

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

Устюгов Алексей Анатольевич

Центр доклинических испытаний
Институт физиологически активных веществ РАН

alexey@ipac.ac.ru

Подготовлено для GLP Planet

5-6 июля 2021

Санкт-Петербург

Нейродегенеративные заболевания

- Неоднородная группа наследственных или приобретённых заболеваний нервной системы с прогрессирующей гибелью нейронов, ведущая к деменции и нарушению двигательных функций.
- В мире к **2050**: 131,5 млн человек
- Распространённость в **России к 2030** году возрастёт более чем в 1,5 раза и к **2050** году превысит эпидемиологический порог в **5%** населения страны – 7 млн. человек.

Нейродегенеративные заболевания

	частота встречаемости	<u>на 1 млн</u>	<u>% от общего</u>
Болезнь Альцгеймера	1 из 300	3,300	>90%
Болезнь Паркинсона	1 из 5,000	200	} <10%
Деменция с тельцами Леви	6 из 100,000	60	
Фронтотемпоральная деменция	3 из 100,000	30	
Боковой амиотрофический склероз	2 из 100,000	20	
Хорея Гентингтона	6 из 1,000,000	6	

Актуальность проблемы

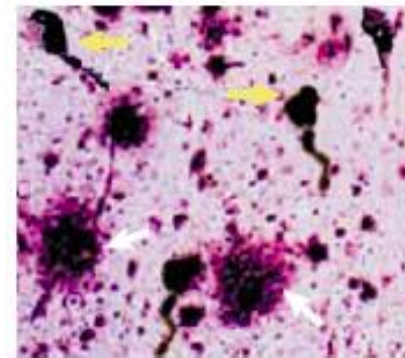
Нехватка эффективных лекарственных средств для лечения НДЗ обусловлена:

- ограниченностью теоретических знаний **в области патогенеза** нейродегенеративных процессов
- **отсутствием адекватных моделей**, обеспечивающих получение новых теоретических знаний о молекулярных патологических процессах, а также подходы для отбора потенциальных лекарственных препаратов

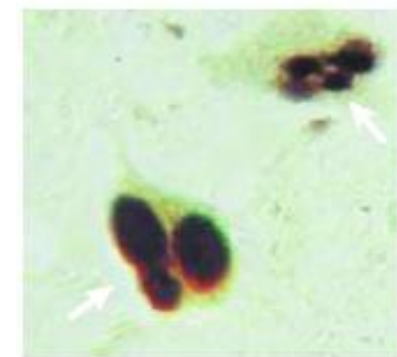
Нейродегенеративные заболевания – протеинопатии:

изменение конформации, нарушение метаболизма, агрегация и токсичность разных белков

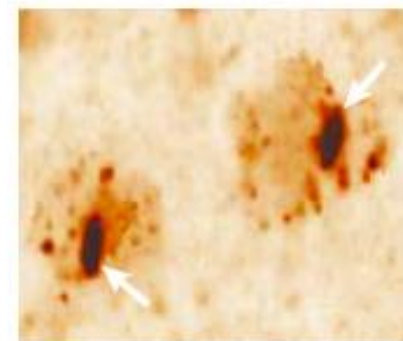
- **Болезнь Альцгеймера:**
бета-амилоид: сенильные бляшки
тау: нейрофибриллярные клубки
- **Болезнь Паркинсона:**
альфа-синуклеин: тельца Леви
- **Хорея Гентингтона:**
гентингтин: внутриядерные включения
- **Боковой амиотрофический склероз и фронтотемпоральная деменция:**
TDP-43 и FUS: цитоплазматические агрегаты



бляшки и клубки при БА



тельца Леви

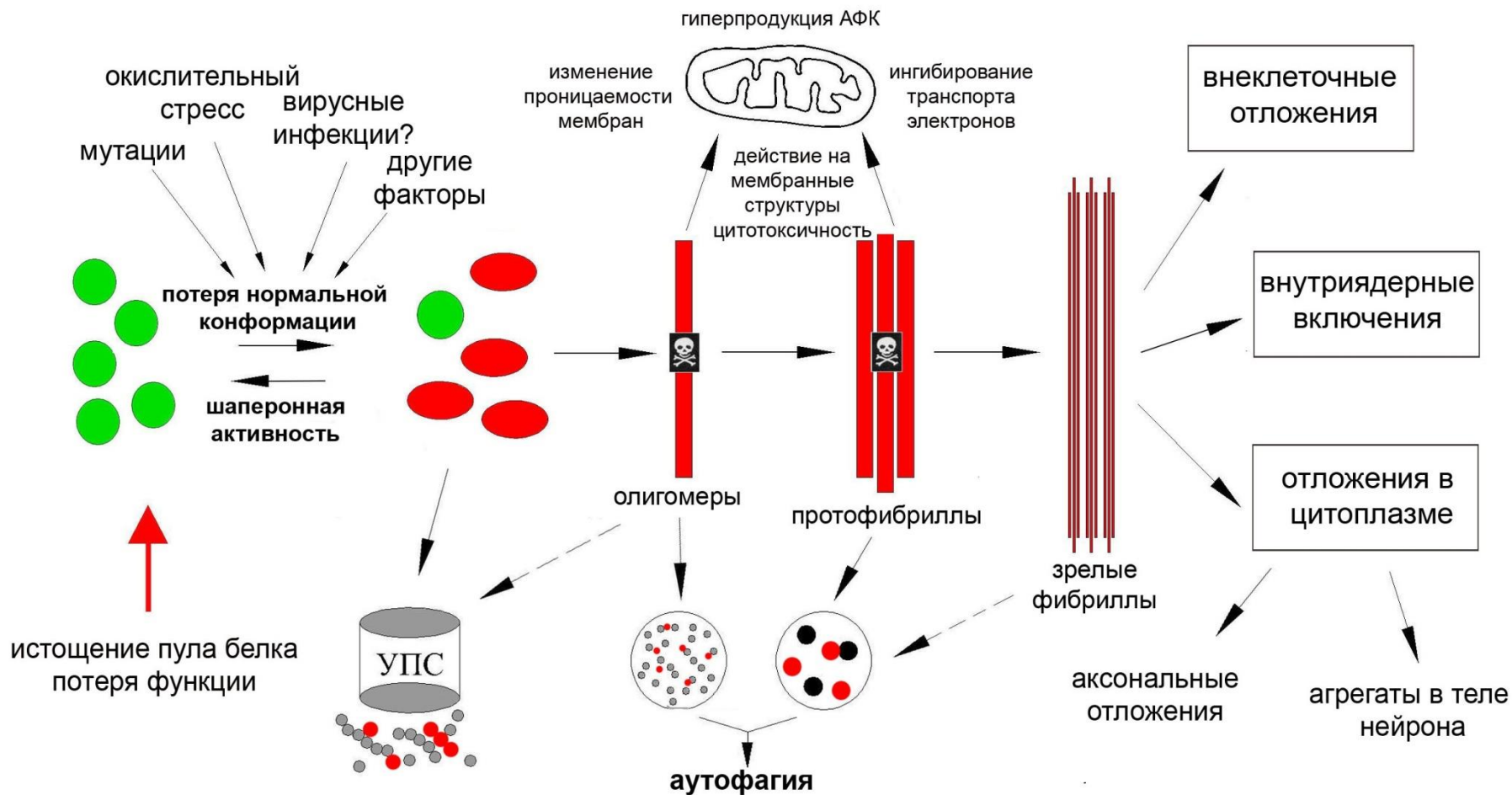


5
включения гентингтина

Необходимость в создании новых модельных систем с заданной патологией и характеристики уже имеющихся моделей на новом уровне

Генетические модели – важная тест-система для изучения **патологических механизмов НДЗ**, а также для отбора и исследования механизма действия нейропротекторных препаратов

