

Коллектив авторов, 2016
УДК 616-092.9

Тарасова Т.В.^{1,2}, Устюгов А.А.¹, Нинкина Н.Н.^{1,2}, Скворцова В.И.³

Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов

¹ — ФГБНУ «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук, 142432, Московская область, Черноголовка, Северный проезд, д. 1

² — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

³ — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117415, Москва, ул. Лобачевского, д. 42, корп. 6

Цель исследования. Определение роли белка альфа-синуклеина в развитии и формировании популяций дофаминергических нейронов. **Методы.** В данной работе для моделирования недостаточности функции альфа-синуклеина была использована новая линия мышей с генетическим нокаутом *SNCA*. С помощью сравнительного морфометрического анализа у нокаутных и контрольных мышей была исследована динамика формирования двух различных популяций дофаминергических нейронов, дифференциально поражаемых у больных с болезнью Паркинсона (БП). **Результаты.** Показано, что альфа-синуклеин оказывает выраженный модулирующий эффект на развитие дофаминергических (ДА) нейронов чёрной субстанции (ЧС), поражение которых характерно для БП, и не влияет на формирование ДА нейронов вентральной области покрышки (ВОП), которая в меньшей степени подвержена дегенеративным изменениям при БП. **Заключение.** Новая линия нокаутных мышей является удобной моделью для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения ДА нейронов.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания; альфа-синуклеинопатии; дофаминергические нейроны; болезнь Паркинсона (БП); генетический нокаут.

Для цитирования: Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. 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; 60(3): 4–9.

Для корреспонденции: Тарасова Татьяна Владимировна, мл. науч. сотр., ФГБНУ «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук, e-mail: tarasovat189@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (идентификатор RFMEFI60414X0144).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.03.2016

Tarasova T.V.^{1,2}, Ustyugov A.A.¹, Ninkina N.N.^{1,2}, Skvortsova V.I.³

The new line of genetically modified mice with constitutive knockout of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons

¹ — Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences (IPAC RAS). Severniy pr., Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia

² — The Institute of general pathology and pathophysiology. 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

³ — Department of fundamental and clinical neurology and neurosurgery of Russian national research medical University Medicobiologic faculty. 42 Lobachevscogo st., Moscow, 117415, Russia

The purpose. This study investigated the role of alpha-synuclein in the development of dopaminergic neurons. **Methods.** In this study a new *SNCA* knockout mouse line has been used to model the deficiency of alpha-synuclein function. In the knockout and control mice the dynamics of the formation of two distinct populations of dopaminergic neurons differentially affected in patients with PD was studied by the comparative morphometric analysis. **Results.** Here, we revealed a

prominent modulating effect of alpha-synuclein on the developing DA neurons in substantia nigra (SN) which is the most affected region in PD patients. Yet, alpha-synuclein had no effect on the formation of DA neurons in ventral tegmental area which is much less susceptible to degeneration in PD patients. **Conclusion.** The new line of knockout mice is a convenient model for studying pathophysiological aspects of selective impairment of DA neurons.

Keywords: neurodegenerative diseases; alpha-synucleinopathies; dopaminergic neurons; Parkinson's disease (PD); knockout mice

For citation: Tarasova T.V., Ustyugov A.A., Ninkina N.N., Skvortsova V.I. The new line of genetically modified mice with constitutive knockout of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 4–9. (in Russ).

For correspondence: Tatiana V. Tarasova, Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences (IPAC RAS). Severniy pr., Chernogolovka, Moscow region, 142432, e-mail: tarasovat189@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was supported by the RF Ministry of Education and Science RFMEFI60414x0144.

Received 23.03.2016

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — социально значимое нейродегенеративное заболевание, частота встречаемости которого прямо коррелирует с возрастом, и по данным мировых популяционных исследований составляет от 0,5 до 1% среди населения в возрасте старше 65 лет. В возрастной группе старше 65 лет эти показатели еще выше и составляют 2—4% [1—3]. В подавляющем большинстве случаев диагностируются идиопатические формы БП и лишь 5—10% являются семейными формами [4].

