



St Petersburg  
University



КОНФЕРЕНЦИЯ GLP-PLANET IV  
СОВМЕСТНО С АССОЦИАЦИЕЙ  
СПЕЦИАЛИСТОВ ПО ЛАБОРАТОРНЫМ  
ЖИВОТНЫМ RUS-LASA

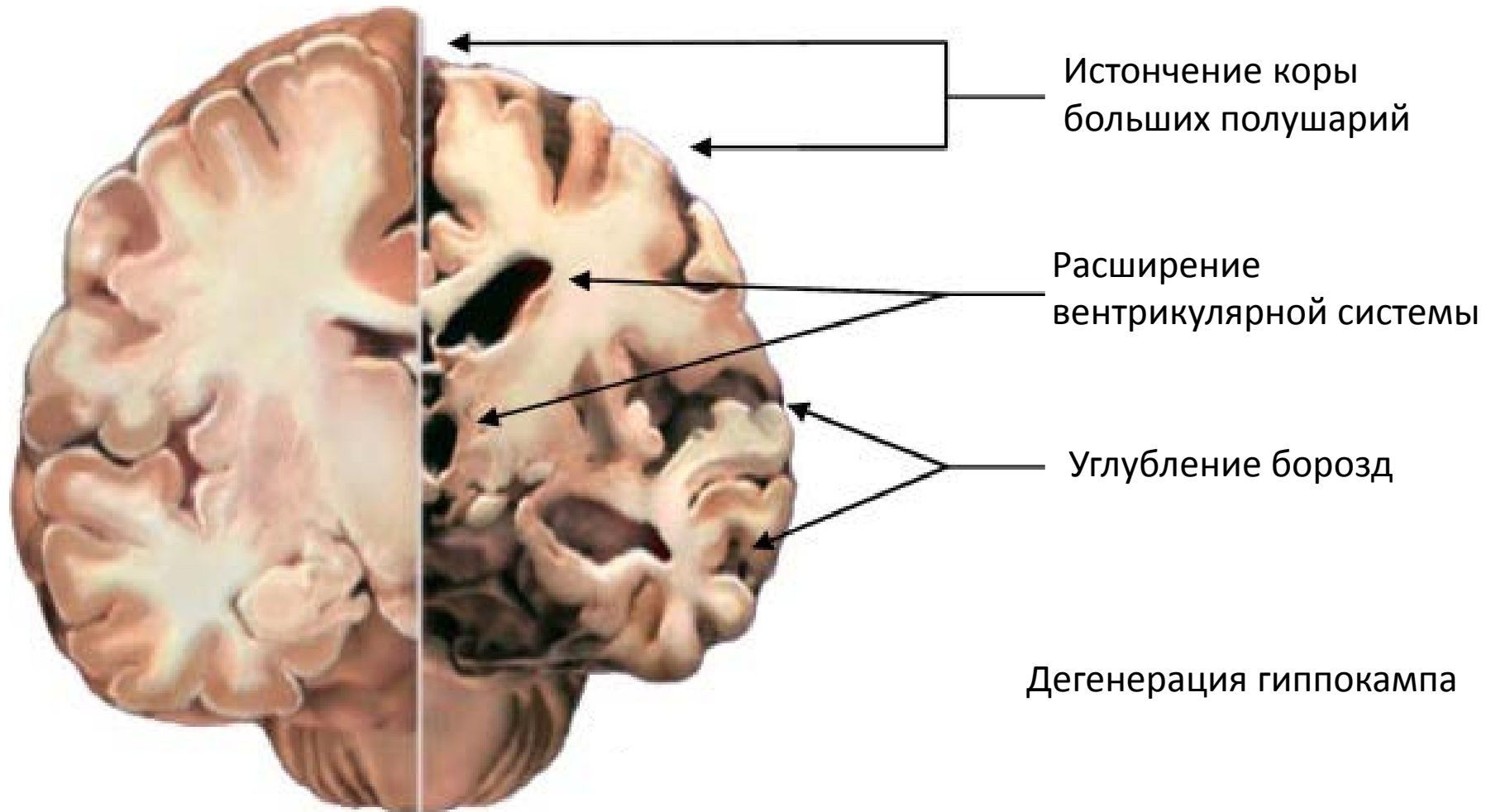


# «Мышинные модели болезни Альцгеймера: история и современность»

Сопова Юлия Викторовна

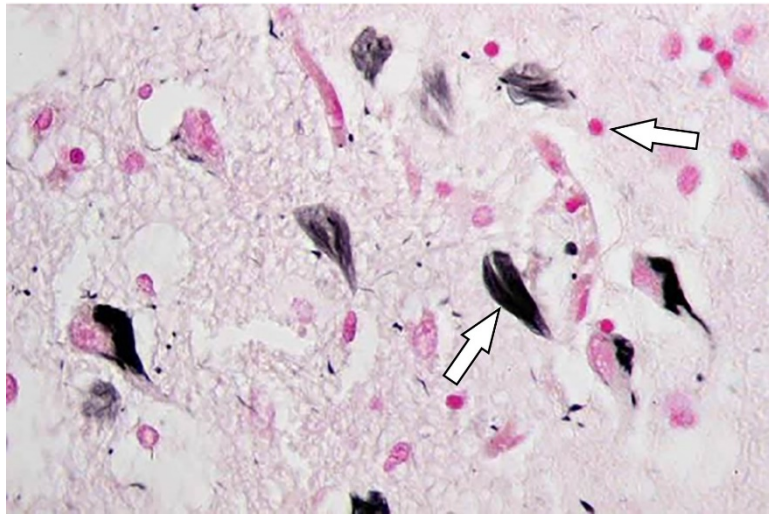
Центр трансгеноза и редактирования генома ИТБМ СПбГУ

# БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА ПРИВОДИТ К ОБШИРНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ



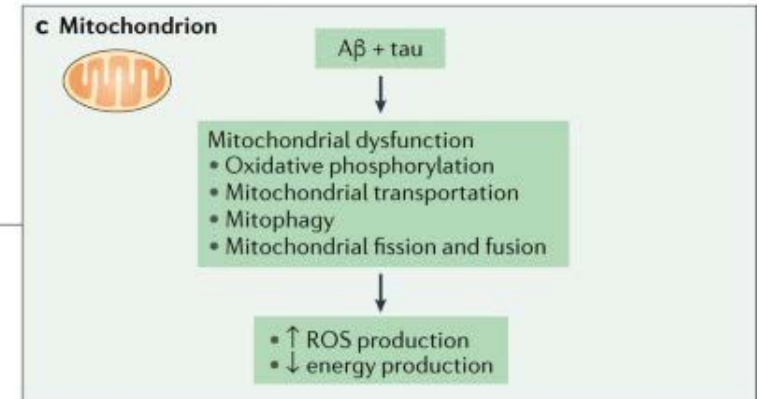
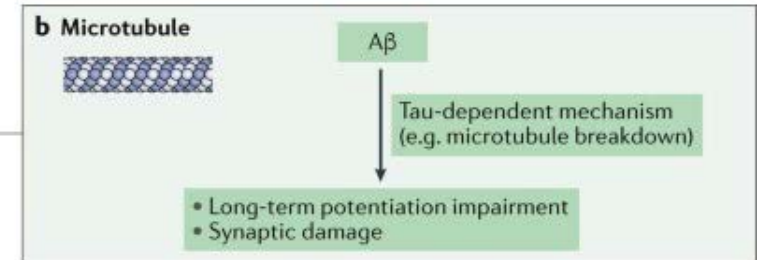
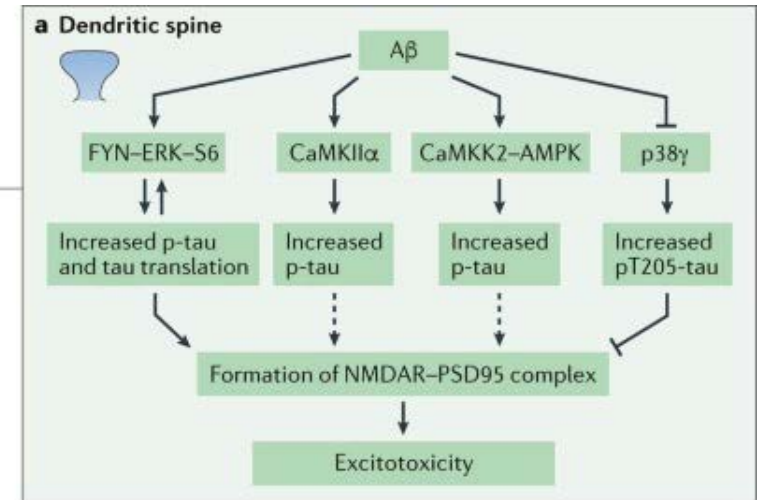
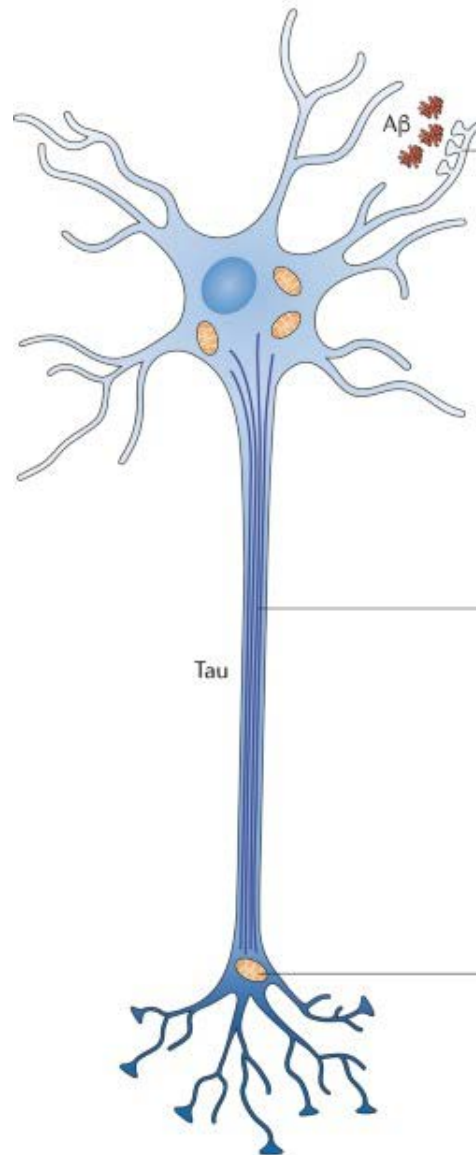
Срез мозга  
здорового человека    больного

