

Взаимодействие ЦКП ИФАВ РАН с Научным советом по ПНЗ 6 «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов» и его потенциал для реализации других ПНЗ биомедицинской направленности.

1. Взаимодействие с Научным советом приоритетной научной задачи №6 «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов»

ЦКП ИФАВ РАН «Центр коллективного пользования научным оборудованием для создания генно-модифицированных линий животных и изучения эффективности соединений на оригинальных клеточных и трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека» создан для решения приоритетной научной задачи №6 «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов».

В соответствии с этим проводится тесное взаимодействие с Научным советом приоритетной научной задачи №6 «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов», также смежными советами, такими как Научный совет приоритетной научной задачи №4 «Мозг – исследование и моделирование структуры, функций и механизмов когнитивной деятельности с целью изучения природы патологий, разработки принципиально новых медицинских технологий и создания «мозго-машинных» систем». Руководитель проекта по Соглашению 14.621.21.0008 по теме «Развитие центра коллективного пользования научным оборудованием для создания генно-модифицированных линий животных и изучения эффективности соединений на оригинальных клеточных и трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека» член-корреспондент РАН С.О. Бачурин входит в состав обоих советов, утвержденных приказом Министерства образования и науки Российской Федерации от 23 июля 2014 года № 784. Участие руководителя проекта в советах ПНЗ обеспечивает тесное взаимодействие работ ЦКП в решении приоритетных научных задач.

Сотрудники ЦКП ИФАВ РАН выступали с докладами о работах центра на рабочих заседаниях совета. Так, 23.04.2015 на Научном совете по приоритетной научной задаче № 6 был представлен отчет ИФАВ РАН по теме «Развитие центра коллективного пользования научным оборудованием для создания генно-модифицированных линий

животных и изучения эффективности соединений на оригинальных клеточных и трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека». Прделанные работы и отчет в целом были одобрены участниками проекта.

2. Работы и проекты, направленные на решение ПНЗ №6 «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов».

Основная часть работ ЦКП ИФАВ РАН «Центр коллективного пользования научным оборудованием для создания генно-модифицированных линий животных и изучения эффективности соединений на оригинальных клеточных и трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека» связана с проведением совместных проектов с организациями, участвующими в решении ПНЗ.

Соглашение с Минобрнауки № 14.604.21.0144, «Создание научно-технических решений для разработки стимуляторов нейрогенеза»

Разработка подходов направленных на создание комплексной системы направленного дизайна, оптимизации и отбора нового поколения нейропротекторных препаратов, способных стимулировать нейрогенез во взрослом мозге для использования в комплексной терапии нейродегенеративных заболеваний (НДЗ).

В ходе выполнения ПНИ будут получены следующие научно-технические результаты:

- Разработаны методические подходы для автоматизации рационального дизайна и валидации химических веществ с пронейрогенными свойствами.
- Сформированы фокусированные библиотеки соединений с потенциальной пронейрогенной активностью. В частности, обеспечен синтез и наработка широкого круга оригинальных производных в ряду гамма-карболинов, индолов, карбазолов, фенотиазинов и диазобициклононанов.
- Разработаны и валидированы удобные и адекватные тест-системы для оценки нейрогенных свойств новых соединений.
- Выполнена оценка пронейрогенной активности целевых соединений и отбор препаратов-лидеров для дальнейших доклинических исследований. Для этого, в качестве модельных тест-систем должны быть использованы тканевые и клеточные модели, воспроизводящие основные молекулярные события патогенеза НДЗ, а также уникальные линии трансгенных животных, моделирующие основные виды нейропротеинопатий – как ключевой стадии развития нейродегенеративных заболеваний, для оценки пронейрогенного действия вновь синтезируемых и модельных веществ. Препараты лидеры, проявляющие выраженную активность (сопоставимую или превышающую препараты сравнения) в отношении процесса

протеинопатии на различных клеточных и тканевых моделях, используемых для первичного скрининга, должны быть использованы для экспериментов на трансгенных животных.

- Исследованы действия полученных соединений на процессы пролиферации и дифференцировки нервных клеток в нейрогенных зонах мозга в условиях развития нейродегенерации, на примере модельных трансгенных животных. Оценка пронейрогенной и антиагрегационной активности целевых соединений в зависимости от стадии развития нейродегенеративного процесса, исследование пролиферативной активности в норме и при патологии, а также пути дифференцировки вновь-образованных нейральныхпрогенеторных клеток.
- Использование модельных животных позволит выявить какой эффект стимуляция нейрогенеза оказывает на патогенетические процессы сопровождающие нейродегенерацию в условиях *in vivo*. Теоретически препараты, обладающие пронейрогенной активностью, потенциально могут быть так же применены для лечения широкого круга социально значимых заболеваний, включающих сосудистые неврологические патологии и травмы ЦНС.