Общий молекулярный механизм формирования белковых агрегатов при протеинопатиях



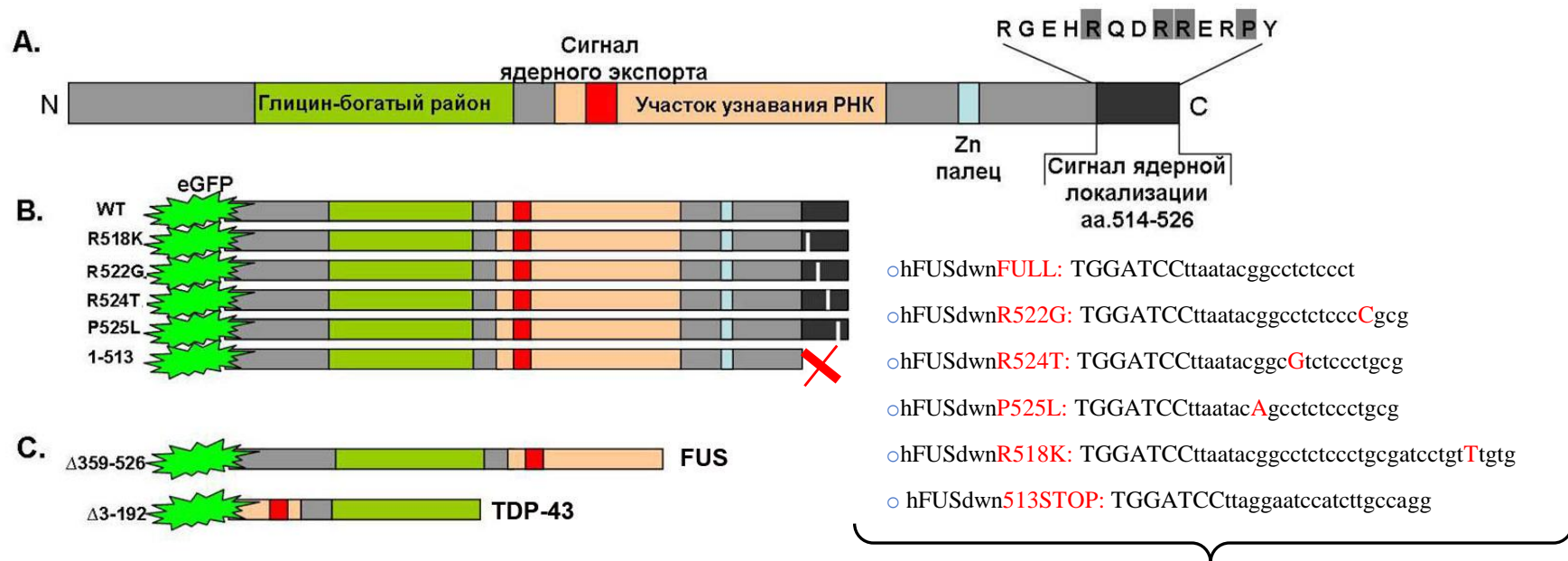
УПС – убиквитин-протеасомная система; АФК – активные формы кислорода.

Цель: Создание моделей протеинопатий для изучения патогенеза нейродегенеративных процессов, и использование этих моделей для поиска потенциальных лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний

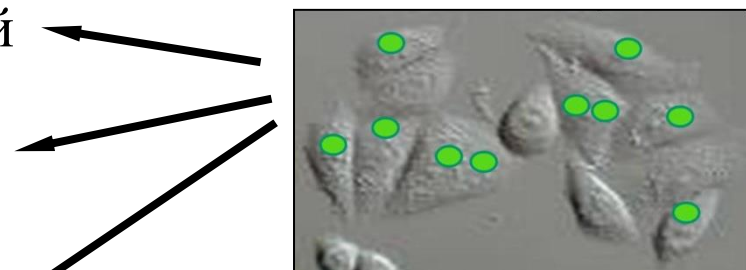
Задачи:

- провести генетические модификации неамилоидогенных, склонных к агрегации белков, детально изучить динамику экспрессии и их внутриклеточную локализацию;
- воспроизвести основные молекулярные звенья протеинопатии в клеточных и животных моделях;
- 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 модельными препаратами, проявляющим выраженные антиагрегационные свойства;
- определить основные критерии отбора лекарственных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит явление протеинопатии

Схема исследования мутированных изоформ FUS и TDP-43 в клеточной модели протеинопатии



- биохимический анализ включений
- цитотоксичность мутированных белков
- иммуногистохимический анализ агрегатов

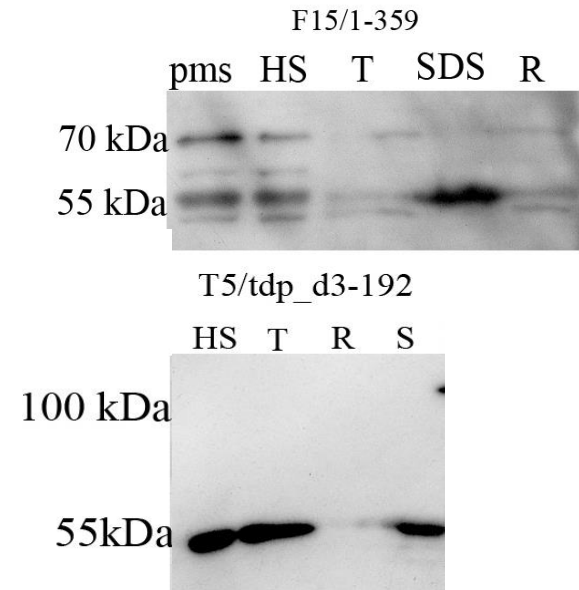
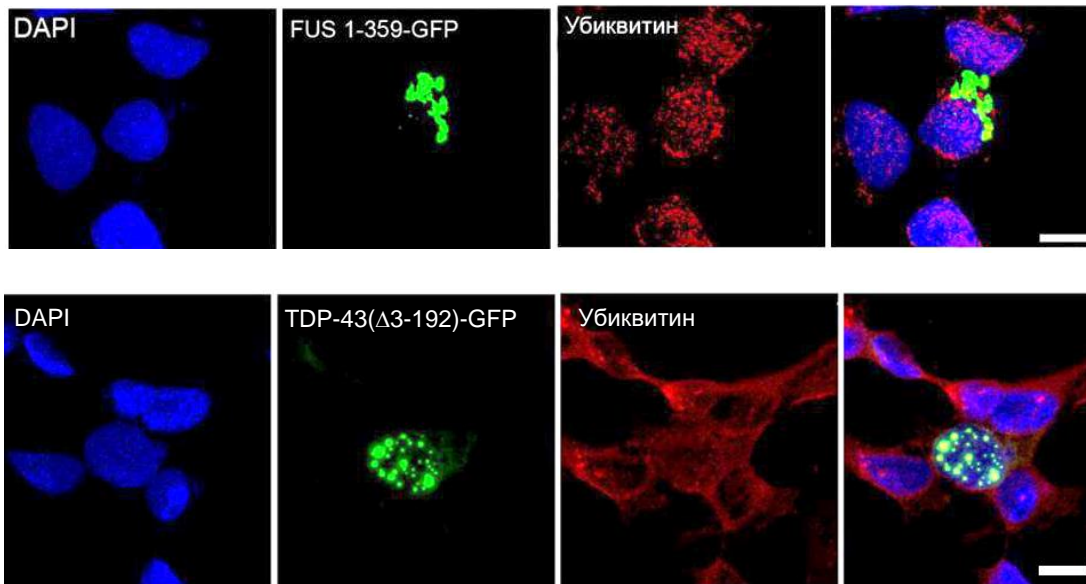


