., Makhmutova A., Baeesa S.S., Avila-Rodriguez M., **Ustyugov A.A.**, Bachurin S.O. Alzheimer Disease – Future Therapy Based on Dendrimers // Current Neuropharmacology. – 2019. – Vol. 17. – № 3. – P. 288-294.
10. Скворцова В.И., Бачурин С.О., **Устюгов А.А.**, Кухарский М.С., Дейкин А.В., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Перспективы использования гамма-карболинов для разработки патогенетической терапии протеинопатий // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10. – № 39. – С. 54-57.
11. Funikov S.Y., Rezvykh A.P., Mazin P.V., Morozov A.V., Maltsev A.V., Chicheva M.M., Vikhareva E.A., Evgen'ev M.B., **Ustyugov A.A.** FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy // Neurogenetics. – 2018. – Vol. 19. – № 3. – P.189-204.
12. Мальцев А.В., Бородина Ю.В., Скуратовская Л.Н., Кухарский М.С., Овчинников Р.К., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., **Устюгов А.А.** Связь наличия аутоантител к гамма-синуклеину с полиморфизмом в 4-м экзоне кодирующего гена // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118. – №9. – С. 68-70.
13. Kokhan V.S., Kokhan T.G., Samsonova A.N., Fisenko V.P., **Ustyugov A.A.**, Aliev G. The dopaminergic dysfunction and altered working memory performance of aging mice lacking gamma-synuclein gene // CNS Neurological Disorders – Drug Targets. – 2018. – Vol. 17. – № 8. – P. 604-607.
14. **Устюгов А.А.**, Чичёва М.М., Лысикова Е.А., Вихарева Е.А., Сипягина Н.А., Малкова А.Н., Страумал Е.А., Бовина Е.В., Сенатов Ф.С., Салимон А.И.,

- Максимкин А.В., Лермонтов С.А. Сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ) как основа клеточного матрикса для создания 3D клеточной культуры // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2018. – Т. 1. – № 3. – С. e00048.
15. Бачурин С.О., Бовина Е.В., **Устюгов А.А.** Современные тенденции в создании препаратов для лечения болезни Альцгеймера и их клинические испытания // *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. – 2018. – Т. 1. – № 3. – С. e00015.
16. Raevsky O.A., Mukhametov A., Grigorev V.Y., **Ustyugov A.**, Tsay S.C., Hwu R.J.R., Yarla N.S., Barreto G.E., Aliev G., Bachurin S.O. Applications of Multi-Target Computer-Aided Methodologies in Molecular Design of CNS Drugs // *Current Medicinal Chemistry* – 2018. – Т. 25. – № 39. – С. 5239-5314.
17. Makhaeva G.F., Lushchekina S.V., Boltneva N.P., Serebryakova O.G., Rudakova E.V., **Ustyugov A.A.**, Bachurin S.O., Shchepochkin A.V., Chupakhin O.N., Charushin V.N., Richardson R.J. 9-Substituted acridine derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors possessing antioxidant activity for Alzheimer's disease treatment // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 25. – № 21. – P. 5981-5994.
18. Мальцев А.В., Дейкин А.И., Овчинников Р.К., Чичева М.М., Ковражкина Е.А., Разинская О.Д., Броновицкий Е.В., Будевич А.И., Кирикович Ю.К., Бачурин С.О., **Устюгов А.А.**, Скворцова В.И. Отсроченный дебют симптоматической стадии FUS-протеинопатии у трансгенных мышей под действием Димебона // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2017. – Т. 117. – № 4. – С. 64-67.
19. Bachurin S.O., Bovina E.V., **Ustyugov A.A.** Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends // *Medicinal Research Reviews*. – 2017. – Vol. 37. – № 5. – P. 1186-1225.
20. Роман А.Ю., Ковражкина Е.А., Разинская О.Д., Кухарский М.С., Мальцев А.В., Овчинников Р.К., Лыткина О.А., Смирнов А.П., Московцев А.А., Бородина Ю.В., Сургучёв А.П., **Устюгов А.А.**, Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. Выявление аутоантител к потенциально амилоидогенному белку гамма-синуклеину в сыворотке крови больных с боковым амиотрофическим склерозом и нарушениями мозгового кровообращения // *Доклады Академии наук*. – 2017. – Т. 472. – № 5. – С. 600-603.
21. Roman A., Limorenko G., **Ustyugov A.**, Tarasova T., Lysikova E., Buchman V., Ninkina N. Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated *Sncα* gene and *Rosa26-stop-lacZ* reporter located *in cis* on the mouse chromosome 6 // *Transgenic Research*. – 2017. – Vol. 26. – №2. – P. 301-307.
22. Тарасова Т.В., **Устюгов А.А.**, Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена α -синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2016. – Т. 60. – № 3. – С. 4-9.
23. Анохин П.К., Проскурякова Т.В., Шамакина И.Ю., **Устюгов А.А.**, Бачурин С.О. Сравнительный анализ экспрессии мРНК α -синуклеина в мозге крыс с различным уровнем потребления алкоголя // *Нейрохимия*. – 2016. – Т. 33. – № 4. – С. 316-322.