Характерным патогистологическим признаком БП являются классические цитоплазматические тельца Леви [5], выявляемые в аутопсийном материале больных, в первую очередь, в области черной субстанции (ЧС) [6]. В составе этих эозинфильных включений в качестве основного компонента был обнаружен агрегированный альфа-синуклеин [7].

Мутации в гене альфа-синуклеина (*SNCA*) часто являются причиной изменения его агрегационных свойств и формирования включений. После описания первой аутосомно-доминантной мутации в гене *SNCA* при семейной форме БП, существенно активизировалось изучение локуса альфа-синуклеина [8]. Всего в результате медико-генетических исследований больных с БП было выявлено 6 мутаций с заменой аминокислот. Все они расположены между вторым и четвертым КТК-повторами, которые представляют собой повторяющейся аминокислотный мотив КТКЕГV на протяжении первых 87 аминокислотных остатков белковой молекулы [4, 9, 10]. Помимо точечных мутаций описаны дубликации [11] и трипликации [12] в локусе гена *SNCA*, которые также ассоциированы с наследственными формами БП. Считается, что мутации в гене альфа-синуклеина могут быть причиной агрегации этого белка и формирова-

ния фибрилл амилоидного типа с развитием прогрессирующей альфа-синуклеинопатии, которая характерна для болезни Паркинсона.

Данная работа посвящена изучению роли альфа-синуклеина в развитии дофаминергических нейронов в двух близко расположенных анатомических структурах мозга: черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) среднего мозга. Если поражение дофаминергических нейронов черной субстанции является основным признаком БП, то ДА нейроны вентральной области покрышки практически не затрагиваются дегенеративным процессом.

Цель исследования — изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе нарушения конформационной стабильности, метаболизма и компартиментализации альфа-синуклеина и его роли в патогенезе болезни Паркинсона.

Методика

В качестве экспериментальной модели была использована новая линия нокаутных мышей с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина [*SNCA*^{Δflox/Δflox}]. Генетические модификации, обеспечивающие делецию содержащего старт-код экзона, были выполнены в минимально возможном на сегодняшний день объеме [13]. В качестве контрольной группы были использованы когорты мышей, полученные в процессе производства нокаутных животных и имеющие с ними общих производителей, не получившие модифицированный аллель (дикого типа). Все животные группы были на генетическом фоне линии C57Bl6].

Колонии экспериментальных и контрольных мышей содержались в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч светлого времени, 12 ч темного времени) при постоянной температуре 20°C. Работы с животными

проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

Подсчёт клеток проводили на эмбриональных стадиях развития, когда происходит активное формирование ДА нейронов: на 11,5 день развития, а также на 12,5 и 13, эмбриональные дни, и в период постнатального синаптогенеза — 7 сут. после рождения, а также у взрослых шестимесячных животных.

Для приготовления гистологических препаратов фиксацию эмбрионов проводили с помощью холодного 4% параформальдегида на физрастворе, также как и головного мозга 7-суточных животных для последующего иммуногистохимического анализа. Материал от взрослых животных фиксировали в жидкости Карнуа. После фиксации отмывали образцы в фосфатно-солевом буфере и проводили дегидратацию. На последнем этапе де-

гидратации использовали ксилол в случае эмбриональных тканей, а для тканей взрослых животных — хлороформ. Серийные срезы толщиной 8 мкм получали с помощью ротационного микротомы Leica RM2265 и монтировали на предметные стекла. Иммуногистохимическое окрашивание ДА нейронов проводили с использованием антител против тирозингидроксилазы (ТГ) (Mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase clone TH-2, Sigma) в концентрации 1:1000. Подсчёт ТГ-позитивных нейронов выполняли на серии срезов во всей анатомической структуре черной субстанции и, отдельно, в вентральной области покрышки. Для анализа количества ДА нейронов использовали стереологический подход для подсчёта ТГ-позитивных нейронов в серии срезов во всей анатомической структуре чёрной субстанции и отдельно в вентральной области покрышки [14, 15],