Трансфекция клеток
нейробластомы
человека SH-SY5Y

Моделирование протеинопатии в клеточных культурах

Качественный и количественный анализ отложений

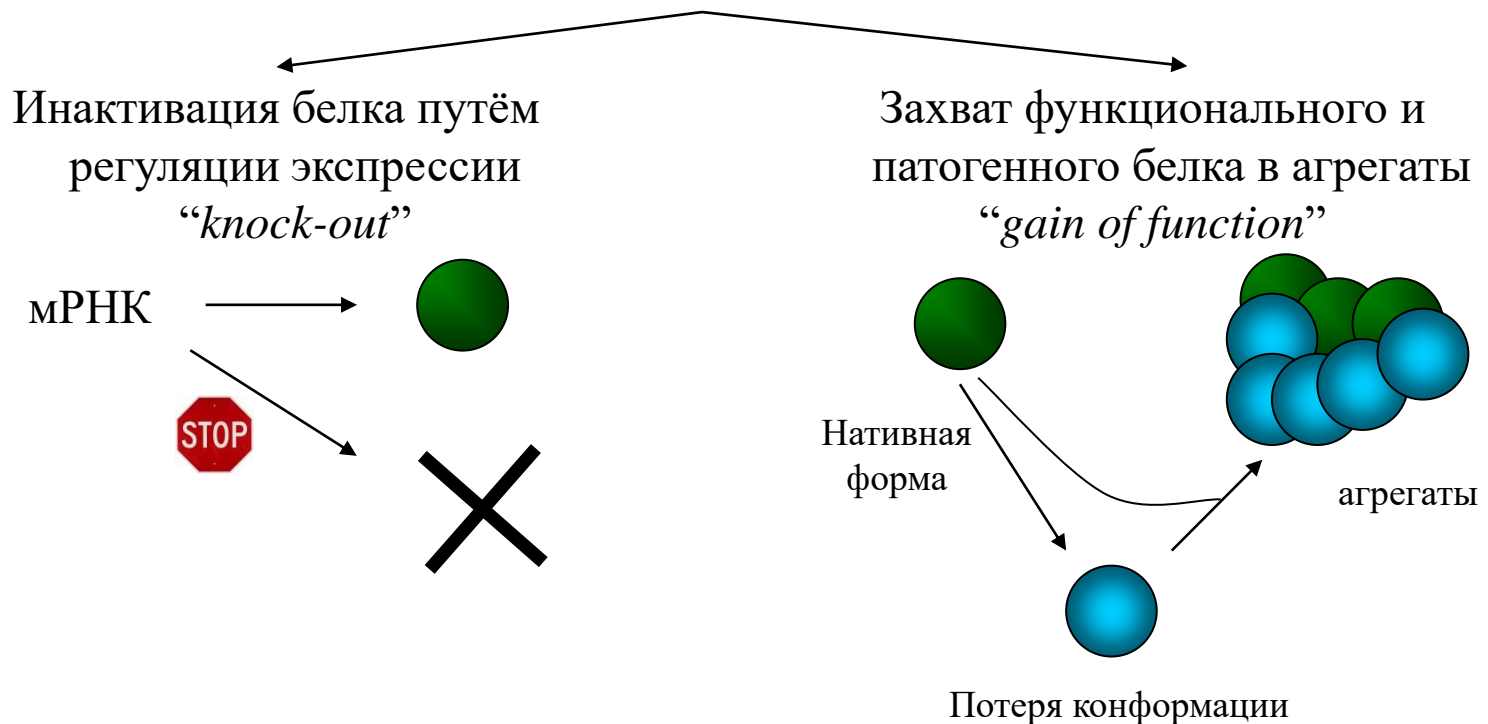
Визуализация клеток после трансфекции и иммуноблоттинг после дифференциального центрифугирования (фракции: **HS** – высокосолевого буфер, **T** – Triton X-100, **R** – RIPA, **S** – SDS).



- Мутации в домене сигнала ядерной локализации и распознавания РНК приводят к агрегации белков TDP-43 и FUS в клеточной культуре
- Цитоплазматические отложения схожи с включениями, обнаруживаемыми в аутопсийном материале больных

Моделирование протеинопатии в трансгенных животных

Истощение пула функционального белка

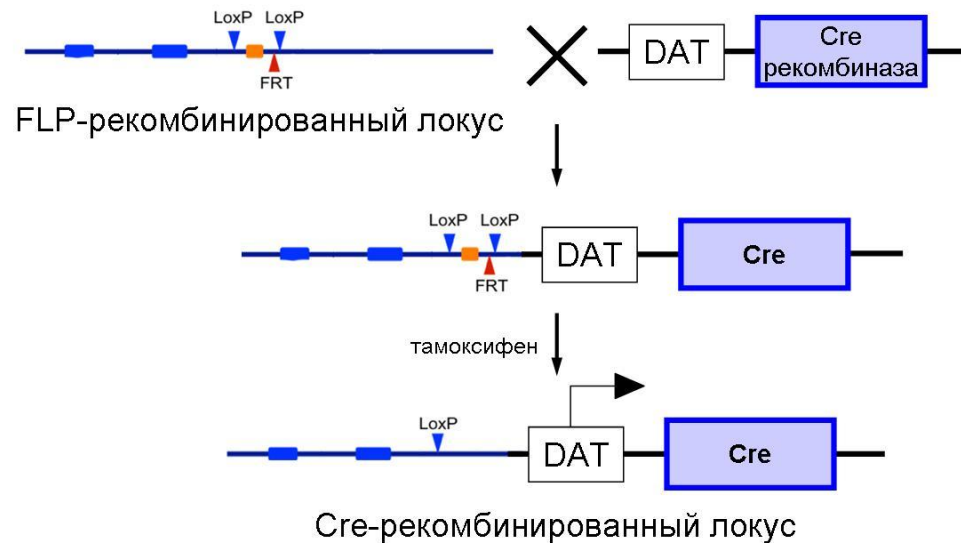
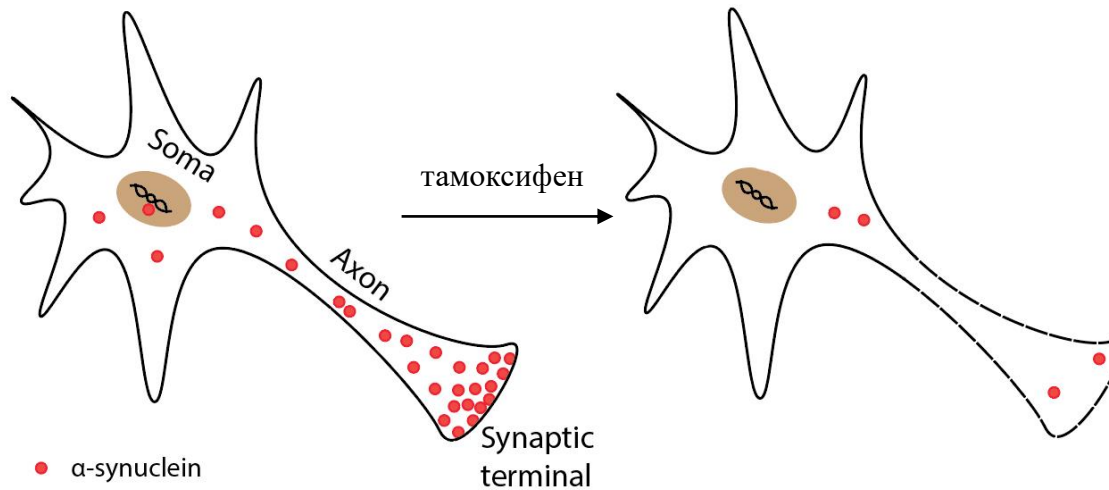


Модель с регулируемой экспрессией
гена альфа-синуклеина – **нокаут**

Трансгенная модель
FUS-протеинопатии: **Δ FUS(1-359)**

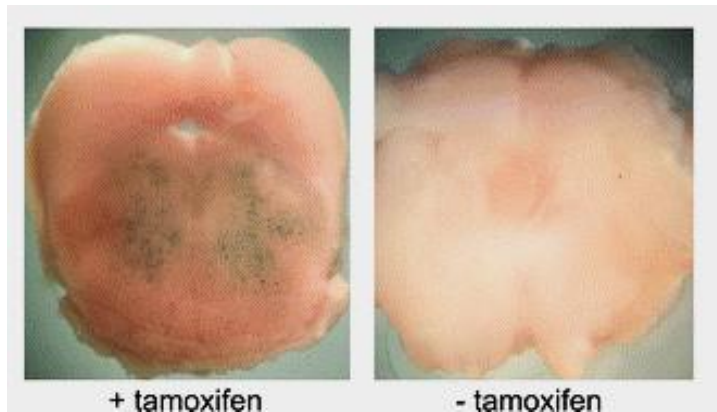
Регулируемый нокаут: моделирование α -синуклеинопатии при паркинсонизме

Истощение пула путём нокаута гена альфа-синуклеина

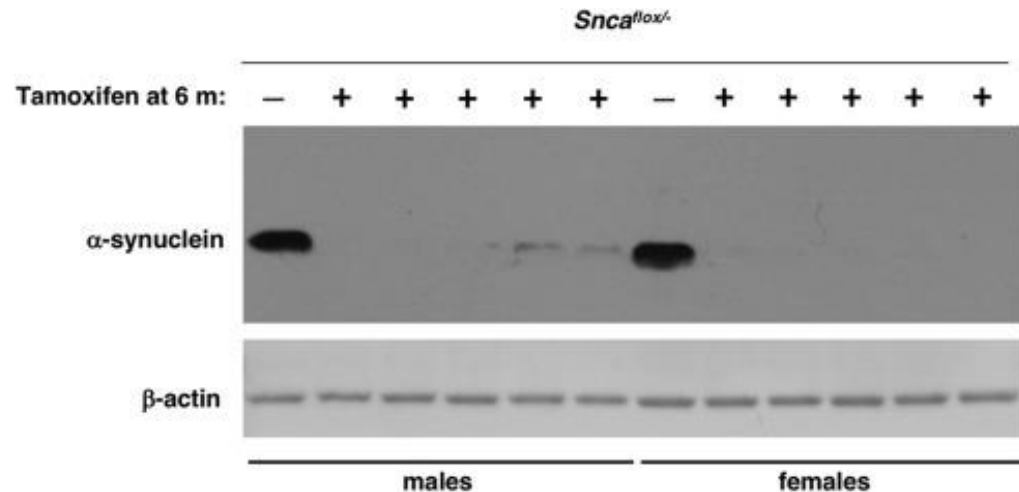


Инактивация экспрессии альфа-синуклеина

Детекция активности бета-галактозидазы с использованием окрашивания X-gal в поперечных срезах ствола мозга.