24. **Ustyugov A.A.**, Shevtsova E.F., Barreto G.E., Ashraf G.M., Bachurin S.O., Aliev G. New therapeutic property of Dimebon as a neuroprotective agent // *Current Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 25. – № 39. – P. 5315-5326.
25. Григорьев В.В., Ефимова А.Д., **Устюгов А.А.**, Шевченко В.П., Бачурин С.О., Мясоедов Н.Ф. Изменение процессов выброса и обратного захвата глутамата в условиях новой трансгенной модели бокового амиотрофического склероза на мышцах // *Доклады Академии наук*. – 2016. – Т. 468. – № 1. – С. 100-102.
26. **Устюгов А.А.**, Алиев Г.М. Использование сердечно-сосудистых препаратов и ингибиторов киназы на основе триазола – новый метод лечения болезни Альцгеймера // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2016. – № 4. – С. 1151-1159.
27. Тарасова Т.В., Лыткина О.А., Роман А.Ю., Бачурин С.О., **Устюгов А.А.** Роль α -синуклеина в развитии дофаминергических нейронов черной субстанции и области вентральной покрышки среднего мозга // *Доклады Академии наук*. – 2016. – Т. 466. – № 5. – С. 620-623.
28. Ninkina N., Connor-Robson N., **Ustyugov A.A.**, Tarasova T.V., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L. A novel resource for studying function and dysfunction of α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 13. – № 5. – P. 16615.
29. Abramychева N.Y., Lysogorskaia E.V., Stepanova M.S., Zakharova M.N., Kovrazhkina E.A., Razinskaya O.D., Smirnov A.P., Maltsev A.V., **Ustyugov A.A.**, Kukharsky M.S., Khritankova I.V., Bachurin S.O., Cooper-Knock J., Buchman V.L., Illarioshkin S.N., Skvortsova V.I., Ninkina N. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in ALS patients from the Central European Russia population // *Neurobiology of Aging*. – 2015. – Vol. 36. – № 10. – P. 2908.e5-2908.e9.
30. Bobkova N.V., Lyabin D.N., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N., Nekrasov P.V., Nesterova I.V., Aleksandrova I.Y., Tatarnikova O.G., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Kukharsky M.S., **Ustyugov A.A.**, Polyakov D.N., Eliseeva I.A., KretoV D.A., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P. The Y-Box Binding Protein 1 Suppresses Alzheimer's Disease Progression in Two Animal Models // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 9. – P. e0138867.
31. Брoновицкий Е.В., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Фёдоров Е.Н., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Овчинников Р.К., Роман А.Ю., Хританкова И.В., Кухарский М.С., Бухман В.Л., Бачурин С.О., **Устюгов А.А.** Подавление гамма-карболином нейродегенеративного процесса в трансгенной модели бокового амиотрофического склероза // *Доклады академии наук*. – 2015. – Т. 462. – № 5. – С. 609-612.
32. **Ustyugov A.**, Shevtsova E., Bachurin S. Novel Sites of Neuroprotective Action of Dimebon (Latrepirdine) // *Molecular Neurobiology*. – 2015. – Vol. 52. – № 2. – P. 970-978.
33. Robinson H.K., Deykin A.V., Bronovitsky E.V., Ovchinnikov R.K., **Ustyugov A.A.**, Shelkovnikova T.A., Kukharsky M.S., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Bachurin S.O., Buchman V.L., Ninkina N.N. Early lethality and neuronal proteinopathy in mice expressing cytoplasm-targeted FUS that lacks the RNA recognition motif // *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* – 2015. – Vol. 16. – № 5-6. – P. 402-409.