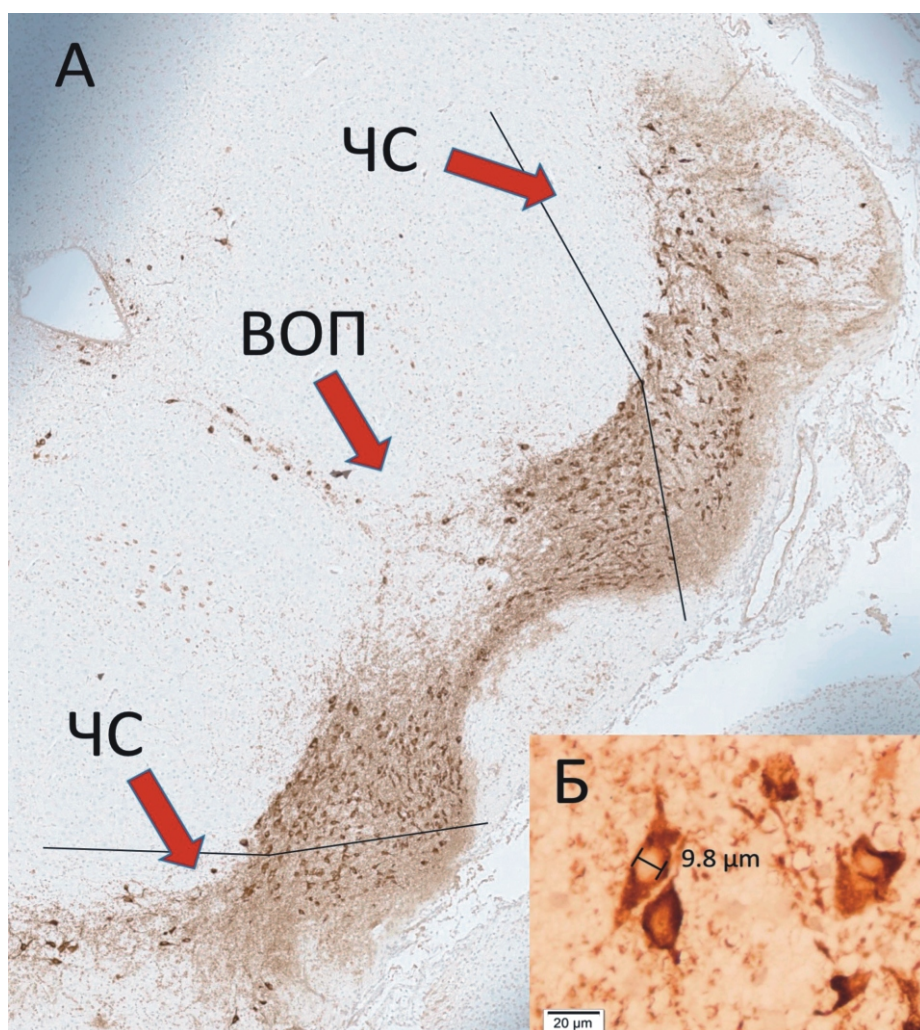


Рис. 1. Иммуногистохимическое окрашивание среза головного мозга мыши для подсчёта ТГ-позитивных нейронов.

А. Общий план, локализация черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП) в среднем мозге мыши на 7-й день постнатального развития. Окраска моноклональными антителами против тирозингидроксилазы. Стрелками указаны области чёрной субстанции для левой и правой сторон и вентральной области покрышки. Увеличение 100х. Б. Измерение диаметра ядра нейрона. Увеличение 200х.

с некоторыми собственными модификациями [16]. Локализацию анализируемой анатомической структуры определяли по атласу [17].

