

На правах рукописи

Тарасова Татьяна Владимировна

Роль альфа-синуклеина в формировании популяций дофаминергических
нейронов ядер среднего мозга, дифференциально поражаемых при болезни
Паркинсона

(экспериментальное исследование)

14.03.03 – патологическая физиология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва 2016

ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Российский Научно-исследовательский университет им Н.И.Пирогова и ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН
Скворцова Вероника Игоревна

Доктор медицинских наук
Нинкина Наталья Николаевна

Официальные оппоненты:

1. Воронова Татьяна Александровна

д.м.н, профессор, заслуженный деятель науки, зав. лабораторией психофармакологии ФБГУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова

2. Гайнетдинов Рауль Радикович

к.м.н, профессор, Директор Института трансляционной медицины, Санкт-Петербургский государственный университет.

Ведущая организация: Федеральное Государственное Автономное Образовательное Учреждение Высшего Образования "Российский университет дружбы народов".

Защита состоится « » 2016 года в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская,8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИ ОПП»
Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИ ОПП» www.niiopp.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Скуратовская Л.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Болезнь Паркинсона (БП) - второе по распространенности после болезни Альцгеймера нейродегенеративное заболевание, частота встречаемости которого в развитых странах составляет 0,5 - 1 % в возрастной группе от 60 до 65 лет и от 2 до 4% - в возрастной группе старше 80 лет. Основной патогенетической составляющей БП является потеря функции и гибель дофаминергических нейронов (ДА) черной субстанции (ЧС). Молекулярные механизмы специфичности поражения определенных популяций нейронов нигростриарной системы остаются неизвестными, что затрудняет разработку патогенетической терапии, поэтому их изучение является актуальной задачей биомедицинской науки. После того, как было установлено, что основным компонентом патогистологических включений, выявляемых в аутопсийном материале больных с БП – телец Леви, является агрегированный белок α -синуклеин, исключительную актуальность приобрели исследования роли этого белка в инициации и прогрессии патологических каскадов, заканчивающихся гибелью ДА нейронов. Мало изученной остается роль α -синуклеина в формировании различных популяций ДА нейронов на ранних этапах развития нервной системы. Исследования в данном направлении затруднены из-за отсутствия адекватных животных моделей нарушения функции этого белка, поэтому их создание рассматривается в настоящее время, как одна из важных задач в изучении молекулярных основ патогенеза БП, и разработка в рамках данного диссертационного исследования новых линий генетически-модифицированных мышей делает его еще более актуальным.

Цель и основные задачи исследования. Основной целью работы являлось выявление роли α -синуклеина в формировании различных популяций ДА нейронов на примере двух анатомических структур, дифференциально поражающихся при БП. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать эффект α -синуклеина на формирование популяций ДА нейронов в ЧС и вентральной области покрышки (ВОП) головного мозга

мышей с конститутивной инактивацией гена а-синуклеина для выявления возможной роли кодируемого им белка в патогенетических механизмах БП.

2.Получить новую независимую модель конститутивного нокаута гена а-синуклеина с минимальными модификациями генома.

3.Провести сравнительное морфометрическое исследование популяций ДА нейронов в ЧС и ВОП на двух независимых линиях мышей с конститутивной инактивацией гена а-синуклеина.

4.Исследовать уровень экспрессии гена мультимерина-1 (Mmnr-1), регуляторные элементы которого расположены в локусе, затронутом генетической модификацией, использованной для конститутивной инактивации гена а-синуклеина.

Научная новизна исследования. Многолетние исследования патофизиологических аспектов БП показали, что основной анатомической структурой, подвергающейся нейродегенерации при БП, является ЧС, где у больных отмечается массивная потеря ДА нейронов, приводящая к патологии всей нигростриарной системы. В другой анатомической структуре среднего мозга, содержащей ДА нейроны - ВОП, дегенеративные процессы при БП выражены в гораздо меньшей степени. Механизм дифференциального поражения популяций ДА нейронов при БП остается неизвестным. В данном диссертационном исследовании был использован новый подход для выявления роли а-синуклеина в процессах дифференциальной гибели ДА нейронов в ЧС и ВОП: использование линий генетически модифицированных мышей с конститутивной инактивацией гена а-синуклеина. Результатом такого исследования явились впервые полученные данные о различном участии а-синуклеина в процессах раннего формирования популяций ДА нейронов ЧС и ВОП. С целью характеристики трансгенных животных моделей, ранее применявшихся для изучения патогенеза БП, впервые был проведен анализ экспрессии гена Mmnr-1, регуляторные элементы которого оказались затронутыми генетическими модификациями локуса а-синуклеина. Результаты, выявившие существенное повышение уровня его экспрессии в

нервной системе, послужили научным обоснованием необходимости создания новой линии мышей с минимальными модификациями локуса а-синуклеина, обеспечивающими конститутивную инактивацию этого гена и не изменяющими активность экспрессии гена Mmnr-1. Такая линия мышей была получена в рамках данной диссертационной работы. Использование созданной линии позволило провести первое репрезентативное сравнительное морфометрическое исследование формирования популяций ДА нейронов в ЧС и ВОП на двух независимых модельных животных системах. Определение роли а-синуклеина в развитии популяций ДА нейронов, дифференциально поражающихся у больных с БП, позволило существенно расширить наши знания о его участии в патогенетических механизмах заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследованию выраженных патологических изменений, характерных для развитых стадий БП, посвящено гораздо больше работ, чем изучению досимптоматических стадий заболевания, что объясняется крайней ограниченностью адекватных моделей, созданию которых в последнее время придается большое значение. Поэтому созданная в ходе диссертационной работы новая линия мышей с конститутивным нокаутом а-синуклеина, выполненная с минимальными на сегодняшний день модификациями генома, представляет особый научно-практический интерес. Линия может быть использована для изучения механизмов специфического нейродегенеративного процесса при нарушении функции а-синуклеина и выявления потенциальных молекулярных мишеней для разработки патогенетической терапии БП и других а-синуклеинопатий. Благодаря использованию в диссертационном исследовании комбинации оригинальных животных моделей, воспроизводящих ранние события, обусловленные нарушением функции а-синуклеина, удалось получить экспериментальные доказательства различной роли этого белка в формировании популяций ДА нейронов, дифференциально поражаемых при БП, что позволяет рассматривать а-синуклеин в качестве мишени для разработки методов ранней патогенетической терапии БП.