34. Шелковникова Т.А., **Устюгов А.А.**, Кохан В.С., Тарасова Т.В., Медведева В.К., Хританкова И.В., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. (2014). Исследование молекулярных мишеней нейропротекторного препарата Димебон с использованием линии трансгенных мышей // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60. – № 3. – С. 354-363.
35. Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Брновицкий Е.В., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Попов А.Н., Фёдоров Е.Н., Лыткина О.А., Кухарский М.С., Тарасова Т.В., Шелковникова Т.А., **Устюгов А.А.**, Нинкина Н.Н., Гольдман И.Л., Садчиков Е.Р., Бачурин С.О., Скворцова В.И. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – № 8. – С. 63-70.
36. Лыткина О.А., Тарасова Т.В., Хританкова И.В., Анохин П.К., Кухарский М.С., **Устюгов А.А.**, Бачурин С.О. Исследование эффекта повышенного образования гамма-синуклеина на дегенерацию синапсов, вызванную нарушением функции белка CSP-alpha // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 6. – Ч. 6 – С. 1214-1218.
37. Лыткина О.А., Тарасова Т.В., Хританкова И.В., Анохин П.К., Кухарский М.С., **Устюгов А.А.**, Бачурин С.О. Связывание гамма-синуклеина с синаптическими везикулами происходит без взаимодействия с белками SNARE-комплекс // Доклады Академии наук. – 2014. – Т. 456. – № 5. – С. 610-612.
38. Shelkovnikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V., Connor-Robson N., Robinson H., **Ustyugov A.A.**, Bachurin S.O., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Skvortsova V.I., Ling S.C., Da Cruz S., Parone P.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288. – № 35. – P. 25266-25274.
39. Кухарский М.С., Хританкова И.В., Лыткина О.А., Овчинников Р.К., **Устюгов А.А.**, Шелковникова Т.А., Брновицкий Е.В., Кохан В.С., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Разработка клеточной модели TDP43-протеинопатии для поиска подходов к патогенетической терапии фронтотемпоральной лобарной дегенерации // Патогенез. – 2013. – Т. 11. – № 1. – С. 54-60.
40. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., **Ustyugov A.A.**, Peters O., Khritankova I.V., Afanasieva M.A., Tarasova T.V., Alentov I.I., Buchman V.L., Ninkina N.N. 2012. Dimebon slows progression of proteinopathy in γ -synuclein transgenic mice // Neurotoxicity Research. – 2012. – Vol. 22. – № 1. – P. 33-42.
41. **Устюгов А.А.**, Шелковникова Т.А., Кохан В.С., Хританкова И.В., Петерс О., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. «Димебон» снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в детергент-нерастворимых фракциях *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152. – № 12 – С. 675-678.
42. Кохан В.С., Болкунов А.В., **Устюгов А.А.**, Ванькин Г.И., Шелковникова Т.А., Стрекалова Т.В., Редкозубова О.М., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О.

Направленная инактивация гена, кодирующего гамма-синуклеин, влияет на уровень тревожности и исследовательской активности мышей // Журнал высшей нервной деятельности. – 2011. – Т. 61. – № 1. – С. 85-93.