Грант РФФИ 14-23-00160, «Направленный дизайн, синтез и исследование биологической активности мультитаргетных соединений в качестве инновационных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний»

Данный проект направлен на решение актуальной проблемы развития стратегии лечения нейродегенеративных заболеваний на основе новейших данных о патогенезе этих заболеваний с сочетанным воздействием на ряд основных мишеней, определяющих процесс развития нейродегенерации и, одновременно, на мишени, позволяющие компенсировать утраченные когнитивные функции.

Предлагается реализация программы создания уникальных бифункциональных веществ, которые могут являться либо мультитаргетными лекарственными препаратами, действующими на основные звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний или сочетающими действие на патогенетическое звено и симптоматический эффект. Молекулы таких соединений могут либо сочетать фармакофоры, действующие на одинаковое звено патогенеза ("бинары") или представлять собой соединения, где к известному эффективному фармакофору присоединен дополнительный фрагмент (например, донор NO), что усиливает общий терапевтический эффект. Эта программа будет включать разработку новых синтетических алгоритмов конъюгирования (объединения) фармакофорныхлигандов в молекулы и модификации известных нейропротекторов введением биологически активного фрагмента, содержащего NO-

донорную группу, синтез новых потенциальных мультаргетных нейропротекторов, скрининг их активности по отношению к значимым мишеням *in vitro* с выявлением веществ-лидеров и анализом когнитивно-стимулирующих и нейропротекторных свойств в экспериментах *in vivo*, в том числе и на трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний.

Используемые для скрининга тесты будут включать:

- определение активности соединений как потенциаторов AMPA-рецепторов, неконкурентных блокаторов NMDA-рецепторов; антагонистов 6 подтипа серотониновых рецепторов и агонистов альфа-7 никотиновых рецепторов, антихолинэстеразную активность;
- исследование нейропротекторного потенциала соединений как модуляторов неспецифической проницаемости митохондрий и вероятности митохондриальной токсичности соединений на препаратах изолированных митохондрий мозга;
- исследование влияния на микротубулярное звено патогенеза БА: на активность киназы гликоген синтазы 3 β (GSK-3 β) и на полимеризацию тубулина или сборку микротрубочек и их структуру.

Исследование потенциального нейропротекторного действия соединений-лидеров будет проведено на ряде моделей нейродегенерации на нейрональных культурах клеток с последующим тестированием *in vivo* нейропротекции и когнитивно-стимулирующих свойств на модельных генетически-модифицированных животных и/или нейротоксикологических моделях неврологических состояний и нейродегенеративных заболеваний.

Государственный контракт № 14.N08.12.1027, «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства для лечения мягких когнитивных нарушений (MCI) на основе фторзамещенного пиридо[4,3-b]индола»

В рамках данного проекта будут проведены доклинические исследования специфической активности, безопасности, фармакокинетики лекарственного средства, предназначенного для лечения мягких когнитивных нарушений (MCI).

Грант РФФИ № НК 14-04-01243\14, «Разработка нового класса препаратов на основе производных гамма-карболина и карбазола, способных стимулировать нейрогенез в пролиферативно-активных областях взрослого мозга, для лечения нейродегенеративных заболеваний»

Исследование посвящено изучению стимулирующего действия новых производных гаммакарболина и карбазола на процессы пролиферации и дифференцировки нейральных прогениторных клеток в нейрогенных зонах головного мозга мышей.

Использование генетической модели церебрального амилоидоза (линия трансгенных мышей 5x FAD) позволит отобрать перспективные препараты, способные активировать нейрогенез во взрослом мозге и дальнейшего создания на их основе лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний человека. На данный момент стимуляция внутреннего пула нейральных стволовых клеток рассматривается как перспективная стратегия лечения широкого круга социально значимых заболеваний (сосудистые неврологические заболевания, травмы ЦНС, нейродегенеративные болезни), связанных с гибелью нервных клеток. Задачей настоящего исследования является изучение действия новых соединений на процессы нейрогенеза в норме и на различных стадиях прогрессии нейродегенеративного процесса в условиях модельной FUSопатии у трансгенных мышей и отбор модифицированных соединений, наиболее эффективно стимулирующих пролиферацию и дифференцировку нейральных предшественников в зрелые функциональные нейроны, способные замещать утраченные клетки.