Положения, выносимые на защиту.

1. Показана модулирующая роль а-синуклеина в формировании популяций ДА нейронов ЧС у генетически модифицированных мышей.
2. Нарушение функции а-синуклеина не влияет на процессы формирования популяции ДА нейронов ВОП - анатомической структуры среднего мозга, в гораздо меньшей степени, чем ЧС, поражаемой при БП.
3. Создана новая линия мышей с конститутивным нокаутом а-синуклеина, имеющая минимальные модификации в локусе этого гена, и позволяющая изучать молекулярные механизмы патогенеза БП.
4. Показано, что генетическая инактивация а-синуклеина у мышей ведет к статистически значимой потере части популяции ДА нейронов ЧС с последующей компенсацией у взрослых животных.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на: VII Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2012), III Европейской конференции по медицинским и биологическим наукам (Вена, Австрия, 2014), II Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной медицины» (Екатеринбург 2015), X Юбилейной Международной научно-практической конференции молодых учёных-медиков (Курск, 2016), Всероссийской конференции молодых учёных, с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2016).

Публикации и личный вклад автора. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 6 статей (из них 4 в списке ВАК) и 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций. Личное участие автора состоит в выработке научного плана исследований и выполнении экспериментальных работ, вошедших в совместные публикации. Все основные экспериментальные данные диссертационного исследования получены автором лично.

Структура и объём работы. Диссертация содержит: введение, обзор

литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы и библиографический указатель печатных работ на русском (14) и иностранных языках (163). Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 31 рисунок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе использованы линии инбредных мышей с делецией гена α -синуклеина: [Ab- α _synKO] из лаборатории A. Rosenthal (США); [T_ α -synKO] из лаборатории T.Südhof (США); [abg_KO] безсинуклеиновые мыши (ЦКП, Черноголовка); [SNCA^{flox/flox}_neo^{FRT/+}], в геноме которых второй экзон гена α -синуклеина с сохраненным бактериальным геном устойчивости к антибиотику неомицину фланкирован loxP-сайтами, из лаборатории V.L.Buchman (Великобритания); вспомогательные линии мышей для осуществления гомологической рекомбинации из The Jackson Laboratory: [CMV/Cre-rec] и [Actin/FLP-rec]. Все линии - на генетический фон C57BL/6J.

Генотипирование проводили с помощью анализа ДНК, выделенной из биопсий уха, в реакциях либо конвекционной ПЦР с последующим разделением фрагментов в 1% агарозном геле, либо ПЦР в реальном времени на установке StepOne Real-Time (Applied Biosystems) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix. В качестве внутреннего контроля измеряли уровень экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Патогистологический анализ. Для приготовления препаратов проводили фиксацию полных эмбрионов или мозга мышей в раннем постнатальном периоде в холодном 4%-ном параформальдегиде, а взрослых животных - в растворе Карнуа. Дегидратировали ткани в батарее спиртов увеличивающейся концентрации и заключали в парафиновые блоки. Серийные срезы толщиной 8 мкм готовили на ротационном микротоме. После депарафинизации препаратов в ксилоле и регидратации их в серии растворов этанола понижающейся концентрации инактивировали эндогенную пероксидазную

активность инкубацией в 3% растворе перекиси водорода в метаноле. Для иммуногистохимического окрашивания ДА нейронов использовали моноклональные антитела против тиразингидроксилазы (ТГ). В качестве вторичных антител - биотинилированные против иммуноглобулинов мыши. Монтировали покровные стекла и проводили микроскопию и фотографирование камерой Leica DFS 490 с программным обеспечением Leica Application Suit v. 2.8.1. Для морфометрического анализа ДА нейронов использовали стереологический подход, определяя содержание ТГ-позитивных нейронов во всей исследуемой анатомической структуре, локализацию которой проводили по атласу [Fraklin K.B.J. et al., 2007]. Для подсчета каждый пятый срез располагали на предметном стекле, всего 10 срезов толщиной 8 микрон на препарат. Для введения коррекционной поправки Абекромби измеряли диаметр 30 нейронов, располагавшихся в каждой из исследуемых областей. Подсчитывали общее число нейронов для ВОП и отдельно значения для правой и левой частей ЧС.

Исследование пролиферативной активности проводили путем подсчета ядер клеток, положительно окрашиваемых антителами против инкорпорированного 5-бром-2'-дезоксимуридина (BrdU), через 24 часа после введения животным раствора BrdU из расчета 150 мкг на 1 г веса.

Анализ уровня экспрессии РНК. Тотальную РНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus (Qiagen), дополненный колонками для очистки от примесей геномной ДНК. Синтезировали комплементарную цепь в реакции обратной транскрипции и полученную кДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР в реальном времени.

Белковый анализ проводили методом иммуноблотинга после разделения в денатурирующем полиакриламидном гель-электрофорезе по Лэммли с последующим переносом на Hybond-P мембрану (Amersham) и инкубацией с соответствующими первичными антителами. Использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, для хемилюминесцентной детекции которых применяли реагенты ECL Plus (Amersham) с последующей

регистрацией сигнала на рентгеновскую пленку.

Антитела моноклональные мыши: против а-синуклеина клон #42 (BD Biosciences (Transduction Laboratories); против ТГ, клон #ТН-2 (Sigma-Aldrich); против бета актина клон #AC – 15 (Sigma – Aldrich); против инкорпорированного BrdU клон #B-44 (BD Biosciences).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) и GraphPad Prism 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушению функции а-синуклеина отводится важная роль в патогенезе наследственных и идиопатических форм БП [Spillantini M.G. et al., 1997]. Патологическая агрегация этого белка в цитоплазме нейронов ЧС приводит к прогрессирующему с возрастом нарушению его транспорта в пресинаптические терминалии, где в норме локализована большая часть а-синуклеина клетки и где он выполняет важную функцию регулятора нейротрансмиссии [Burre J. et al., 2010]. Дефицит функционально активного а-синуклеина и нарушение его функции в процессах нейротрансмиссии может вносить значимый вклад в развитие нейродегенеративного процесса. Косвенным подтверждением такого механизма являются данные, указывающие на то, что недостаточность а-синуклеина у пациентов с развивающейся БП становится фактором, способствующим гибели ДА нейронов ЧС, именно в процессе старения. При этом непосредственная роль а-синуклеина в развитии ДА нейронов остается мало изученной и совсем мало известно об отдаленных последствиях нарушения функции этого белка.