Для подсчета каждый 5-й срез располагали на предметном стекле, всего 10 срезов толщиной в 8 мкм на стекло, и проводили стандартную иммуногистохимическую окраску. Выполняли микроскопию и получали микрофотографии при увеличении 200х и 400х на фотокамере Leica DFS 490 с программным обеспечением Leica Application Suit v. 2.8.1. Подсчет количества нейронов, окрашенных тирозингидроксилазой, проводили вручную. Подсчитывали общее число нейронов для ВОП и отдельно значения для правой и левой частей ЧС. Вычисляли общее значение числа ДА нейронов во всем объеме анализируемой анатомической структуры. Не все видимые под микроскопом на каждом срезе нейроны являются цельными объектами, поскольку диаметр клетки может быть больше, чем толщина микротомного среза. Для введения коррекционной поправки измеряли диаметр 30 нейронов, располагавшихся в каждой из исследуемых областей (рис. 1), и определяли общее количество нейронов в популяции во всем объеме исследуемой анатомической структуры с помощью поправки Абекромби по формуле [18, 19] с собственными модификациями [16]. Ста-

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

Результаты и обсуждение

Нами было выявлено, что при формировании предшественников ДА нейронов в ЧС у животных линии $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ в период эмбриогенеза на стадии E11.5 количество ТГ-позитивных клеток одинаково, как в опытной, так и в контрольной группе. На эмбриональной стадии E13.5 у мышей линии $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ детектировалось статистически значимое увеличение ТГ-позитивных клеток на 20% по сравнению с контрольными животными дикого типа от тех же производителей (рис. 2).

Нельзя исключить потенциальную возможность повышения регенеративного ресурса в изучаемой анатомической области за счёт олигодендроцитов, важная роль которых в регенеративных процессах мозга была описана в ряде работ [20]. При анализе популяций ТГ-позитивных клеток в ВОП у нокаутных и контрольных животных дикого типа в эмбриогенезе статистически значимых различий выявлено не было (рис. 3), что согласуется