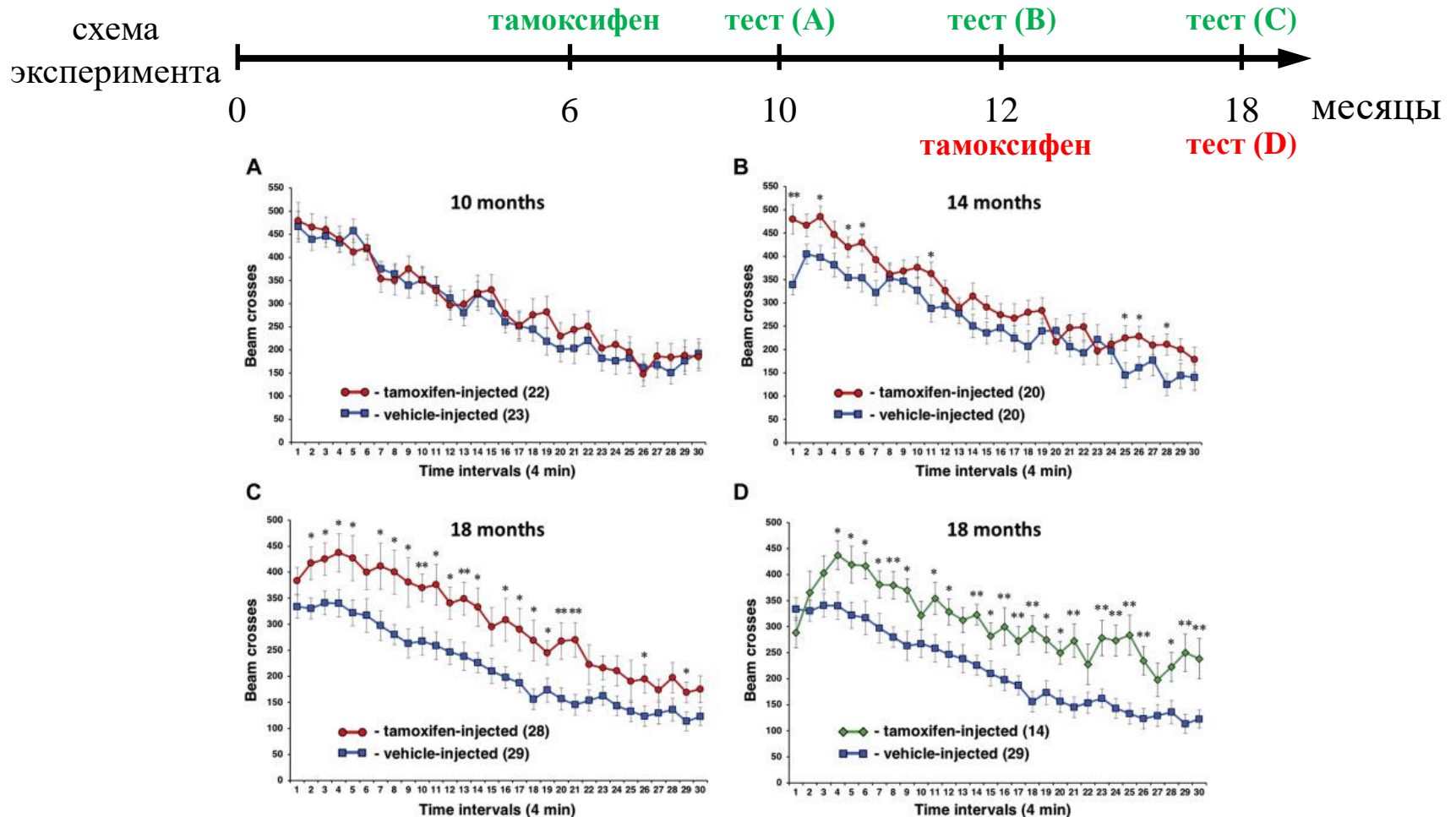
Истощение альфа-синуклеина в полосатом теле после инактивации тамоксифеном



После инъекции тамоксифеном уровень альфа-синуклеина не был обнаружен, тогда как у контрольных животных уровень белка сохранялся на прежнем уровне

Инактивация экспрессии альфа-синуклеина

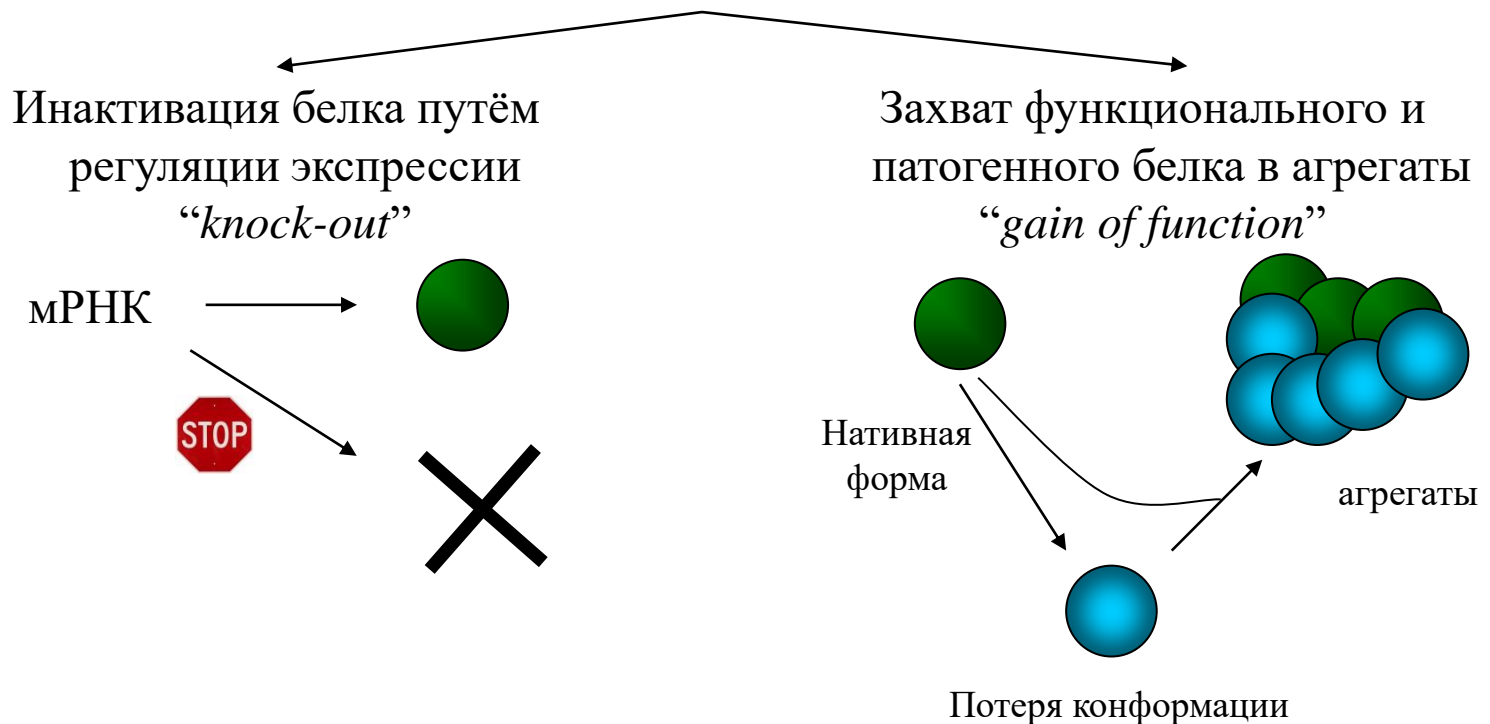
Анализ локомоторных функций у трансгенных животных