Для изучения влияния нарушения функции а-синуклеина на процесс формирования ДА нейронов в данном исследовании были выбраны модельные системы генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена а-синуклеина. В первой серии экспериментов был проведен сравнительный морфометрический анализ ДА нейронов в ЧС и ВОП головного мозга мышей нокаутной линии Ab-a_{syn}KO.

Стереологический подсчет общего числа положительно окрашиваемых антителами против ТГ клеток выполняли на серии гистологических срезов, покрывающих всю исследуемую анатомическую структуру. Были проанализированы области формирования ЧС и ВОП эмбрионального мозга мыши с 11,5 по 13,5 дни развития (Рис.1), поскольку именно в этот период наблюдается активная миграция постмитотических клеток-предшественников из вентрикулярной зоны на границе среднего и переднего мозга в область ЧС и ВОП, где происходит их дальнейшая терминальная дифференцировка в зрелые нейроны. И именно в этот период обнаружено экспоненциальное нарастание синтеза α -синуклеина в ядрах среднего мозга.

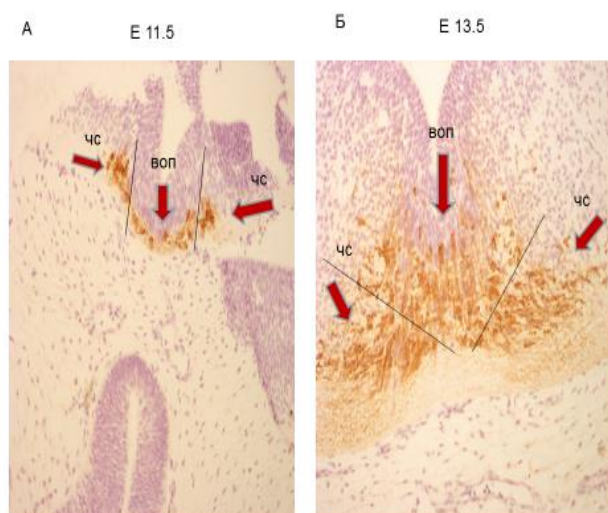


Рисунок 1.

Иммуногистохимическая детекция дофаминергических нейронов на срезах эмбрионального мозга мыши (11,5(А) и 13,5(Б) дни развития) антителами против тирозингидроксилазы. Стрелками обозначены области, в которых производили стереологический подсчет клеток. Увеличение $\times 10$.

Анализ ТГ-положительных клеток показал, что в области, соответствующей развивающейся ЧС, динамика формирования популяции ДА нейронов в отсутствие α -синуклеина отличается от наблюдаемой у контрольных мышей. У нокаутных животных выявлено увеличение в 2,7 раза ($p < 0.001$) количества нейронов, синтезирующих дофамин, с последующим уменьшением их пула к 13.5 дню эмбриогенеза с разницей в 38% ($p < 0.001$) (Рис. 2А). Принципиально отличная картина была выявлена при анализе ВОП, где не удалось обнаружить статистически значимых различий в количестве ТГ-положительных клеток при конститутивной инактивации α -синуклеина (Рис. 2Б).

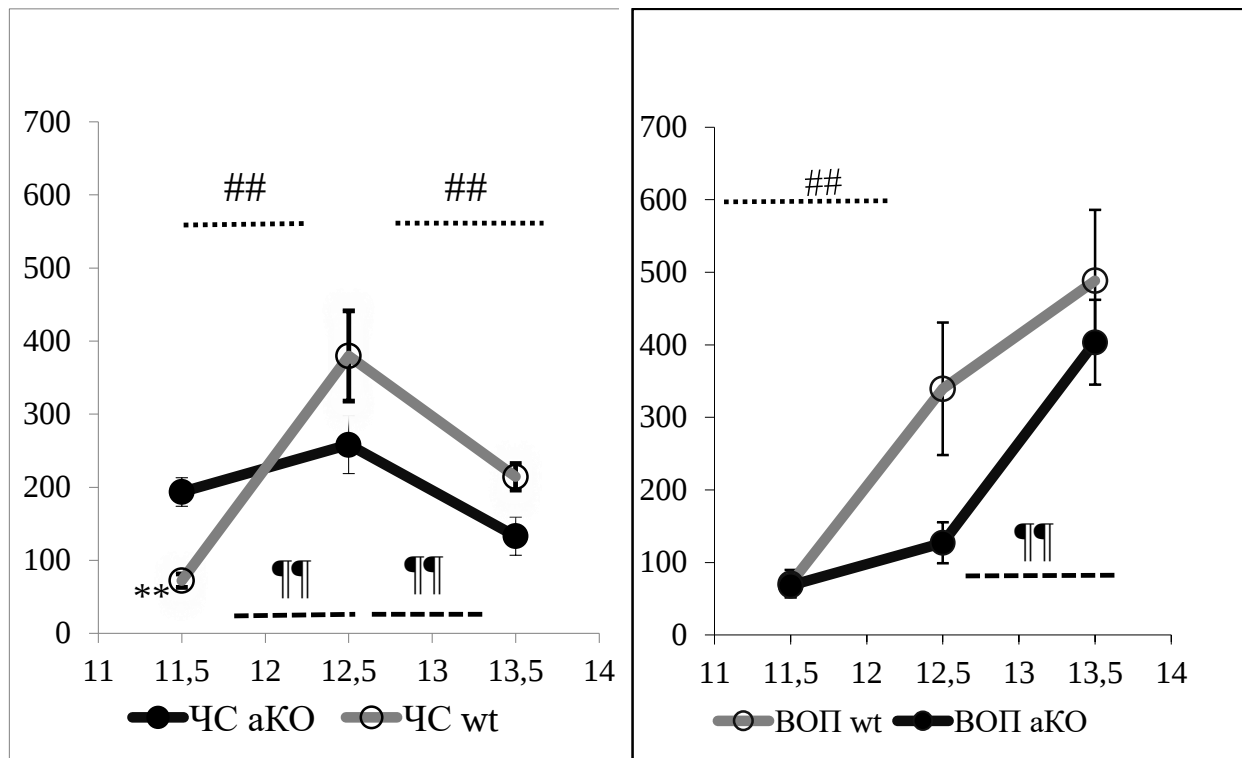


Рисунок 2 - Сравнительный морфометрический анализ ТГ-положительных клеток в областях формирования чёрной субстанции (А) и ВОП (Б) эмбрионального мозга а-синуклеин нокаутных [Ab-a_synKO] и контрольных (wt) мышей на 11.5, 12.5 и 13.5 дни развития. $M \pm m$, $n = 5$ для каждой группы, **,##,¶¶ – $p < 0.01$ по критерию U Вилкоксона–Манна–Уитни.