РФФИ КОМФИ 13-04-40379-Н13, «Изучение роли альфа-синуклеина в механизмах пластичности дофаминергических нейронов и патогенезе болезни Паркинсона»

Выполнялись работы по созданию регулируемого нокаута гена альфа-синуклеина в линии генетически модифицированных мышей с использованием ER/Cre-рекомбиназы, активируемой тамоксифеном. Была получена коровая линия мышей $\alpha\text{-syn}_{\text{loxP/neo-free}}$, в геноме которых второй экзон гена альфа-синуклеина фланкирован loxPсайтами и при этом из модифицированного локуса при помощи FRT-рекомбинации удален ген устойчивости к неомицину (neo), фланкированный FRT-сайтами. Корректность проведенных в локусе модификаций подтверждена в серии скрещиваний с мышами трансгенной линии, содержащий Cre-рекомбиназу под актиновым промотором. В потомстве продемонстрировано ожидаемое удаление второго экзона гена альфа-синуклеина, фланкированного loxPсайтами. Коровая линия $\alpha\text{-syn}_{\text{loxP/neo-free}}$ была скрещена с линией трансгенных мышей, экспрессирующей конъюгированную с эстрагеновым рецептором (ER)/Cre-рекомбиназу под контролем нейроспецифического промотора. Получены животные, в нейронах которых функциональная инактивация гена альфа-синуклеина инициируется тамоксифеном. Полностью завершен фенотипический анализ мышей коровой линии $\alpha\text{-syn}_{\text{loxP/neo-free}}$. Генетические модификации локуса подтверждены методами ПЦР и Саузерн блоттинга. Исследован уровень экспрессии гена альфа-синуклеина в нервной системе мышей до удаления FRT- фланкированного нео-гена и после его делеции с помощью FLP-рекомбинации. Проведен сравнительный морфометрический анализ числа дофаминергических нейронов в Черной субстанции и

VTА у мышей коровой линии a-syn_loxP/neo-free и у животных дикого типа C57BL6J (WT). Охарактеризованы конечные ожидаемые продукты регулируемой генетической делеции в коровой линии – конвенционного генетического нокаута альфа-синуклеина (ex_2_Ko).

3. Результаты работ и проектов, направленных на решение приоритетной научной задачи №6 «Формирование сети национальных центров генетических коллекций лабораторных животных для моделирования патологий человека и испытаний новых лекарственных препаратов».

В настоящий момент в ЦКП ИФАВ РАН содержится ряд линий генетически-модифицированных мышей, моделирующих заболевания человека. Коллекция ориентирована на моделирование нейродегенеративных заболеваний, в патогенезе которых важной составляющей является протеинопатия.

Часть линий содержится в виде коровых популяций, которые поддерживаются в SPF-виварии, другая часть линий депонирована в виде криопрезервированных ранних эмбрионов в криобанке центра.

Линии генетически-модифицированных животных, которые поддерживаются в данный момент в виварии центра.

1. 5xFAD

Наименование: Tg(APPswFlon, PSEN1*M146L*L286V)6799Vas

Моделируемое заболевание: Болезнь Альцгеймера (БА)

В данной линии аккумулированы 5 мутаций, ассоциированных с наследственными формами БА - 3 в гене APP (K670N/M671L; I716V; V717I) и 2 в гене *PS1* (M146L; L286V).

Патологический фенотип включает:

- амилоидные отложения, глиоз, нейродегенерацию, нарушения памяти;
- накопление внутриклеточного A β и выраженная гибель нейронов

Линия 5XFAD воспроизводит основные признаки церебрального амилоидоза, характерного для БА и может быть использована в качестве модели A β ₄₂-индуцированной нейродегенерации и формирования амилоидных бляшек.

2. FUS-TG F19

Моделируемое заболевание: Боковой амиотрофический склероз (БАС).

Мутации: Ген *FUS*, трунктированная форма.

FUS – ядерный РНК/ДНК связывающий белок, мутации в котором ассоциированы с рядом наследственных форм БАС и ФТЛД.

Патологический фенотип включает:

- FUS-реактивные внутриклеточные и/или внутриядерные включения неамилоидного типа в тканях спинного и головного мозга.
- Прогрессирующая с возрастом нейродегенерация со специфической потерей двигательных нейронов.
- Развитие параличей и порезов конечностей и дыхательной мускулатуры
- Преждевременная гибель модельных животных в возрасте от 90 до 130 дней.

Линия FUS-TG F19 воспроизводит патогенетическую картину БАС и является на сегодняшний день наиболее адекватной моделью этого заболевания.