Снижение уровня альфа-синуклеина не вызывает долгосрочных неблагоприятных последствий для функциональности взрослых нейронов

Моделирование протеинопатии в трансгенных животных

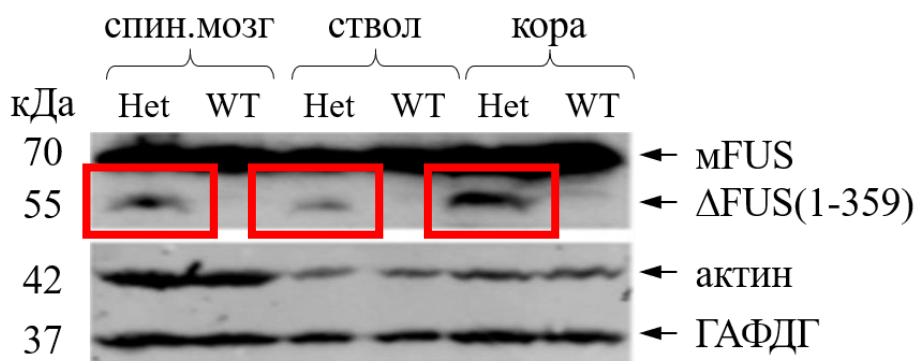
Истощение пула функционального белка



Модель с регулируемой экспрессией
гена альфа-синуклеина – **нокаут**

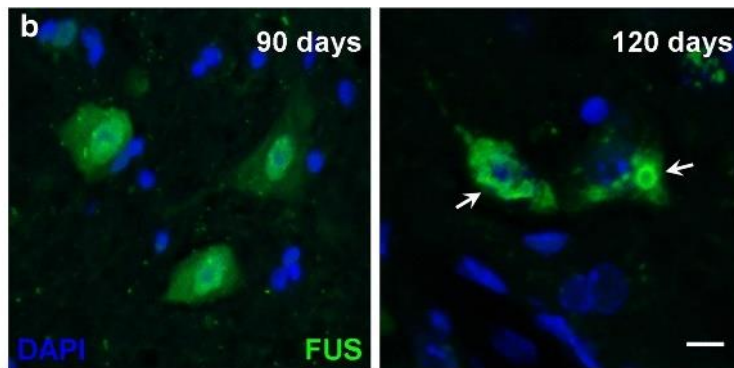
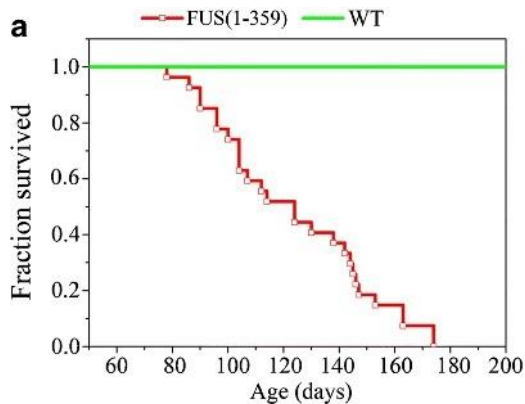
Трансгенная модель
FUS-протеинопатии: **Δ FUS(1-359)**

Моделирование FUS-протеинопатии (БАС)

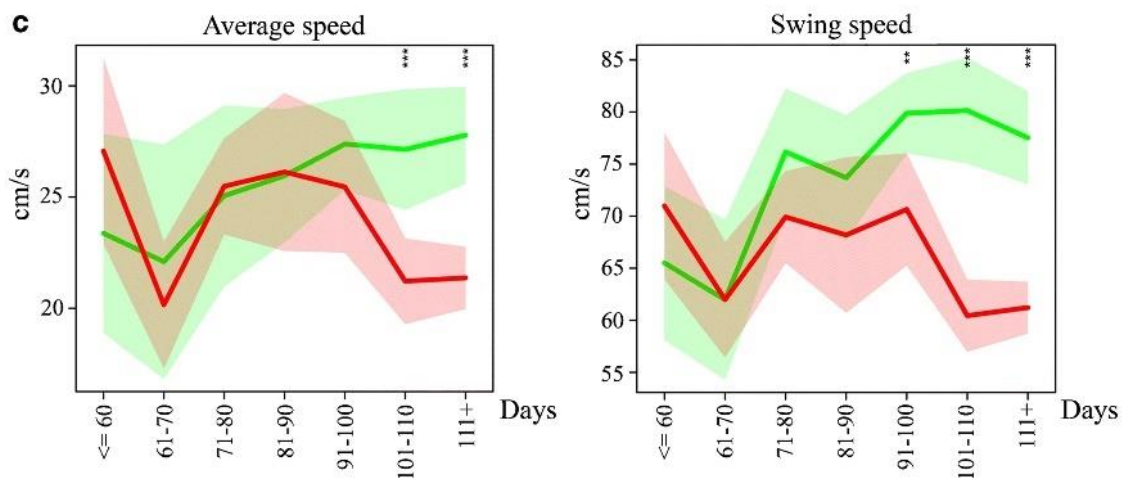


- Прогрессирующие односторонние парезы конечностей с 10-12 недель;
- Потеря мышечной массы у симптоматических животных;
- Анализ белка тканей спинного мозга, ствола и коры головного мозга подтвердил присутствие укороченной aberrантной формы белка FUS человека

Нарушения двигательной активности коррелируют с накоплением FUS-позитивных отложений в спинном мозге



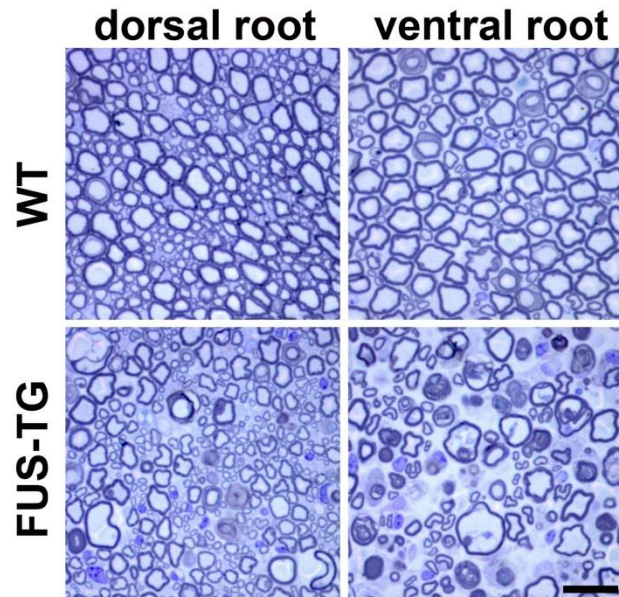
Образование патологических белковых FUS-позитивных включений в спинном мозге происходит с возрастом.



Нарушения двигательной активности трансгенных животных линии Δ FUS(1-359) зафиксированы на установке Noldus CatWalk.