Полученные на линии [Ab-a_synKO] экспериментальные данные показали, что функциональный дефицит а-синуклеина в эмбриогенезе оказывает наиболее выраженный эффект на ДА нейроны ЧС и в гораздо меньшей степени на ДА нейроны ВОП. Именно в ЧС выявляются наиболее существенные дегенеративные изменения у больных с БП, и в гораздо меньшей степени дегенеративные процессы затрагивают ВОП. Таким образом, наши данные служат прямым указанием на важную роль а-синуклеина в эмбриогенезе nigrostriatalной системы, и поддерживают сформулированную гипотезу, что нарушения нормальной функции этого белка в период формирования nigrostriatalной системы могут являться причиной развития функциональной

недостаточности и сниженных компенсаторных механизмов в ДА нейронах ЧС стареющего мозга.

Чтобы определить, является ли выявленная нами разница в динамике эмбрионального формирования популяций ДА нейронов в отсутствие а-синуклеина результатом изменения пролиферативной активности предшественников этих нейронов, был проведен анализ интенсивности нейрогенеза в ЧС и ВОП. Делящиеся клетки метили введением BrDU беременным самкам и анализировали их число в области развивающихся структур ЧС и ВОП на стадии 11,5; 12,5 и 13,5 дней эмбриогенеза методом иммуногистохимического окрашивания антителами против инкорпорированного BrDU (Рис. 3).

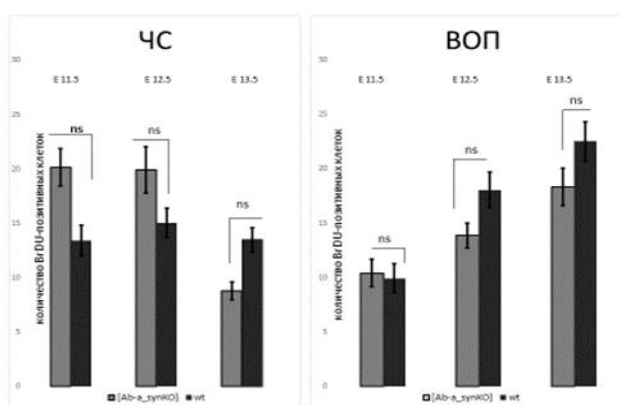


Рисунок 3.

Анализ пролиферативной активности в областях ЧС и ВОП эмбрионального мозга мышей на 11,5; 12,5 и 13,5 дни развития у контрольных (wt) и нокаутных (Ab-a_synKO) животных, n=5.

И хотя на стадии завершения формирования популяции ДА нейронов в ЧС у нокаутных животных была выявлена тенденция к снижению пролиферативной активности, достоверных различий в числе пролиферативно активных клеток не удалось получить даже при значительном увеличении числа анализируемых животных.

Таким образом, выявленные нами различия в динамике эмбрионального формирования популяций ДА нейронов в ЧС и ВОП, скорее всего нельзя объяснить различием в пролиферативной активности этих зон. Возможно, созревание и миграция в область ЧС предшественников ДА нейронов

замедлено при отсутствии а-синуклеина. Интенсивность онтогенетического отбора так же может быть снижена. Оба этих фактора способны вносить определенный вклад в процессы формирования популяции ДА нейронов в ЧС, которая не только обеднена, но качественно должна отличаться от таковой у животных дикого типа.

Поскольку активный синаптогенез продолжается и в раннем постнатальном развитии, были исследованы ДА нейроны у мышей на седьмой день после рождения (Рис. 4).

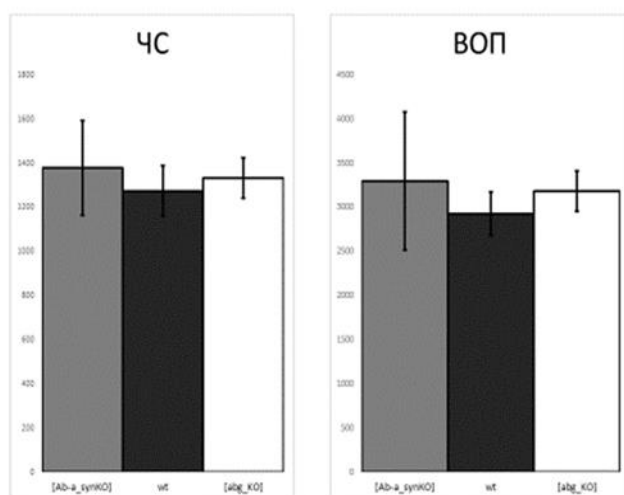


Рисунок 4.

Морфометрический анализ ДА нейронов в ЧС и ВОП у а-синуклеин нокаутных [Ab-a_synKO], у безсинуклеиновых [abg_KO] и у контрольных мышей дикого типа [wt] на 7-й день после рождения. n=5.