# АМИЛОИДНЫЕ БЛЯШКИ И НЕЙРОФИБРИЛЛЯРНЫЕ КЛУБКИ - ТИПИЧНЫЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ В МОЗГЕ БОЛЬНЫХ



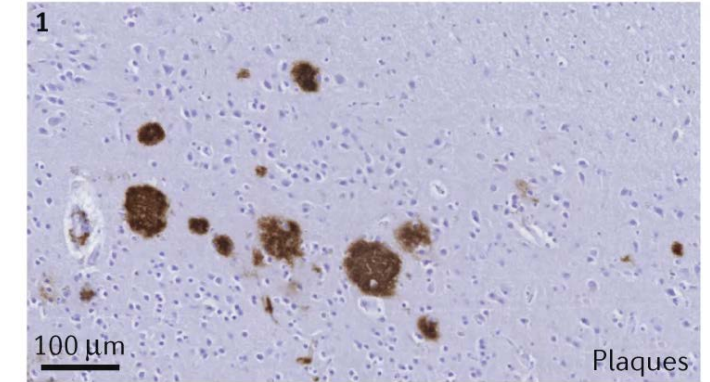
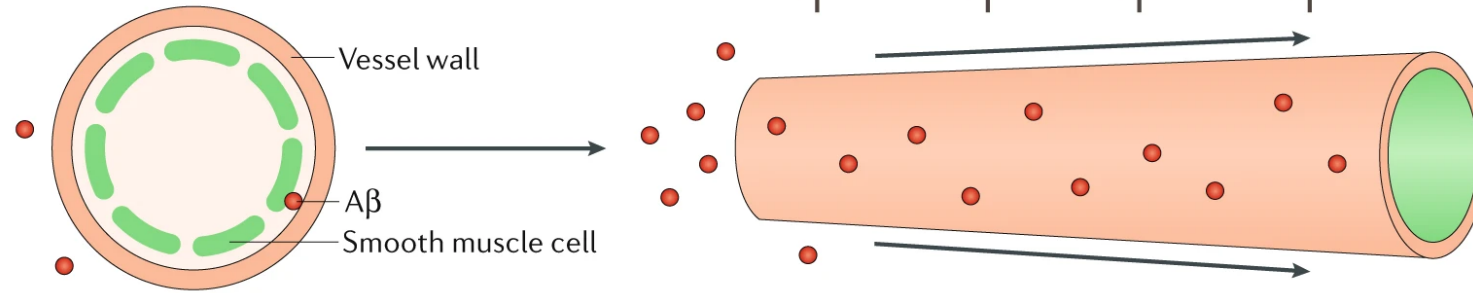
Амилоидные бляшки (розовые) –  
внеклеточные агрегаты  
бета-амилоидного пептида

Нейрофибриллярные клубки (черные) –  
внутриклеточные фибриллы  
гиперфосфорилированного белка тау

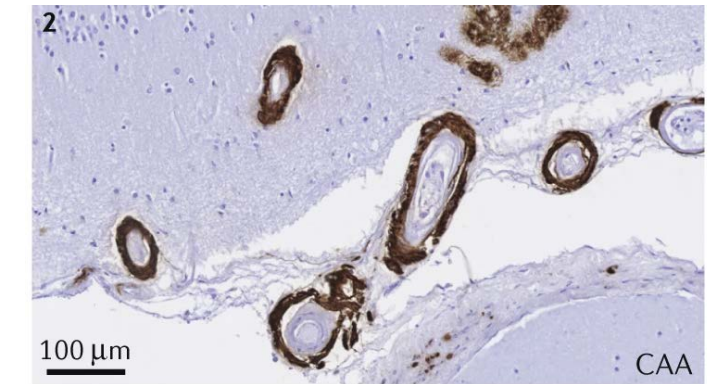
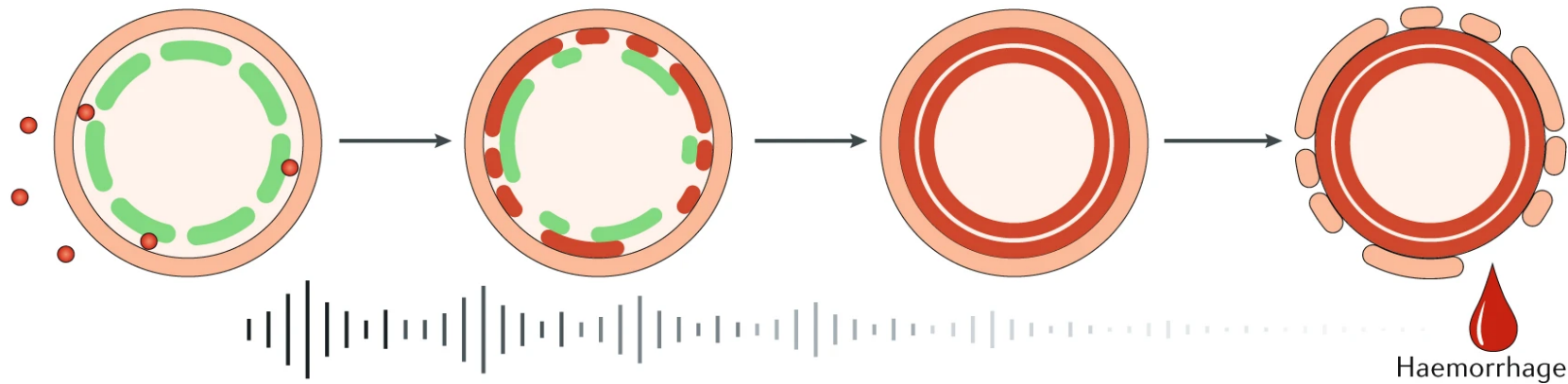