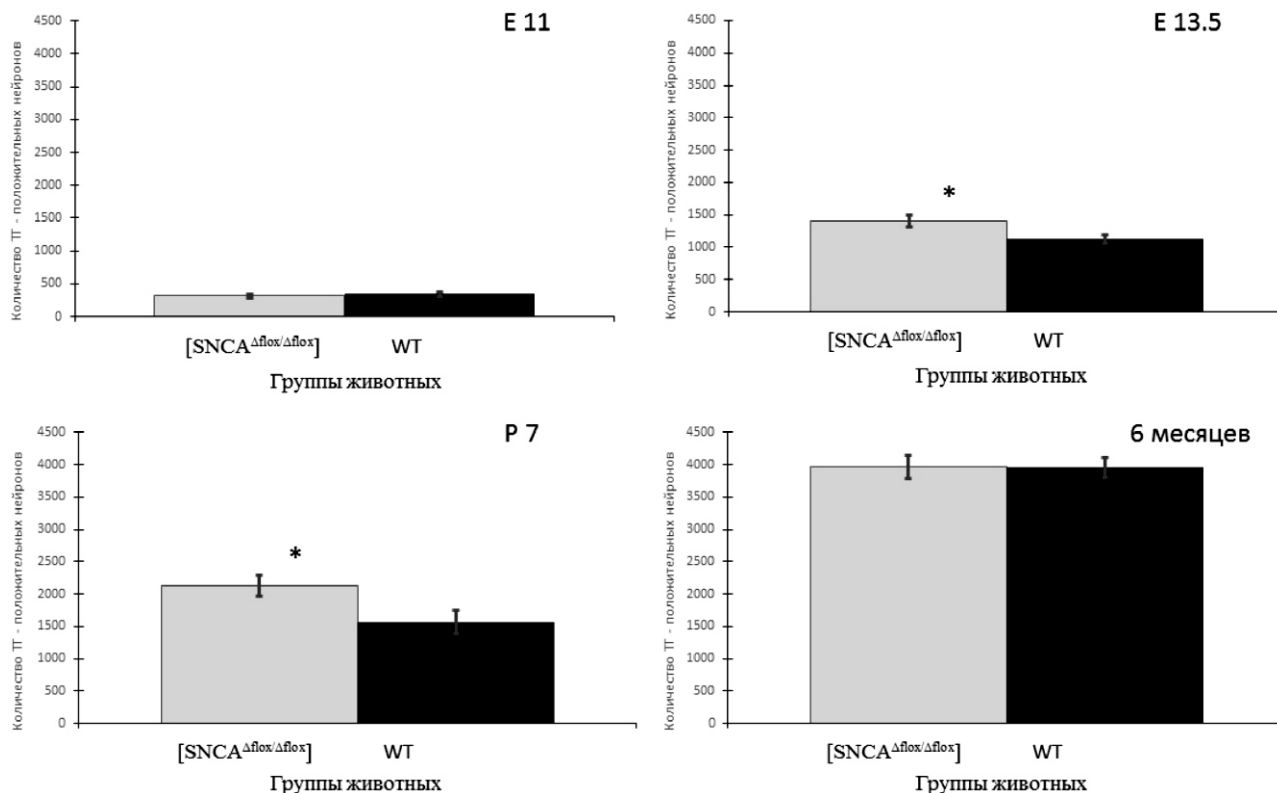


Рис. 2. Сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов в чёрной субстанции мозга мышей при генетической инактивации альфа-синуклеина. Общее число ДА нейронов в анатомической структуре у животных нокаутной линии $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и контрольных группы животных дикого типа (WT) в эмбриогенезе: E11.5 и E13.5, P7 — раннем постнатальном периоде (7-й день после рождения) и у взрослых особей (возраст 6 мес.); $n = 5$ для каждой группы, * — $p < 0,01$ по критерию U Вилкоксона—Манна—Уитни.

с патогистологическими данными по исследованию этих анатомических областей мозга у больных с БП, указывающими на гораздо менее выраженные признаки поражения ДА нейронов ВОП по сравнению с ЧС.

В раннем постнатальном периоде морфометрический анализ ДА нейронов в ЧС у $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ мышей на 7-е сут. после рождения показал, что у нокаутных животных их число статистически значимо выше (9%), чем у контрольных животных дикого типа (рис. 2). Однако при анализе ДА нейронов в области ВОП и на этом этапе развития nigrostriарной системы не было выявлено статистически значимых различий у нокаутных животных и контрольных животных дикого типа (рис. 3).

Поскольку известно, что дефицит ДА нейронов, выявляемый на ранних стадиях развития ЧС, компенсируется на последующих стадиях [21], был проведен сравнительный морфометрический анализ ДА нейронов у молодых животных в возрасте 6 мес. с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и контрольных мышей с генотипом дикого типа из тех же пометов. Было показано, что у молодых

взрослых животных происходит компенсаторная нормализация количества ДА нейронов и статистически значимой разницы в количестве клеток не обнаруживается ни в ВОП, ни в ЧС (рис. 2, 3).

В данном исследовании нами было выявлено влияние альфа-синуклеина на развитие дофаминергических нейронов в эмбриогенезе в черной субстанции и вентральной области покрышки среднего мозга новой линии нокаутных мышей с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина. Был проведен морфометрический анализ дофаминергических нейронов в двух анатомических областях: ЧС и ВОП на стадии постнатального синаптогенеза с конститутивной инактивацией гена альфа-синуклеина, при котором были выявлены отличия от контрольной группы. Таким образом, в отсутствие альфа-синуклеина, в развивающемся мозге мышей происходит ускоренная дифференцировка ТГ-позитивных нейронов в области черной субстанции, а также более активный синаптогенез, в то время, как их пролиферация, миграция, дифференцировка во время эмбрионального развития и в период активного синаптогенеза в зоне вентраль-