В данной серии экспериментов была использована третья линия мышей – безсинуклеиновые мыши [abg_KO], что было продиктовано появлением целого ряда работ, указывающих на возможность частичного функционального замещения белками семейства синуклеинов нарушения функции одного из них. Так, при отсутствии всех трех белков в нервной системе [abg_KO] мышей с возрастом развивались характерные для БП патологические изменения [Anwar S. et al., 2011]. Проведенный нами морфометрический анализ ДА нейронов в ЧС и ВОП показал, что у мышей [Ab-a_synKO] и у контрольных животных число ДА нейронов в исследованных структурах одинаково (Рис. 4). Более того, инактивация а-синуклеина не влияет на уже установившиеся после рождения популяции ДА нейронов в ЧС и ВОП, поскольку даже исключение возможного замещения

функции а-синуклеина другими двумя членами семейства в линии безсинуклеиновых мышей [abg_KO] не приводило к изменению их числа. Полученные нами с использованием конвенционного нокаута данные и данные других исследователей указывали на то, что раннее конститутивное удаление а-синуклеина у модельных мышей не приводит к развитию существенных патологических изменений нигростриатной системы. Отсутствие а-синуклеина, по-видимому, компенсируется в развивающейся нервной системе за счет высокой пластичности эмбрионального мозга [Robertson D.C. et al., 2004]. Однако инактивация а-синуклеина у взрослых животных путем подавления экспрессии гена лентивирусными конструкциями iРНК вело к развитию выраженных патологических изменений в нигростриатной системе [Gorbatyuk O.S. et al., 2010]. И наши, полученные в настоящем исследовании данные, и результаты из других лабораторий убедительно свидетельствовали, что у а-синуклеин нокаутных мышей популяция ДА нейронов отличается по целому ряду свойств от популяции этих же нейронов у мышей дикого типа. Однако эти различия могут быть выявлены только у взрослых и в большей степени у стареющих животных. Была предложена гипотеза, согласно которой качественные различия в составе популяций обусловлены и являются следствием онтогенетической селекции ранних нейронов с последующей компенсацией за счет механизмов пластичности эмбрионального мозга. При БП прогрессирующая а-синуклеинопатия, сопровождающаяся активным формированием цитоплазматических включений в определенных популяциях нейронов, характеризуется еще и нарастающим дефицитом а-синуклеина в синапсах. В такой ситуации у взрослых нейронов и особенно нейронов стареющего мозга, способность к компенсации дефицита а-синуклеина в пресинаптических терминалиях снижена. За нарушением функции а-синуклеина в синапсах следуют нарушения ДА нейротрансмиссии и нигростриатной системы в целом. Таким образом, дефицит функционального а-синуклеина в синапсах пациентов с БП, будет способствовать переходу

заболевания из пресимптоматической в симптоматическую стадию. Наиболее эффективным методом моделирования патологических последствий нарушения функции белка α -синуклеина во взрослой nigrostriatalной системе является создание линии генетически модифицированных животных с регулируемым тканеспецифическим нокаутом гена α -синуклеина. Для создания такой линии мышей нами были использованы животные [SNCA^{flox/flox}_neo^{FRT/+}], в геноме которых второй экзон гена альфа-синуклеина фланкирован loxP-сайтами (Рис. 5).



Рисунок 5 Схема генетических модификаций в локусе альфа-синуклеина у мышей линии [SNCA^{flox/flox}_neo^{FRT/+}].

LoxP-сайты фланкируют второй экзон и бактериальный ген *neo*; FRT-сайты фланкируют бактериальный ген *neo*; красными стрелками указано положение праймеров для детекции Cre-рекомбинации по LoxP-сайтам.

Расположение loxP-сайтов было выбрано таким образом, что в результате рекомбинации, осуществляемой Cre-рекомбиназой по loxP-сайтам, в новой последовательности не будет содержаться никаких открытых рамок считывания и не будет присутствовать последовательность, кодирующая бактериальный ген устойчивости к антибиотику неомицину, использованная при генетических модификациях на этапе селективного отбора ES-клонов.

Проведенный нами анализ содержания α -синуклеина в тканях нервной системы [SNCA^{flox/flox}_neo^{FRT/+}] мышей показал, что присутствие посторонних кодирующих последовательностей в интронной области гена существенно

снижает уровень экспрессии самого гена и содержание белка а-синуклеина в коре головного мозга, где в норме наблюдается его наибольшее количество (Рис. 6).

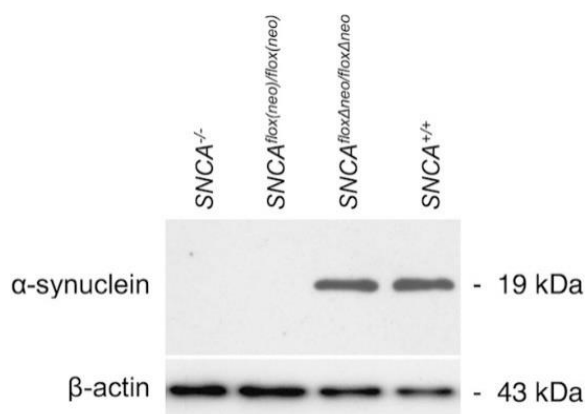


Рисунок 6 - Анализ содержания белка альфа-синуклеина в коре головного мозга мышей методом иммуноблотинга.

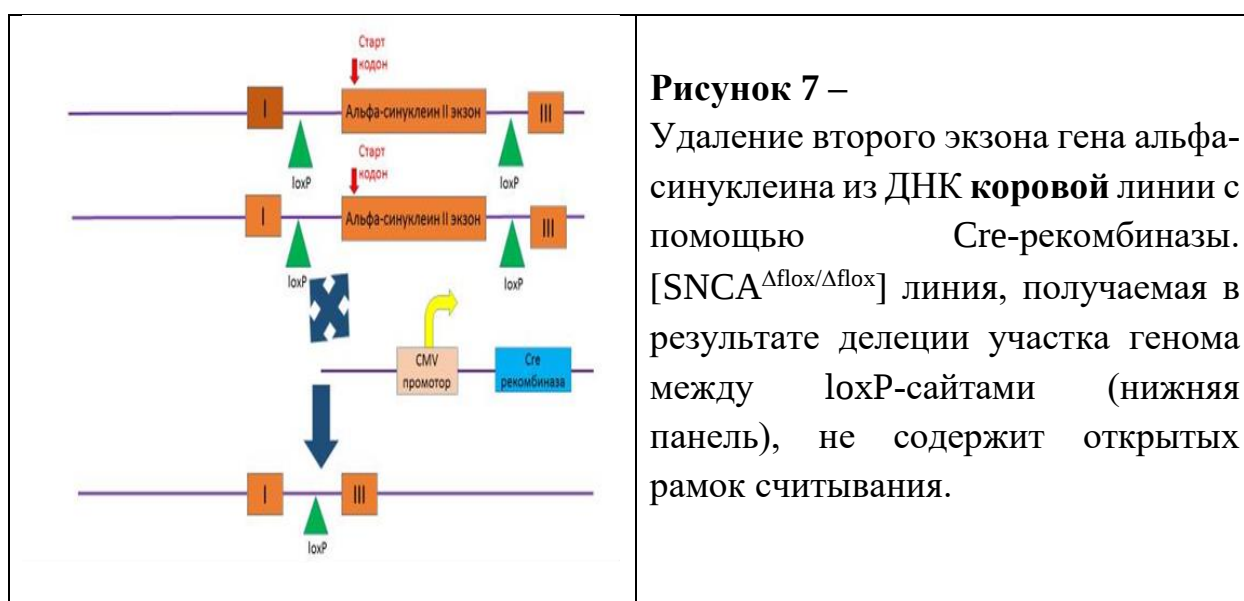
SNCA^{-/-} : конститутивный нокаут альфа-синуклеина, линия [Ab-a_synKO];
 SNCA^{flox(neo)/flox(neo)} : исходная линия [SNCA^{flox/flox}_neo^{FRT/+}] с фланкированным loxP-сайтами локусом альфа-синуклеина, в котором присутствует фланкированный FRT-сайтами ген нео; SNCA^{floxΔneo/floxΔneo} : исходная линия с удаленным по FRT-сайтам геном нео; SNCA^{+/+} : контрольная линия с немодифицированным локусом альфа-синуклеина (wt).