# АМИЛОИДНАЯ АНГИОПАТИЯ – ЕЩЕ ОДНА ПРИЧИНА НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

## Healthy perivascular A $\beta$ clearance

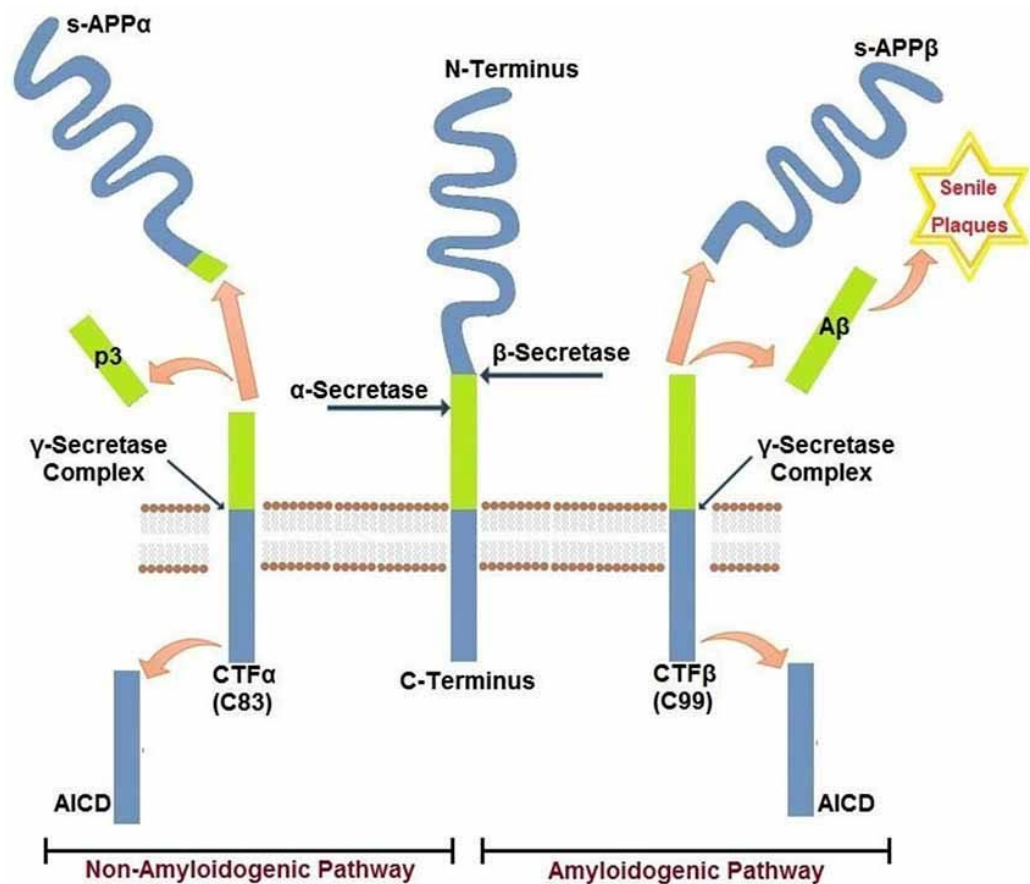


## Impaired perivascular A $\beta$ clearance in CAA



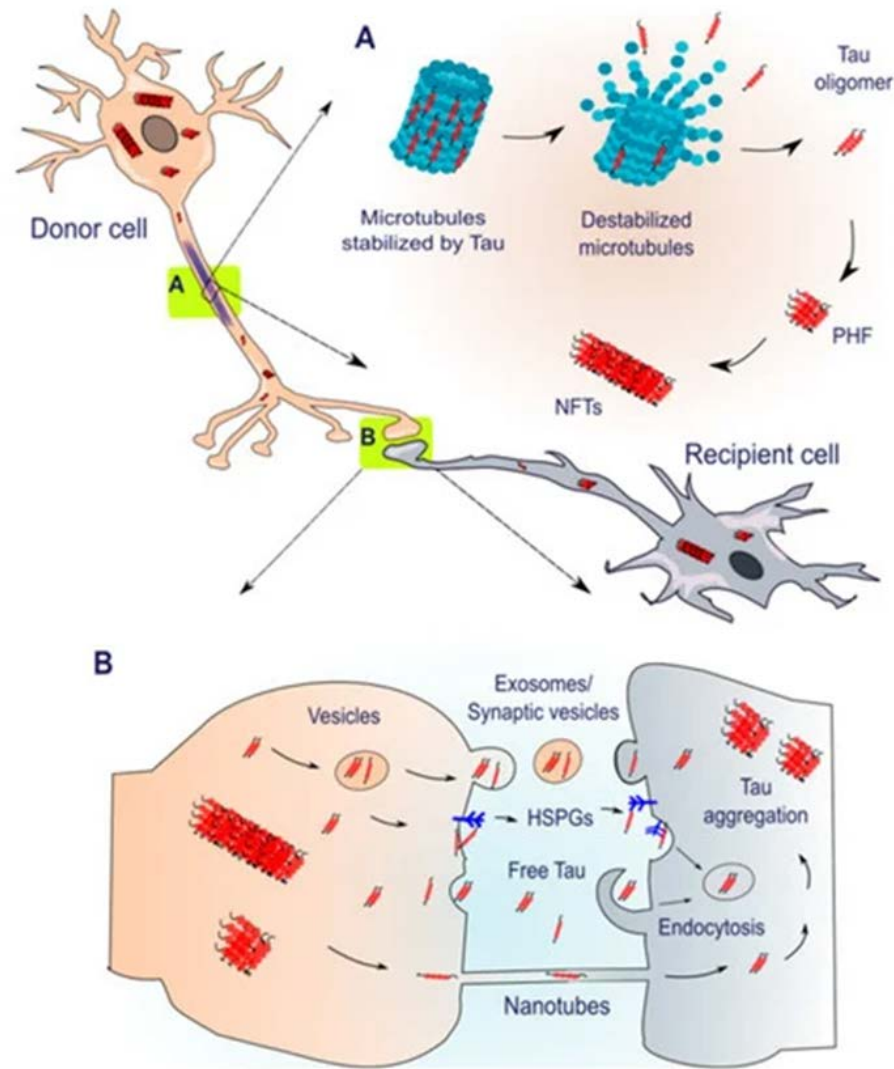
Образование агрегатов бета-амилоидного пептида в периваскулярном пространстве приводит к развитию ишемии и кровотечениям

# КЛЮЧЕВЫЕ КОМПОНЕНТЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА – БЕТА-АМИЛОИДНЫЙ ПЕПТИД И ГИПЕРФОСФОРИРОВАННЫЙ БЕЛОК ТАУ



Ген *APP* кодирует белок-предшественник бета-амилоидного пептида  
 Гены *PSEN1* и *PSEN2* кодируют компоненты комплекса  $\gamma$ -секретазы

<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00065>



Ген *MAPT* кодирует белок тау

<https://doi.org/10.3390/brainsci10110858>

## МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ *APP* и *PSEN1/2*

Model mouse	Gene (Mutation)	Promoter	A $\beta$ pathology	Tau pathology	Neuronal loss	Cognitive impairment
PDAPP	<i>APP</i> (V717F)	PDGF- $\beta$ promoter	+ (6 mo~)	-	-	+ (3 mo~)
Tg2576	<i>APP</i> (KM670/671NL)	hamster prion promoter	+ (11 mo~)	-	-	+ (6 mo~)
APP23	<i>APP</i> (KM670/671NL)	Thy1 promoter	+ (6 mo~)	-	+ (12 mo~)	+ (3 mo~)
J20	<i>APP</i> (KM670/671NL, V717F)	PDGF- $\beta$ promoter	+ (8 mo~)	-	+ (3 mo~)	+ (4 mo~)