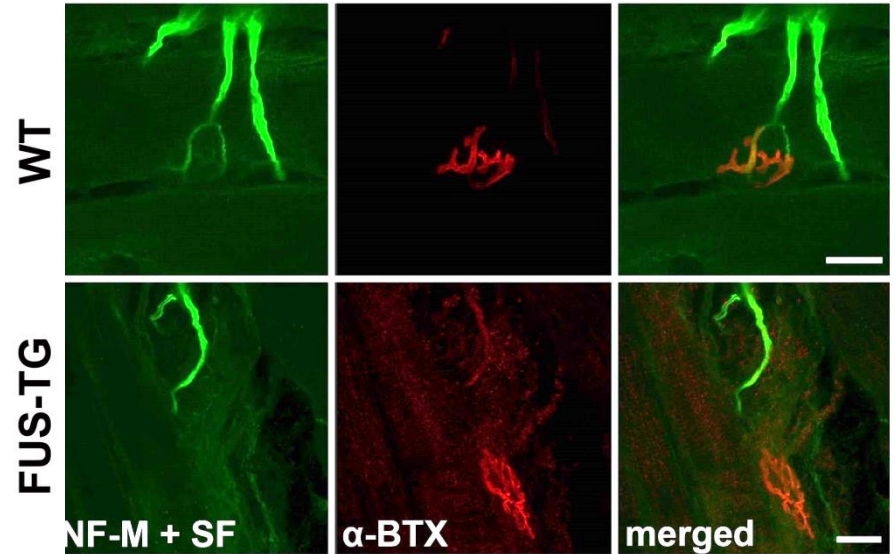
Снижается средняя скорость и скорость передвижения конечностей (swing speed)

Потеря миелинизации и нарушения нервно-мышечных узлов у животных с FUS-протеинопатией (при БАС)



Окрашивание толуидиновым синим, шкала 30 μm .

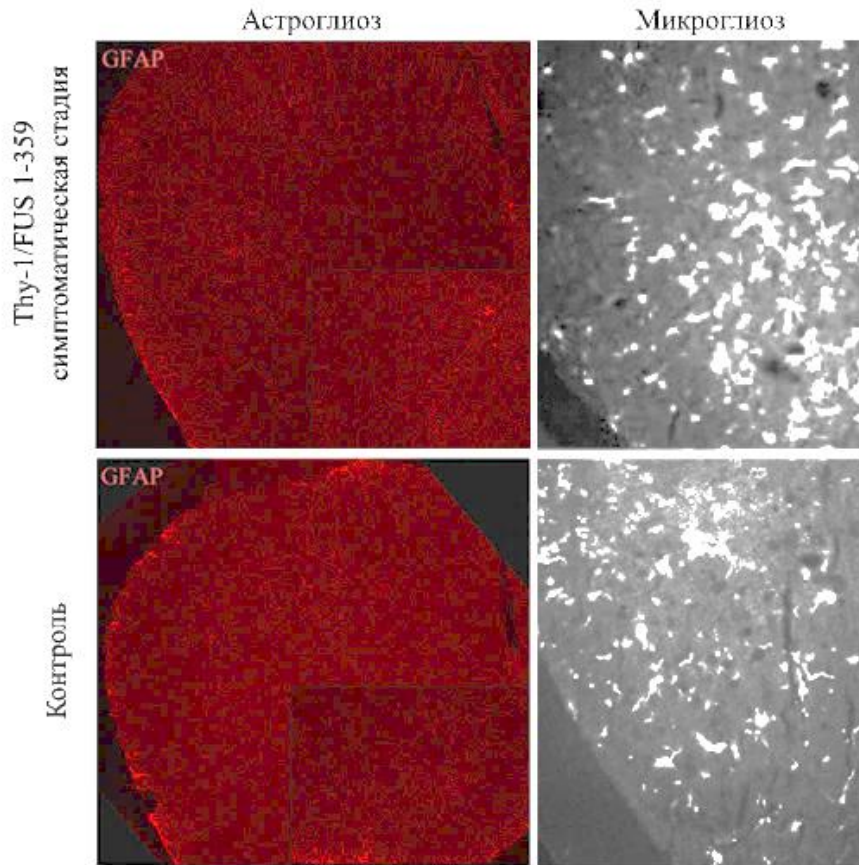
Потеря миелинизации у трансгенных животных в спинном мозге



Окрашивание концевой пластинки α -бунгаротоксином (α -BTX), аксоны и пресинапсы окрашены антителами к нейрофиламенту-M (NF-M) и синаптофизину (SF).

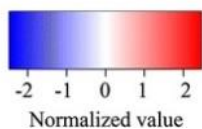
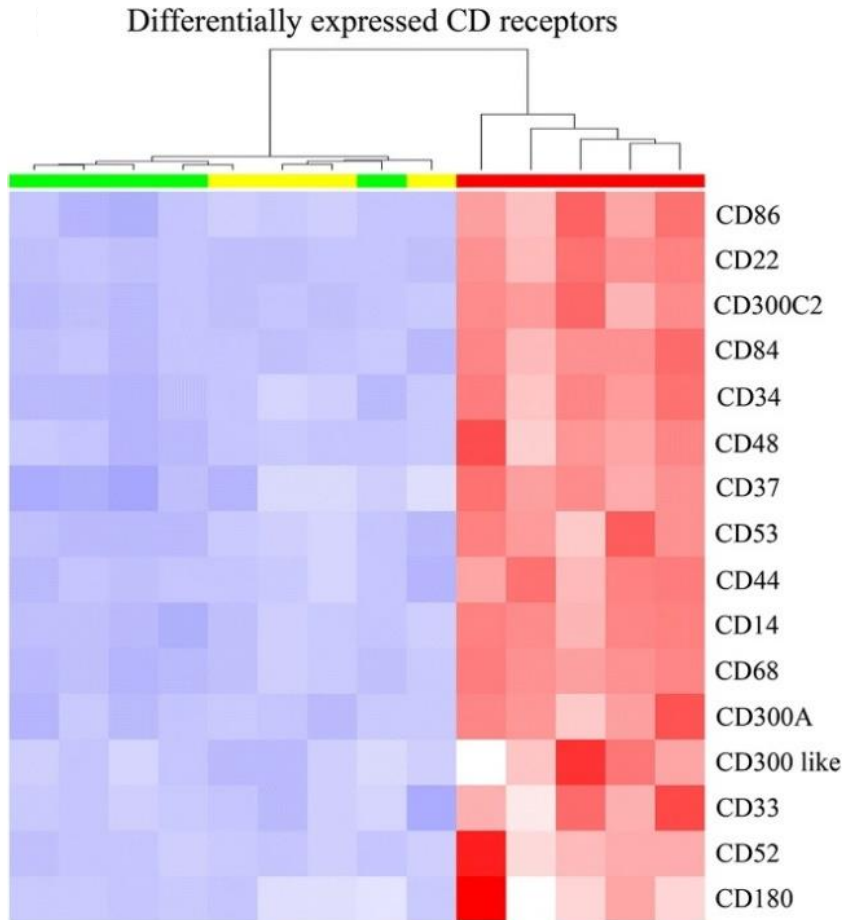
Морфологические признаки нарушения нервно-мышечных узлов у трансгенных животных в икроножных мышцах

Нейровоспалительная реакция в спинном мозге на поздней симптоматической стадии FUS-протеинопатии (БАС)

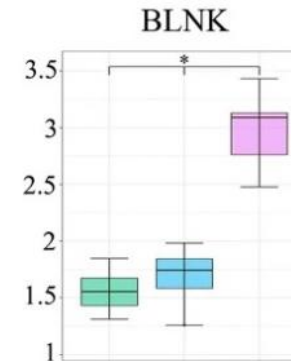
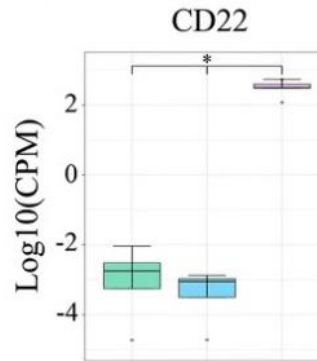


- Использование укороченной изоформы белка FUS приводит к появлению реактивного астроглиоза и признакам микроглиоза в тканях спинного мозга трансгенных животных.
- Прогрессия протеинопатии сопровождается развитием нейровоспалительной реакции и гибелью мотонейронов, которая вносит свой вклад в патогенез модельного заболевания.