На нижней панели для сравнения представлен анализ содержания бета-актина в образцах тотального белка.

Удаление гена нео с помощью FRT рекомбинации путем скрещивания с мышами линии, содержащей трансгенную FLP-рекомбиназу, находится под промотором бета-актинового гена [Actin/FLP-рес], восстанавливало уровень а-синуклеина в полученной линии [SNCA^{floxΔneo/floxΔneo}] до уровня мышей дикого типа SNCA^{+/+} (Рис. 6). Такая линия соответствует требованиям *коровой* для производства тканеспецифических регулируемых нокаутов а-синуклеина и может быть использована для скрещивания с любыми трансгенными линиями, несущими кассету с Cre-рекомбиназами, узнающими loxP сайты.

Для подтверждения полученных на первой стадии работы данных, нами была создана новая линия мышей с генетическим нокаутом а-синуклеина.

Конститутивное удаление второго экзона гена альфа-синуклеина из генома [SNCA^{floxΔneo/floxΔneo}] мышей было проведено с помощью Cre-рекомбинации скрещиванием их с мышами трансгенной линии, продуцирующей Cre-рекомбиназу под контролем неспецифичного промотора вируса CMV. Использование раннего делитера позволило провести гомологическую рекомбинацию по LoxP-сайтам в модифицированном локусе и эффективно удалить второй экзон а-синуклеинового гена, таким образом была получена линия животных с генотипом [SNCA^{ΔfloxΔneo/+}] (Рис. 7).



Корректность Cre-рекомбинации по LoxP-сайтам была проверена генетическим анализом локуса методом ПЦР с использованием праймеров, обозначенных на (Рис. 5). При рекомбинации расстояние между L1 и L3 прайнерами составляет 300 пн, а в нерекомбинированном локусе фрагмент размером 1,2 тпн в наших условиях ПЦР реакции не амплифицируется, с нерекомбинированной аллели праймеры L1 и L2 направляют амплификацию фрагмента 360 пн (Рис. 8А). Белковый анализ подтвердил полное отсутствие а-синуклеина в тканях мышей этой линии (Рис. 8Б). Таким образом, нами была получена новая линия мышей с конститутивным нокаутом а-синуклеина с минимальными модификациями локуса этого гена.

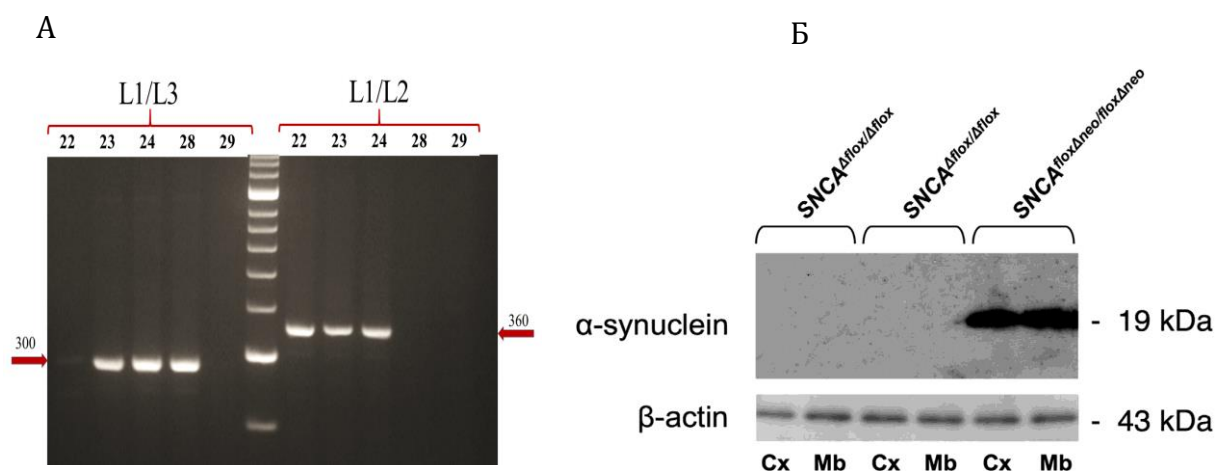


Рисунок 8 - Новый конвенционный нокаут гена α -синуклеина.

А. ПЦР-анализ ДНК мышей, содержащих модифицированную аллель в гетерозиготе (23,24), в гомозиготе (28) и контрольных животных дикого типа(22).

Б. Отсутствие белка а-синуклеина в мозге мышей линии $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$. Иммуноблотинг препаратов тотального белка из тканей коры головного мозга (Cx) и среднего мозга (Mb) у нокаутных животных из двух независимых пометов.

Поскольку в задачи данного исследования входило проведение сравнительного морфометрического исследования при формировании популяций ДА нейронов в ЧС и ВОП на двух независимых моделях, была использована полученная линия $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$. Уже на первом этапе анализа нами были выявлены различия числа ДА нейронов в ЧС $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и $[Ab-a_synKO]$ мышей. Так, у $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ животных в отличие от $[Ab-a_synKO]$ только на стадии E13.5 удавалось выявить статистически достоверное увеличение ТГ-положительных клеток в области развивающейся ЧС (Рис. 9), а в постнатальном периоде их число у $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ мышей было статистически достоверно выше, чем у контрольных животных. При том, что динамика формирования популяции ДА нейронов различна в двух линиях, модулирующий эффект а-синуклеина и в этой линии был выявлен только при формировании популяции ДА нейронов ЧС, а механизм формирования ДА нейронов в ВОП не требовал а-синуклеина (Рис. 9).