TgCRND8	<i>APP</i> (KM670/671NL, V717F)	hamster prion promoter	+ (3 mo~)	-	+ (6 mo~)	+ (3 mo~)
PS2APP	<i>APP</i> (KM670/671NL) <i>PSEN2</i> (N141I)	<i>APP</i> : Thy1.2 promoter <i>PSEN2</i> : mouse prion promoter	+ (9 mo~)	-	unknown	+ (8 mo~)
APP <sup>swe</sup> /PSEN1 <sup>dE9</sup> (APP/PS1)	<i>APP</i> (KM670/671NL) <i>PSEN1</i> (delta9)	mouse prion promoter	+ (6 mo~)	-	+ (8 mo~)	+ (12 mo~)
Tg-ArcSwe	<i>APP</i> (KM670/671NL, E693G)	Thy1 promoter	+ (5 mo~)	-	-	+ (4 mo~)
5xFAD	<i>APP</i> (KM670/671NL, I716V, V717I) <i>PSEN1</i> (M146L, L286V)	Thy1 promoter	+ (2 mo~)	-	+ (6 mo~)	+ (4 mo~)
A7	<i>APP</i> (KM670/671NL, T714I)	Thy1.2 promoter	+ (9 mo~)	unknown	unknown	unknown
NL-G-F	humanized A $\beta$ sequence (KM670/671NL, I716F, E693G)	Endogenous promoter (knock-in model)	+ (2 mo~)	-	-	+ (6 mo~)

K670N, M671L- шведские мутации, I716V – флоридская мутация, V717I – лондонская мутация в белке APP, ассоциированные с семейными формами болезни Альцгеймера

M146L и L286V - мутации в пресенилине, ассоциированные с ранним началом болезни Альцгеймера

## АНТИТЕЛА, ПРОТЕСТИРОВАННЫЕ НА МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ APP

Леканемаб – антитело к протофибриллам, гуманизированная изоформа мышинового антитела mAb158. Использование mAb158 у старых мышей Tg-ArcSwe уменьшало количество протофибрилл A $\beta$  без изменения количества агрегатов A $\beta$  (Tucker et al., 2015).