3. Линия Бессинуклеиновых мышей. по α, β, γ -синуклеинам

Генетическая инактивация (конвенционный нокаут) всех трех генов семейства синуклеинов: *SNCA*, *SNCB*, *SNCG*.

Синуклеины – нейроспецифические высоко-консервативные белки позвоночных, способные к функциональному замещению внутри семейства, преимущественно локализируются в пресинаптических терминалиях, где принимают участие в регуляции нейротрансмиссии. Линия бессинуклеиновых мышей используется в качестве модели патологических состояний с нарушением метаболизма синуклеинов, сопровождающихся снижением (вплоть до полной потери) их содержания в пресинаптическом пространстве.

Используется для исследования ранних стадий болезни Паркинсона (БП) и деменции с рассеянными тельцами Леви.

Линии генетически-модифицированных животных, которые депонированы в виде криопрезервированных ранних эмбрионов в криобанке центра.

1. Thy1mySN

Наименование: C57BL/6-Tg(Thy1-Sncg)HvP36Putt/J

Моделируемое заболевание: Все формы болезни двигательного нейрона.

Трансгенная линия с эктопной экспрессией немодифицированного гена γ -синуклеина, направляемой нейроспецифическим промотором Thy1.

Патологический фенотип включает:

- Агрегацию γ -синуклеина, формирование и накопление цитоплазматических включений амилоидного типа в телах нейронов, астроглиоз;
- Прогрессирующая с возрастом нейродегенерация с преимущественной потерей двигательных нейронов.
- Развитие параличей и порезов конечностей, потеря мышечной массы, кахексия.
- Преждевременная гибель модельных животных в возрасте около 1 года.

Линия валидирована для тестирования и отбора нейропротекторных препаратов, замедляющих прогрессию протеинопатии.

2. Tau^{P301S}

Наименование: Tg(Thy1-MAPT*P301S)2541Godt

Моделирует нейродегенеративный процесс, вызванный таупатией.

Трансгенная линия с эктопной экспрессией мутированного гена *MAPT* человека (мутация P301S), направляемой нейроспецифическим промотором Thy1, характеризуется накоплением гиперфосфорилированных форм белка тау и его патогенной агрегацией.

Патологический фенотип включает:

- Агрегацию гиперфосфорилированных форм белка тау, формирование нейрофибрилярных клубков - цитоплазматических и аксональных включений амилоидного типа, характерных для БА, болезни Пика и др.
- Прогрессирующая с возрастом нейродегенерация с нарушением моторной функции.
- Преждевременная гибель модельных животных в возрасте 5-6 месяцев.

3. ApoE-knockoutmice (ApoE^{-/-})

Наименование: Apoetm1Unc

Генетическая инактивация (конвенционный нокаут) *ApoE*.

- ApoE принимает участие в нормальном катаболизме триглицерид-богатых липопротеинов, показана его роль в патогенетических механизмах БА. При гиперэкспрессии белка PDAPP^{+/+} инактивация гена ApoE приводит к формированию и накоплению диффузных Aβ-реактивных включений в гипоталамусе модельных животных.

Линия ApoE^{-/-} может использоваться для изучения метаболизма/катаболизма Aβ-пептидов и разработки патогенетической терапии БА.

4. Коровая линия для регулируемой генетической тканеспецифической инактивации α-синуклеина.

Рабочее название: a_syn^{flox/flox}

Линия предназначена для скрещивания с другими вспомогательными линиями трансгенных мышей, экспрессирующих Cre-рекомбиназы под тканеспецифичными промоторами. Делеционная рекомбинация гена α-синуклеина обеспечивается фланкирующими второй экзон lox-P сайтами.

Линия предназначена также для моделирования дисфункции α-синуклеина в любых тканях и на любых стадиях эмбрионального и постнатального развития. Экспериментальное нарушение функции α-синуклеина в поздних периодах жизни

позволяет моделировать спорадические и ранние формы синуклеинопатий, в первую очередь болезни Паркинсона и деменции с рассеянными тельцами Леви.

5. Трансгенная линия мышей, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под регулируемым промотором нейроспецифической енолазы.

Скрещивание мышей, содержащих в геноме фланкированные lox-P сайтами последовательности, с данной линией позволяет получать экспериментальных животных, у которых делеционная рекомбинация заданных генов может быть инициирована химически (в данном случае тамоксифеном) на любом этапе жизни. Причем генетический нокаут осуществляется только в нейронах, поскольку использован нейроспецифический промотор для экспрессии рекомбиназы.

Линия совместима, как с коровой линией $a_syn^{flox/flox}$, так и с любыми другими модифицированными lox-P сайтами геномами.