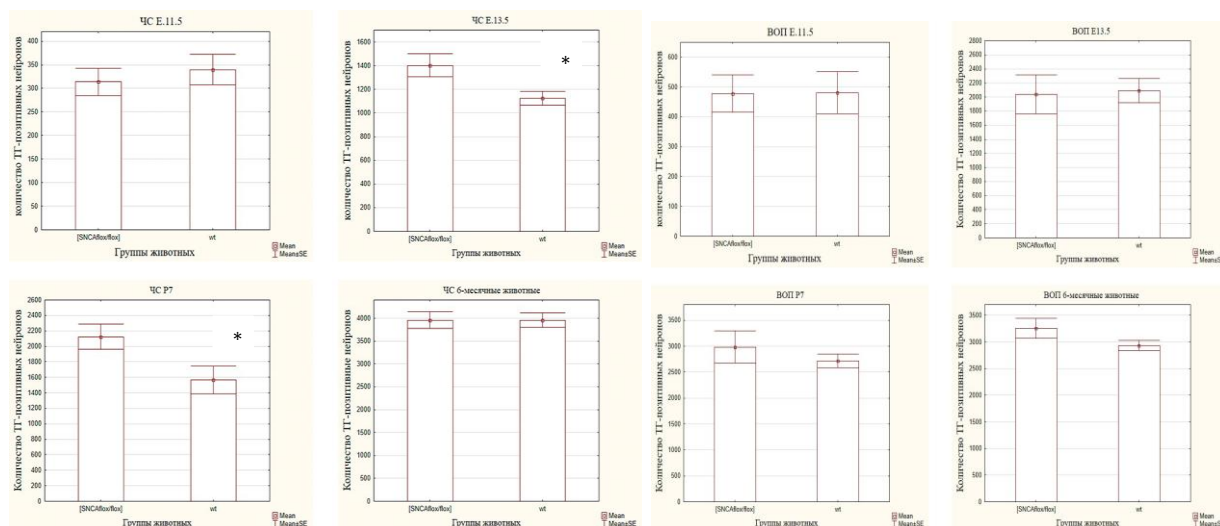


Рисунок 9 - Морфометрический анализ ДА нейронов в области ЧС (А) и ВОП (Б) у $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и контрольных (wt) мышей в эмбриогенезе (11.5 и 13.5 дни развития), раннем постнатальном (7й день после рождения) и у взрослых особей в возрасте 6 месяцев. $M \pm m$, $n = 5$ для каждой группы, *, **, ###, ¶ – $p < 0.01$ по критерию U Вилкоксона–Манна–Уитни.

Единственным различием в линиях $[Ab-a_synKO]$ и $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ был объем генетической модификации в локусе а-синуклеина. В отличие от линии $[Ab-a_synKO]$ в полученном нами новом конститутивном нокауте $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ регуляторные участки гена *Mmrn-1*, который расположен в интронной области гена а-синуклеина, не были затронуты. Интересно, что и в геноме мыши, и в геноме человека оба эти гена находятся в непосредственной близости друг от друга. Так, в геноме человека ген, кодирующий а-синуклеин, расположен на 4-й хромосоме и там же расположен ген, кодирующий *Mmrn-1*. В геноме мыши он расположен на 6-й хромосоме и сходно относительно а-синуклеина располагается ген *Mmrn-1*. Классическая нокаутная линия $[Ab-a_synKO]$ широко используется в исследованиях патогенеза БП и, в частности, ее пресимптоматических стадий. Предполагается, что генетические модификации локуса а-синуклеина теоретически не должны влиять на другие гены, поскольку их кодирующие части не затронуты. Однако, проведенный нами методом ОТ-ПЦР в реальном времени анализ уровня экспрессии *Mmrn-1*

1 показал, что в различных отделах нервной системы мышей линии [Ab-a_synKO] уровень РНК Mmtn-1 был существенно повышен. Так, например, в коре головного мозга его экспрессия превышает нормальный уровень более чем в 60 раз. В то же время в новой полученной нами линии SNCA^{Δflox/Δflox} его уровень практически не отличался от нормы (Рис. 10). Интересно, что в другой часто используемой нокаутной линии [T_a-synKO], в которой бактериальный ген neo располагается за пределами регуляторной области Mmtn-1 и в обратной ориентации, нами так же не было выявлено увеличения его экспрессии (Рис. 10). Вполне возможно, что такое существенное превышение содержания Mmtn-1 в нейронах может сказываться на фенотипе нокаутных животных. Нельзя исключить потенциальную возможность побочного эффекта нарушения процессов, регулируемых Mmtn-1, на ДА нейроны, их развитие и функционирование.

Наши данные указывают на ограниченность возможности применения модели [Ab-a_synKO] в исследованиях патогенетических механизмов БП. В тоже время полученная нами новая мышьяная линия конститутивного нокаута гена а-синуклеина является наиболее адекватной на сегодняшний день животной моделью недостаточности функции а-синуклеина в патогенезе а-синуклеинопатий и, в частности, БП.