Адуканумаб – человеческое моноклональное антитело к агрегированным формам A $\beta$ , не связывающее мономеры A $\beta$ . Адуканумаб связывался с бляшками A $\beta$  в мозге и дозозависимо уменьшал количество A $\beta$  у старых мышей линий Tg2576 и APP23 (Sevigny et al., 2016; Uhlmann et al., 2020).



Отек мозга и/или мозговое кровоотечение в качестве побочного эффекта были зафиксированы для обоих препаратов, ранее одобренных FDA



## МЫШИНЫЕ МОДЕЛИ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *MAPT*

Model mouse	Gene (Mutation)	Promoter	A $\beta$ pathology	Tau pathology	Neuronal loss	Cognitive impairment
JNPL3	<i>MAPT</i> 0N4R (P301L)	mouse prion promoter	-	+(5 mo~)	+(5 mo~)	unknown
PS19	<i>MAPT</i> 1N4R (P301S)	mouse prion promoter	-	+(6 mo~)	+(9 mo~)	+(6 mo~)
rTg4510	<i>MAPT</i> 0N4R (P301L)	CaMKII promoter	-	+(4 mo~)	+(6 mo~)	+(6 mo~)
3xTg	<i>APP</i> (KM670/671NL) <i>MAPT</i> 0N4R (P301L) <i>Psen1</i> (M146V knock-in)	Thy1.2 promoter	+(6 mo~)	+(12 mo~)	unknown	+(4 mo~)
MAPT knock-in	<i>MAPT</i> gene	Endogenous promoter (knock-in model)	-	-	-	-
NL-G-F/MAPT double knock-in	humanized A $\beta$ sequence (KM670/671NL, I716F, E693G) <i>MAPT</i> gene	Endogenous promoter (knock-in model)	+	-	-	unknown

Мутация P301L нарушает связывание белка тау с микротрубочками и повышает частоту образования филаментов тау *in vitro*.

У человека с данной доминантной мутацией ассоциировано развитие лобно-височной деменции

Попытки разработать терапевтические анти-тау антитела оказались неудачными.



## СРАВНЕНИЕ МОДЕЛЕЙ 3xTg И 5xFAD

**5xFAD** – Мыши, сверхпродуцирующие мутантный белок APP человека, несущий мутации в 4-х положениях, соответствующих разным формам наследственной болезни Альцгеймера (**K670N**, **M671L**- шведские мутации, **I716V** – флоридская мутация, **V717I** – лондонская мутация) и мутантный человеческий пресенилин 1 (PS1), несущий мутации в двух положениях (**M146L** и **L286V**). Оба трансгена находятся под контролем промотора *Thy1*, что обеспечивает сверхпродукцию белков в мозге

### PHENOTYPE CHARACTERIZATION

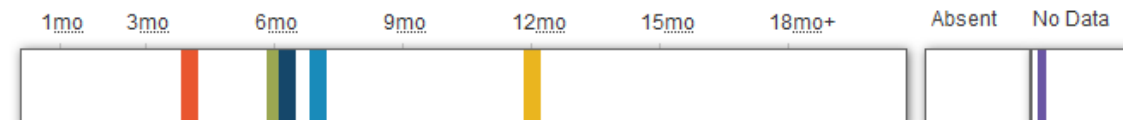


Plaques	Extracellular amyloid deposition begins around 2 months, first in the subiculum and layer V of the cortex. A $\beta$ 42 also accumulates intraneuronally in an aggregated form within the soma and neurites starting at 1.5 months.
Tangles	Absent.
Neuronal Loss	Neuron loss in cortical layer V and subiculum.
Gliosis	Gliosis begins at 2 months.
Synaptic Loss	Levels of the presynaptic marker synaptophysin begin to decline by 4 months; levels of syntaxin, another presynaptic marker, and PSD-95, a postsynaptic marker, decline by 9 months
Changes in LTP/LTD	Basal synaptic transmission and LTP in hippocampal area CA1 begin to deteriorate between 4 and 6 months
Cognitive Impairment	Impaired spatial working memory in the Y-maze test and impaired remote memory stabilization in a contextual-fear-conditioning test by 4 to 5 months of age.

<https://www.alzforum.org/research-models/5xfad-b6sjl>

**3xTg** - Мыши, сверхпродуцирующие мутантный белок APP человека, несущий мутации в 2-х положениях, соответствующих формам наследственной болезни Альцгеймера (**K670N**, **M671L**- шведские мутации), мутантный человеческий пресенилин 1 (PS1), несущий мутацию **M146L**, и мутантный белок тау (MAPT) с мутацией **P301L**

### PHENOTYPE CHARACTERIZATION



Plaques	Extracellular A $\beta$ deposits by 6 months in the frontal cortex, predominantly layers 4 and 5 and progress with age (Oddo et al., 2003).
Tangles	By 12 months extensive tau immunoreactivity in CA1 neurons of the hippocampus, particularly pyramidal neurons, later in the cortex. No tau pathology at 6 months (Oddo et al., 2003).
Neuronal Loss	Unknown.
Gliosis	Increased density of GFAP immunoreactive astrocytes and IBA-1 immunoreactive microglia compared with wild-type mice at 7 months (Caruso et al., 2013). Development of gliosis may occur earlier.
Changes in LTP/LTD	By 6 months decreased LTP compared with wild type controls. Impairment in basal synaptic transmission. No change at 1 month of age (Oddo et al., 2003).
Cognitive Impairment	Cognitive impairment manifests at 4 months as a deficit in long-term retention and correlates with the accumulation of intraneuronal A $\beta$ in the hippocampus and amygdala, but plaques and tangles are not yet apparent (Billings et al., 2005).