43. Shelkovanikova T.A., **Ustyugov A.A.**, Millership S., Peters O., Anichtchik O., Spillantini M.G., Buchman V.L., Bachurin S.O., Ninkina N.N. Dimebon does not ameliorate pathological changes caused by expression of truncated (1-120) human alpha-synuclein in dopaminergic neurons of transgenic mice // *Neurodegenerative Diseases*. – 2011. – Vol. 8. – № 6. – P. 430-437.
44. Шелковникова Т.А., **Устюгов А.А.**, Смирнов А.П., Скворцова В.И., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Мутации в гене *Fus*, ассоциированные с наследственными формами бокового амиотрофического склероза, влияют на клеточную локализацию кодируемого белка и его способность к агрегации // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 438. – № 3. – С. 422-426.
45. **Устюгов А.А.**, Нинкина Н.Н. Разработка генетической модели прогрессирующей протеинопатии в трансгенных мышях с целью создания нового поколения нейропротекторных препаратов, действующих на патогенез нейродегенеративных заболеваний // Технологии живых систем. – 2011. – Т. 8. – С. 23-31.
46. Скворцова В.И., Бачурин С.О., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., Почигаева К.И., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А., **Устюгов А.А.** Новые аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С. Корсакова. – 2011. – Т. 111. – № 2. – С. 4-9.

Ноу-хау

Методика отбора нейропротекторных препаратов, селективно действующих на системы клеточной защиты от патогенных белковых агрегатов, с использованием генетически-модифицированных животных. Авторы ноу-хау: Нинкина НН, Бачурин СО, **Устюгов АА**, Шелковникова ТА, Кохан ВС, Хританкова ИВ, Кухарский МС, Лыктина ОА от 28.11.2012 ФГБУН ИФАВ РАН.

Патент

Хлоргидраты фторсодержащих замещенных 5-[2-(пирид-3-ил)-этил]-2,3,4,5-тетрагидро-1H-пиридо[4,3-b]индолов, в качестве средств снижения неконтролируемой агрегации белков в нервной системе, фармакологическое средство на их основе и способ его применения. Авторы патента: Бачурин СО, **Устюгов АА**, Нинкина НН, Соколов ВБ, Аксиненко АЮ, Шелковникова ТА, Болкунов АВ. Патент РФ: №2490268 от 10.11.2011. WIPO (PCT): WO2009038764A1.

Список сокращений

FUS – РНК-связывающий белок FUS (англ. FUsed in Sarcoma)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

GFP – зелёный флуоресцентный белок

NeuN – нейрональный ядерный антиген (Hexaribonucleotide Binding Protein-3)

NMDA – N-метил-D-аспартат

SNCA – альфа-синуклеин

TDP-43 – TAR DNA-binding protein

TIAR – TIA-1 related protein

WT – дикий тип (wild type)

БА – болезнь Альцгеймера

БАС – боковой амиотрофический склероз

БП – болезнь Паркинсона

ВОП – вентральной области покрышки

ГАФДГ – глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа

ДА – дофамин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДа – килодальтон

НДЗ – нейродегенеративные заболевания

ПФА – параформальдегид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СОД-1 – супероксиддисмутаза-1

ТГ (ТН) – тирозингидроксилаза

ФТЛД – фронтотемпоральная лобарная дегенерация

ЦНС – центральная нервная система

ЧС – черная субстанция

Search strategy for drugs to treat neurodegenerative diseases based on transgenic cell and animal proteinopathy models

The aim of the study was to develop transgenic cellular and animal models of neurodegenerative processes for studying key molecular mechanisms of neurodegenerative disease as well as for using these models in testing of potential therapeutic agents. As a result, cellular models of proteinopathies were developed based on the overexpression of modified aggregation-prone proteins TDP-43 and FUS. Pathogenic aggregation of mislocalized proteins led to formation of cytoplasmic inclusions and subsequent cell death. Several animal models of proteinopathies included alpha-synuclein conditional knock-outs as well as two models based on the expression of mutant and truncated isoform of FUS protein. In the alpha-synuclein knock-out models upon tamoxifen treatments there was a complete loss of alpha-synuclein in dopaminergic neurons detected while the overall cell density was unaffected. In transgenic FUS models of proteinopathies there was a significant loss of lifespan, propagation of motor deficits and cognitive function decline which are associated with neurodegenerative diseases. Both transgenic cellular and animal models were used to test the effects of gamma-carboline derivatives which represent as promising agents with disease-modifying and neuroprotective properties. Overall, currently developed models could be used to study neurodegenerative molecular mechanisms on different levels as well as could be used as means for testing innovative compounds targeting pathological events in proteinopathies.