ВЫВОДЫ

1. Для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения ДА нейронов получена новая линия нокаутных мышей [SNCA^{Δflox/Δflox}], в геноме которых конститутивная инактивация а-синуклеина выполнена с минимальными модификациями локуса этого гена.
2. С помощью сравнительного морфометрического анализа исследована динамика формирования двух различных популяций ДА нейронов в мозге мышей при конститутивной инактивации гена а-синуклеина и выявлен модулирующий эффект а-синуклеина на двух независимо полученных нокаутных линиях.
3. Анализ общего числа ДА нейронов в исследованных структурах мозга при эмбриогенезе и в ранний период постнатального синаптогенеза показал, что а-синуклеин оказывает выраженный модулирующий эффект на формирование популяции ДА нейронов чёрной субстанции, поражение которых характерно для БП, и не влияет на формирование ДА нейронов вентральной области покрышки, которая в гораздо меньшей степени подвержена дегенеративным изменениям у больных с БП.
4. Различия в числе ДА нейронов развивающейся черной субстанции, выявляемые при инактивации а-синуклеина, компенсируются на стадии завершения формирования структуры в обеих исследованных нокаутных линиях мышей.
5. Анализ включения BrDU предшественниками нейронов чёрной субстанции и вентральной области покрышки в эмбриогенезе показал, что их пролиферативная активность не меняется при инактивации а-синуклеина.
6. Исследование уровня экспрессии гена Mmtn-1, расположенного в непосредственной близости от гена а-синуклеина, показало, что использованные в нокаутной линии [Ab-a_synKO] модификации, затрагивающие регуляторные области гена Mmtn-1, в 70 раз повышают его экспрессию, в то время как в созданной нами новой линии уровень экспрессии Mmtn-1 не отличается от нормы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовано использование новой линии генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена α -синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов.
2. Рекомендовано депонирование аутопсийного материала и гистологических препаратов больных для создания репрезентативных коллекций, необходимых для проведения комплекса современных исследований патогенеза болезни Паркинсона и других альфа-синуклеинопатий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Т. В. Тарасова**, А.А.Устюгов, Н.Нинкина, В.И.Скворцова Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. // - **Патологическая физиология и экспериментальная терапия** -2016. - №2. С. **XX-XX**.
2. **Т. В. Тарасова**, О. А. Лыткина, А. Ю. Роман, член-корреспондент РАН С. О. Бачурин, А. А. Устюгов. Роль альфа-синуклеина в развитии дофаминергических нейронов чёрной субстанции и области вентральной покрышки среднего мозга.// Доклады академии наук. – М.,2016. – Т.466. - №5. С.620-623.
3. 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 alpha-synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression // Scientific Reports. – 2015. – V. 5. – P. 16615.
4. 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-комплекса // Доклады академии наук. – М., 2014. – Т. 456. – №5. С. 610-612.
5. С.О. Бачурин, Н.Н. Нинкина **Т.В. Тарасова**, Т.А. Шелковникова, Е.А. Ковражкина, А.П. Смирнов, О.Д. Разинская, В.И. Скворцова (2013)

Трансгенный метод моделирования бокового амиотрофического склероза. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, №9 с.58-63

6. Bachurin S.O., Shelkovanikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Afanasieva M.A., **Tarasova T.V.**, Alentov I.I., Buchman V.L., Ninkina N. (2012) Dimebon slows progression of proteinopathy in γ -synuclein transgenic mice **Neurotoxicity Research** 22(1), 33-42.

Тезисы докладов

1. **Тарасова Т.В.** Роль белка альфа-синуклеина в период формирования дофаминергических нейронов чёрной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга у линий трансгенных мышей. XXII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии». Санкт-Петербург, 7-8 апреля 2016 года, Россия, устный доклад. **Медаль им П.М.Альбицкого от Санкт-Петербургского общества патофизиологов за научную работу 2016.**
2. **Тарасова Т.В.** Влияние альфа-синуклеина на развитие дофаминергических нейронов чёрной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга у генетически модифицированных мышей. X Юбилейная Международная научно-практическая конференция молодых учёных-медиков. Курск, 26-27 февраля 2016 года, Россия, устный доклад. **Первая премия.**
3. **Тарасова Т.В.**, Лыткина О.А. Патогистологический анализ дофаминергических нейронов Черной субстанции у генетически модифицированных мышей, моделирующих недостаточность функции альфа-синуклеина. II Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной медицины», с. 59-60, Екатеринбург, 12 марта 2015 года, Россия, тезисы.
4. Овчинников Р.К., Роман А.Ю., **Тарасова Т.В.**, Кухарский М.С. Нарушение нейрогенеза в зубчатой извилине трансгенных мышей, моделирующих фронтотемпоральную лобарную дегенерацию. Третья европейская конференция по биологическим и медицинским наукам, 28 октября 2014, Вена, Австрия, тезисы.
5. **Тарасова Т.В.** – Исследование действия отечественного препарата Димебон на прогрессию протеинопатии в гамма-синуклеин трансгенных мышцах. VII Международная (XVI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых учёных, с. 311, 12 марта 2012 года, г. Москва, Россия, тезисы.

Список сокращений

БП - Болезнь Паркинсона

ЧС - черная субстанция

ВОП – вентральная область покрышки

ДА нейроны – дофаминергические нейроны

а-синуклеин – альфа-синуклеин

BrdU – 5-бром-2'-дезоксинуридин

Mmrn-1 – мультимерин-1

ТГ- тирозингидроксилаза

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Tarasova Tatiana Vladimirovna

**The role of alpha-synuclein in the development of populations dopaminergic neurons in the midbrain nuclei differentially affected in Parkinson's disease
(experimental study)**

A physiological role of alpha-synuclein is still not entirely understood but its predominant localisation in presynaptic terminals suggests that its major function is connected with modulation of synaptic neurotransmission. Changes in protein homeostasis resulted in aggregation underlie pathological cascade that leads to the development proteinopathy with formation of histopathological inclusions where the major component is alpha-synuclein. Mutations in the alpha-synuclein-encoding gene (SNCA) are associated with familial forms of Parkinson's disease (PD). Altering the compartmentalisation of alpha-synuclein, namely redistribution the protein to the neuronal cell body and sequestering in pathological inclusions with consequent deprivation of synaptic terminals and loss of its synaptic function, is considered as an important factor in the pathogenesis of alpha-synucleinopathies.

This dissertation is devoted to study the role of alpha-synuclein in development and maturation of dopaminergic neurons in two different structures of a mouse brain using knockout mouse lines to model the deficiency of alpha-synuclein function. A new SNCA knockout line with minimal genome modifications has been created. No regulatory sequences of other genes, including Multimerin-1, have been affected by manipulation of the alpha-synuclein locus. Therefore it is a convenient model for studying pathophysiologic aspects of selective impairment of DA neurons.

In the knockout and control mice the dynamics of the formation of two distinct populations of dopaminergic neurons differently affected in patients with PD was studied by the comparative morphometric analysis. Our data have shown a prominent modulating effect of alpha-synuclein on the developing DA neurons in substantia nigra (SN), that are most affected in PD patients, and have shown that alpha-synuclein has no effect on the formation of DA neurons in ventral tegmental area (VTA), which is much less susceptible to degeneration in PD patients.