<https://www.alzforum.org/research-models/3xtg>

## ПРИЧИНЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

“Гипотеза амилоидного каскада”, (Hardy and Higgins, 1992; Hardy and Selkoe, 2002)

Ключевой игрок – бета-амилоидный пептид, агрегация которого в мозге приводит к образованию бляшек. Семейные формы болезни Альцгеймера связаны с мутациями в генах *APP*, *PS1* and *PS2* (Reznik-Wolf et al., 1998). Семейные формы составляют менее 5% всех случаев болезни Альцгеймера, симптомы развиваются задолго до 65 лет, болезнь протекает агрессивно

“Сосудистая гипотеза” (de la Torre and Mussivand, 1993)

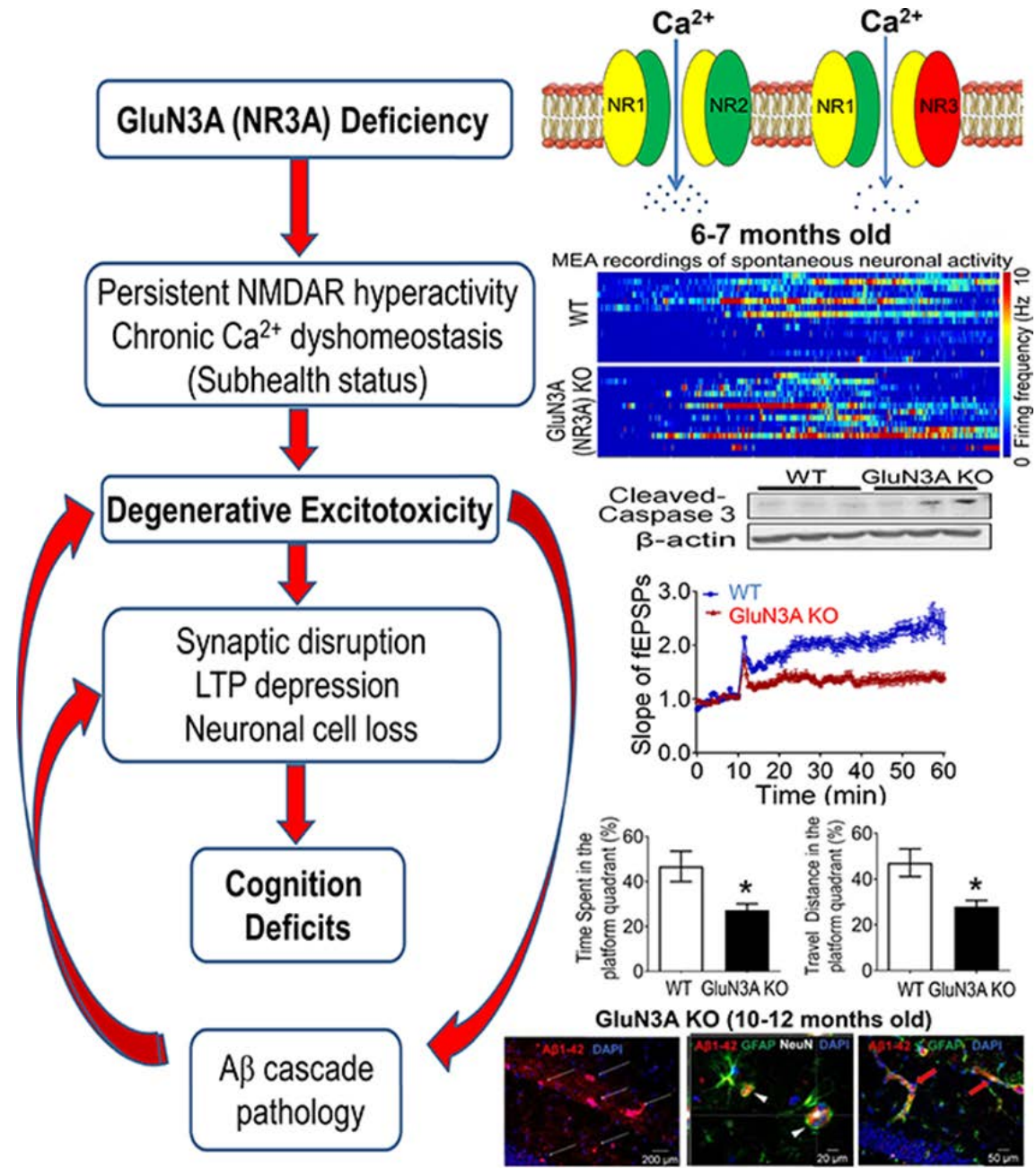
Цереброваскулярная дисфункция вследствие накопления бета-амилоидного пептида в периваскулярном пространстве и последующее развитие очагов воспаления, что приводит к нейродегенерации (Giri et al., 2000; Li et al., 2009) .