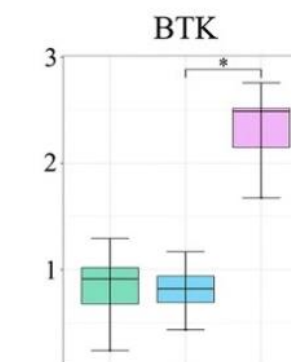
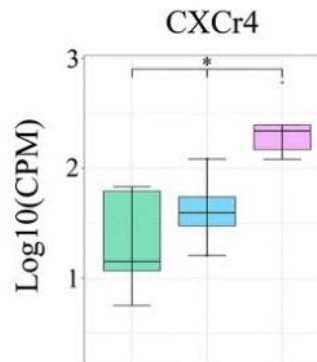
Повышенная экспрессия генов CD-рецепторов у животных с FUS-протеинопатией (БАС)



60 days
90 days (Pre-symptomatic)
120 days (Symptomatic)



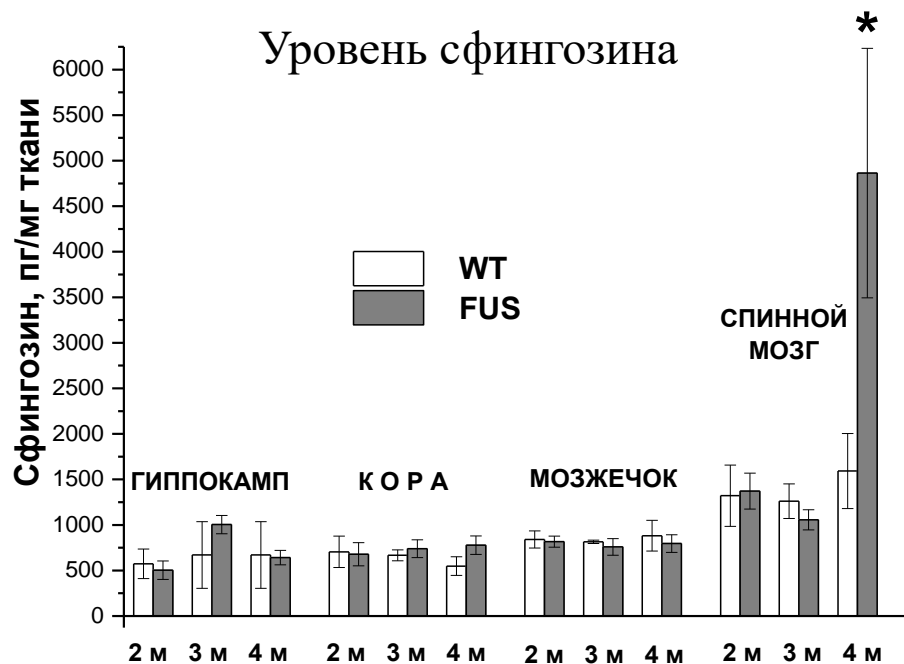
Group
FUS(1-359):
60 days
90 days
120 days



Group
FUS(1-359):
60 days
90 days
120 days

CD22 – маркер активации В-клеток
CXCr4 – рецептор хемокина CXCL12
BLNK – белок-линкер В-клеток
BTK – фактор созревания В-клеток

Увеличение содержания сфингозина в спинном мозге у животных с FUS-протеинопатией (БАС)

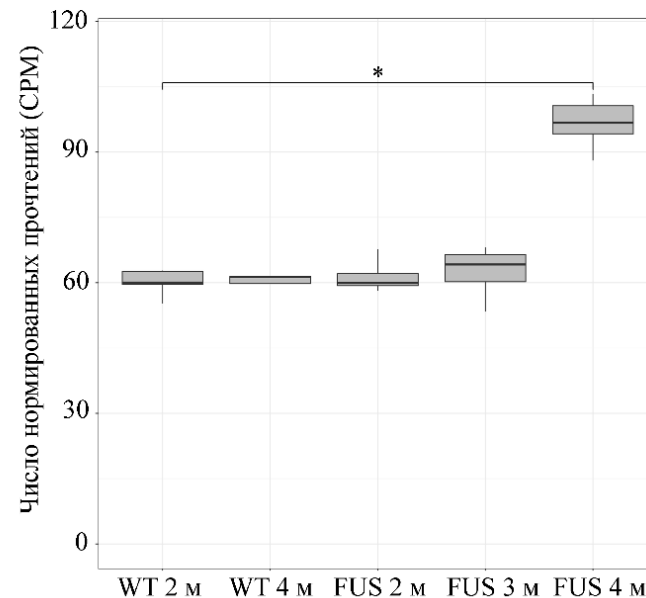


ASAH1 гидролизует C10-C14-церамиды с насыщенными связями или C18:1-, C18:2-церамиды с ненасыщенными связями в ЛИЗОСОМАХ

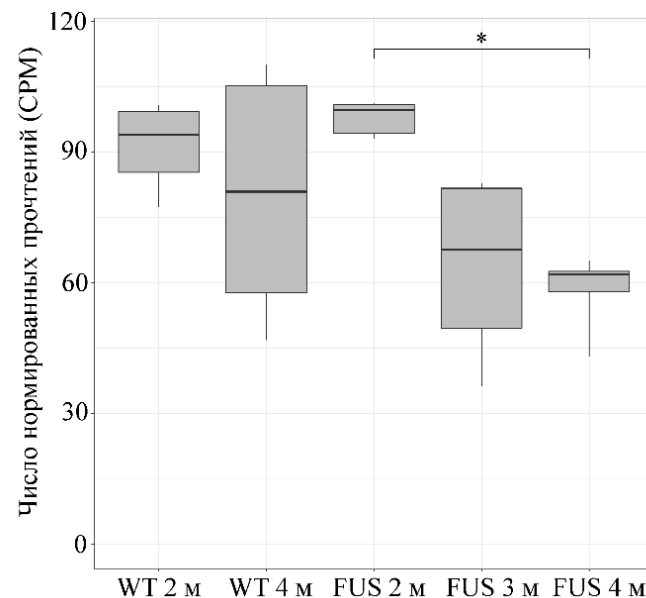
ASAH2 гидролизует C16-C22- или C26-C36-церамиды на ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

Сфингозин генерируется лизосомальной церамидазой – признак «лизосомального» апоптоза

Asah1

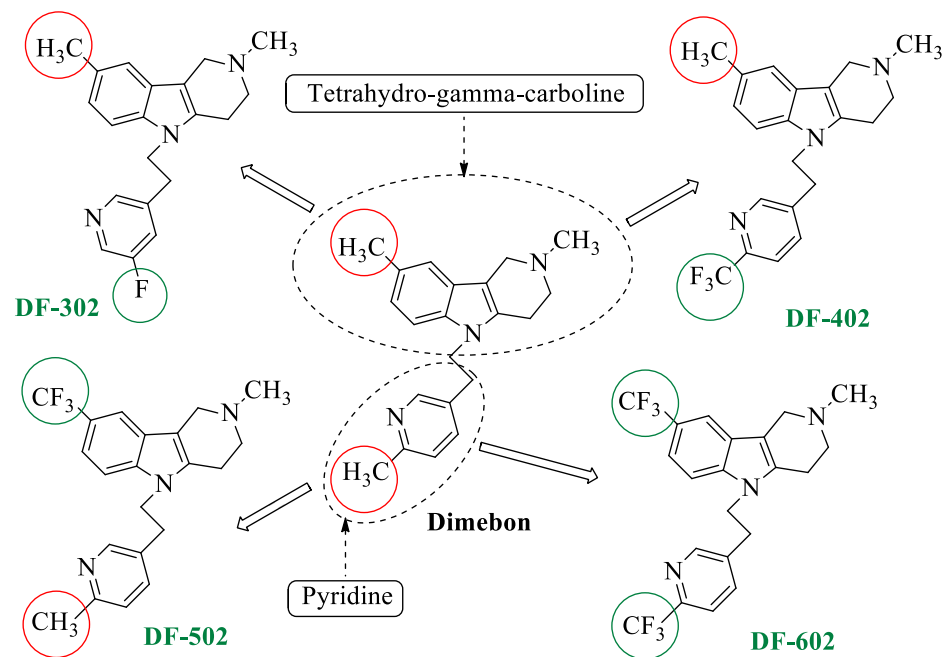


Asah2



Задача: Использовать разработанные тест-системы для отбора соединений способных влиять на протеинопатию