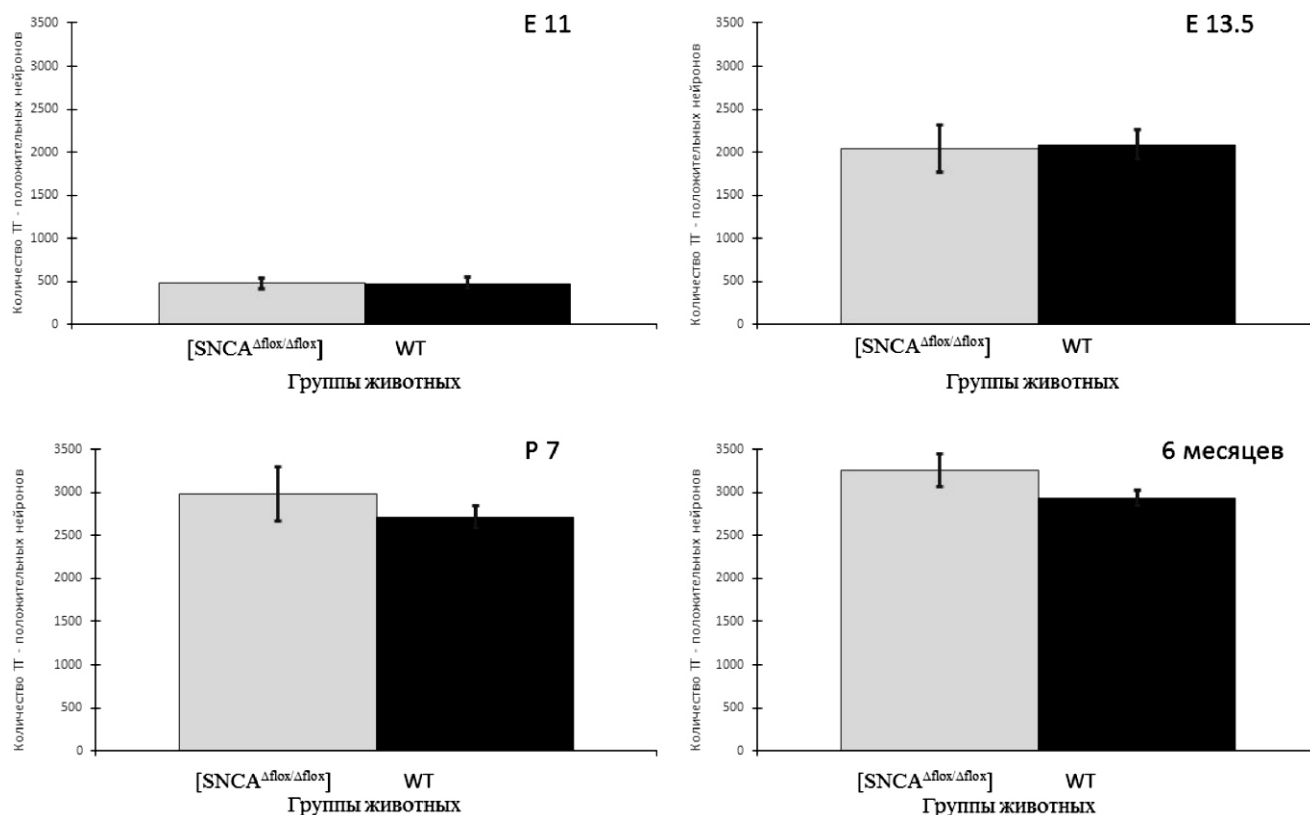


Рис. 3. Сравнительный морфометрический анализ дофаминергических нейронов в вентральной области покрышки (ВОП) мозга мышей при генетической инактивации альфа-синуклеина.

Общее число ДА нейронов в анатомической структуре у животных нокаутной линии $[SNCA^{\Delta flox/\Delta flox}]$ и контрольной группе животных дикого типа (WT) в эмбриогенезе: E11.5 и E13.5, P7 — раннем постнатальном периоде (7-й день после рождения) и у взрослых особей (возраст 6 мес.); $n = 5$ для каждой группы.