«Кальциевая гипотеза» (Demuro et al., 2005)

Нарушение гомеостаза кальция в нейронах с возрастом приводит к окислительному стрессу и повышает токсичность олигомеров бета-амилоидного пептида. Мутации в гене *PS2* также нарушают внутриклеточный баланс кальция (Sushma and Mondal, 2019).

Холинэргическая гипотеза, нарушение метаболизма глюкозы, измерения микробиома....

# РЕГУЛЯТОРНАЯ СУБЪЕДИНИЦА GLUN3A РЕЦЕПТОРА NMDA - НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛЕЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА ?



# СОЗДАНИЕ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ С НОКАУТОМ ГЕНА *GRIN3A* С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9

подбор sgRNA к гену *GRIN3A*



микроинъекция смеси sgRNA/Cas9  
в зиготы мышей

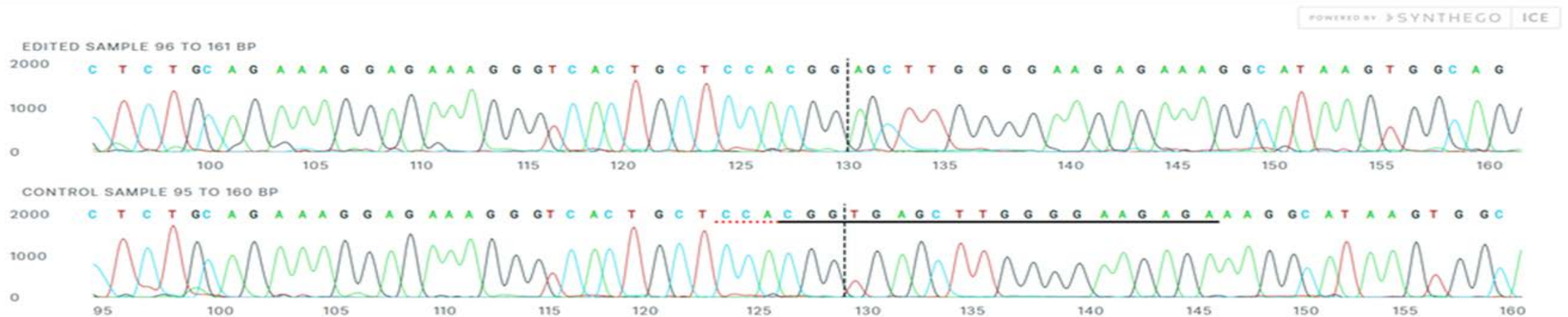


анализ генотипа мышей F0



выведение линии мышей,  
гомозиготных по делеции  
2-х нуклеотидов в первом  
экзоне гена *GRIN3A*

Делеция приводит к стоп-кодону в 175 положении,  
тогда как полноразмерный белок состоит из 1135 а.к.



**Спасибо за внимание!**

Isoform e4 of *APOE* gene (located on chromosome 19) has been associated with more sporadic and familial forms of Alzheimer's disease that present after age 65. The presence of one APOEe4 allele does not always lead to Alzheimer's disease, but among persons carrying one APOE- e4 allele about 50% have Alzheimer's disease and those having two alleles, 90% develop Alzheimer disease. Each APOE e4 allele also lowers the age of disease onset. The presence of the APOE e4 allele is an important risk factor for Alzheimer's disease.

Variants in the gene for the sortilin receptor, *SORT1*, which is essential for transporting APP from cell surface to Golgi-endoplasmic reticulum complex, have been found in familial and sporadic forms of Alzheimer disease.

Two categories of drugs are approved for the treatment of Alzheimer's disease: cholinesterase inhibitors and partial N-methyl D-aspartate (NMDA) antagonists.

### **Cholinesterase Inhibitors**

Cholinesterase inhibitors act by increasing the level of acetylcholine; a chemical used by nerve cells to communicate with each other and is important for learning, memory and cognitive functions. Of this category, 3 drugs: donepezil, rivastigmine, and galantamine are FDA-approved for the treatment of Alzheimer's disease.

Donepezil can be used in all stages of Alzheimer's disease. Galantamine and rivastigmine are approved for treatment in MCI and Dementia stage. Donepezil and galantamine are rapid, reversible inhibitors of acetylcholinesterase. Rivastigmine is a slow, reversible inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Donepezil is usually preferred of all because of once-daily dosing. Galantamine is available as a twice-daily tablet or as a once-daily extended-release capsule. It cannot be used in end-stage renal disease or severe liver dysfunction. Rivastigmine is available in an oral and transdermal formulation. The most common side effects of cholinesterase inhibitors are gastrointestinal-like nausea, vomiting, and diarrhea. Sleep disturbances are more common with donepezil. Due to increased vagal tone, bradycardia, cardiac conduction defects, and syncope can occur, and these medications are contraindicated in patients with severe cardiac conduction abnormalities.

### **Partial N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Memantine**

AD is characterized by synaptic loss, deposition of A $\beta$  plaques, neurofibrillary tangles (NFTs), and hyperphosphorylated tau. These changes are associated with NMDARs activation and oxidative stress which ultimately results in AD pathology. Besides, A $\beta$  is also reported to trigger NMDA-mediated Ca $^{2+}$  influx, excitotoxicity, and stress-related signaling pathways in neurons which may exacerbate aging-related increases in oxidative stress, impaired energy metabolism, and defective Ca $^{2+}$  homeostasis