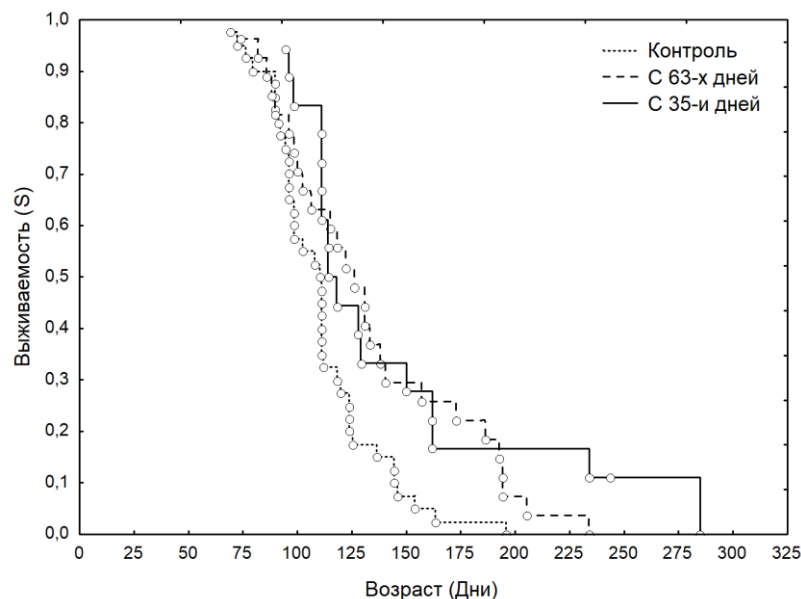
- Ustyugov A, Shevtsova E, Bachurin S. Novel Sites of Neuroprotective Action of Dimebon (Latrepiridine). Mol Neurobiol. 2015 Oct;52(2):970-8.
- OM Peters, N Connor-Robson, VB Sokolov, AYu Aksinenko, MS Kukharsky, SO Bachurin, N. Ninkina, VL Buchman. Chronic administration of Dimebon ameliorates pathology in TauP301S transgenic mice. J Alzheimers Dis. 2013;33(4):1041-9.
- SO Bachurin, TA Shelkovnikova, AA Ustyugov, O Peters, I Khritankova, MA Afanasieva, TV Tarasova, II Alentov, VL Buchman, NN Ninkina. Dimebon slows progression of proteinopathy in γ -synuclein transgenic mice. Neurotox Res. 2012 Jul;22(1):33-42.
- Устюгов АА, Шелковникова ТА, Кохан ВС, Хританкова ИВ, Петерс О, Бухман ВЛ, Бачурин СО, Нинкина НН. (2011). «Димебон» снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в detergent-нерастворимых фракциях *in vivo*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 152(12), р. 675-678.
- M. Yamashita, T. Nonaka, T. Arai, F. Kametani, VL Buchman, N Ninkina, SO Bachurin, H Akiyama, M. Goedert, M. Hasegawa. Methylene blue and Dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. FEBS Lett. 2009 Jul 21;583(14):2419-24.



Известия Академии наук. Серия химическая, 2020, 4. с. 781-786

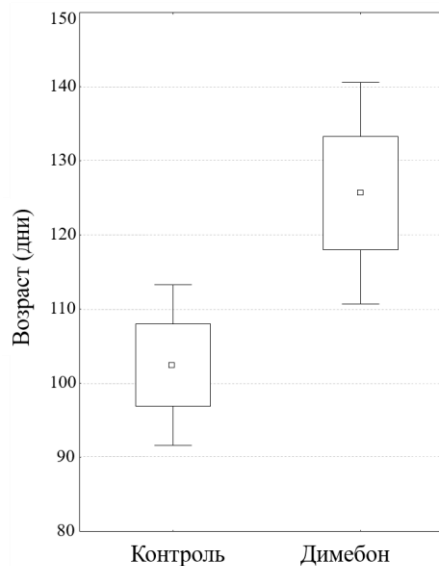
Многократное введение Димебона отдаляет дебют заболевания в модели FUS-протеинопатии (БАС)

Сравнение кривых выживаемости



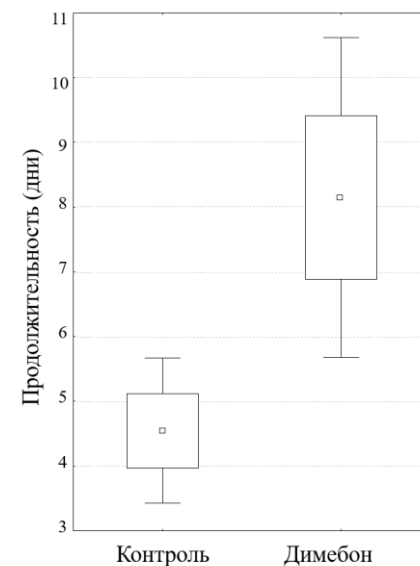
Димебон в дозе **11 мг/кг** с **возраста 35** (n=18) и **63 дней** (n=27), контрольная группа (n=40).

Средний возраст



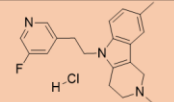
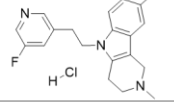
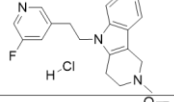
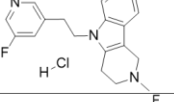
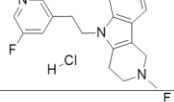
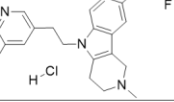
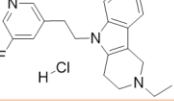
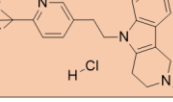
Манифестация клинических симптомов у трансгенных животных, получавших Димебон с **возраста 63 дня** (n=27) и контрольной группы (n=40)

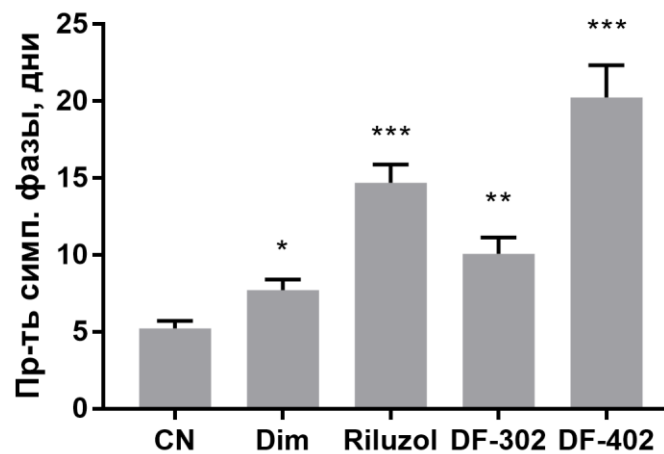
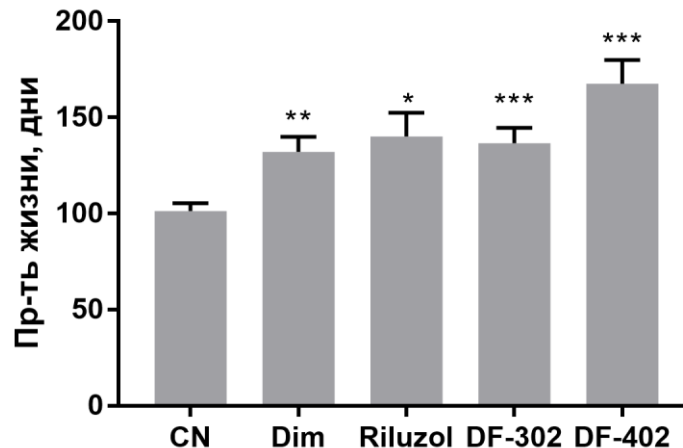
Продолжительность



Эффективность препарата напрямую зависит от возраста начала терапии:
чем раньше начало ведения, тем сильнее эффект

Влияния фторированных производных гамма-карболинов на развитие FUS-протеинопатии в клеточных и животных моделях БАС

ID	Структурная формула	IC ₅₀ , мкМ	Степень агрегации, % от контроля	Коэф. достоверности, <i>p</i>
DF-302		109.2 ± 8	58,8	**
DF-303		92.9	75,7	non
DF-305		70.1 ± 19.9	77	non
DF-306		>150	95	non
DF-308		136 ± 4,8	77,1	***
DF-310		86.4 ± 2.7	82,5	non
DF-312		41.3 ± 12.9	61,9	*
DF-402		60.5 ± 1.5	24	**



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.

Стратегия поиска новых препаратов направленных на коррекцию протеинопатии при нейродегенеративных заболеваниях

1. Отбор и определение перспективных белков-мишеней, участвующих в патогенезе.
2. Создание клеточных и животных моделей с заданными патогенетическими свойствами.
3. Характеристика созданных моделей протеинопатий с последующей валидацией.
4. Использование разработанных моделей для изучения эффективности и отбора эффективных нейропротекторных препаратов.

Спасибо за внимание



All models are wrong, but some are
useful.

— *George E. P. Box* —

“One of the great statistical minds of the 20th century”