ной области покрывки не отличается от контрольной группы животных.

Была выявлена нормализация количества ДА нейронов при анализе шестимесячных животных, что возможно достигается за счёт пластичности головного мозга.

Полученные данные демонстрируют моделирующее действие альфа-синуклеина в процессе формирования ДА нейронов чёрной субстанции среднего мозга на различных этапах онтогенеза и в постнатальном периоде.

References

1. Rinne J.O., Anichtchik O.V., Eriksson K.S., Kaslin J., Tuomisto L., Kalimo H. et al. Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *J Neurochem*; 2002; 81 (5): 954-60.
2. Schapira A.H. Disease-modifying strategies and challenges in PD: interactive breakout sessions. *Neurology*. 2003; V. 61, (№ 6 Suppl 3): S56-63.
3. de Lau L.M., Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5 (6): 525-35.
4. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*; 2009; 18(№ R1): R48-59.
5. Kryzhanovskiy G.N., Karaban I.N., Magaeva S.V., Kucheryanu V.G., Karaban N.V. Parkinson's disease. [Bolezni Parkinsona] *Moscow: Meditsina*; 2002. (in Russian)
6. Dickson D.W., Braak H., Duda J.E., Duyckaerts C., Gasser T., Halliday et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009; 8(12): 1150-7.
7. Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(11): 6469-73.
8. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276 (5321): 2045-7.
9. Appel-Cresswell S., Vilarino-Guell C., Encarnacion M., Sherman H., Yu I., Shah B. et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013; 28(6): 811-3.
10. Pasanen P., Myllykangas L., Siitonen M., Raunio A., Kaakkola S., Lyytinen J. et al. Novel alpha-synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*. 2014; 35 (9): 2180 e1-5.
11. Ibanez P., Bonnet A.M., DeBarges B., Lohmann E., Tison F., Pollak P. et al.; Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 364 (9440): 1169-71.
12. Singleton A., Gwinn-Hardy K.; Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies: a difference in dose? *Lancet*. 2004; 364 (9440): 1105-7.
13. 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. *Sci Rep*. 2015; V. 5: P. 16615.
14. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Dorig N., Connor-Robson N. et al. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J Neurosci*. 2011; 31(20): 7264-74.
15. Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *J Neurochem*. 2004; 89 (5): 1126-36.
16. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Khritankova I., Afanasieva M.A. et al. Dimebon slows progression of proteinopathy in gamma-synuclein transgenic mice. *Neurotox Res*. 2012; 22(1): 33-42.
17. Franklin K.B.J., Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates; Third Edition: USA: *Academic Press is an imprint of Elsevier*; 2007.
18. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946; V. 94: P. 239-47.
19. Abercrombie M., Johnson M.L. The effect of reinnervation on collagen formation in degenerating sciatic nerves of rabbits. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1947; 10(2): 89-92.
20. Kubatiev A.A., Paltsyn A.A. Intracellular brain regeneration: a new view. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh nauk*. 2012; V. 8: p. 21-5. (in Russian)
21. Tarasova T.V., Lytkina O.A., Roman A.U., Bachurin S.O., Ustyugov A.A. The role of alpha-synuclein in the development of the dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Doklady Akademii Nauk*. 2016; V 466 (№5): p.620-3. (in Russian)

Сведения об авторах:

Устюгов Алексей Анатольевич, канд. биол. наук, «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук

Нинкина Наталья Николаевна, доктор мед. наук, зав. лаб. генетического моделирования нейродегенеративных процессов, «Институт физиологически активных веществ», Российская академия наук

Скворцова Вероника Игоревна, доктор мед. наук, член-кор., каф. фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии МБФ РНИМУ, 117415, Москва, ул. Лобачевского, д. 42, корпус 6 +7