

УДК 616-092

Комплексная оценка влияния белков-синуклеинов на ухудшение моторной функции при возрастных изменениях

Морозова О.А.^{1,2}, Краюшкина А.М.¹, Суханова Ю.С.¹, Иванова Т.А.¹, Чапров К.Д.¹

¹ Институт физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Актуальность. Нарушение дофаминовой нейротрансмиссии характерно для многих нейродегенеративных заболеваний с моторной дисфункцией. Участие белков-синуклеинов в регуляции гомеостаза дофамина делает актуальным их изучение в контексте патологии.

Целью исследования является характеристика изменений моторной функции мышей с различными комбинациями нокаутов по генам белков семейства синуклеинов с возрастом.

Материалы и методы. Восемь групп животных проходили тестирование в автоматизированной системе CatWalk XT, а их мышечная сила оценивалась с помощью теста «Сила хвата» (Grip Strength Test Meter) в возрасте 6, 12, 18 и 24 месяца. Статистическая обработка данных проводилась в программе «GraphPad Prism Software 7.0».

Результаты. Было выявлено достоверное снижение параметра «длина следа» с возрастом в группах животных без функционального альфа-синуклеина. Также у этих животных отмечены и другие нарушения походки. По данным нашего исследования, отсутствие бета- и гамма-синуклеина приводит к достоверному снижению массы тела и ухудшению силы хвата.

Заключение. Показана важная роль белков семейства синуклеинов в ухудшении двигательной функции животных с возрастом и выявлены некоторые скрытые параметры, вносящие изменения в походку животных с различными комбинациями нокаутов по генам белков семейства синуклеинов.

Ключевые слова: альфа-синуклеин; бета-синуклеин; гамма-синуклеин; синуклеины; моторная дисфункция; анализ походки; нейродегенеративные заболевания.

Для цитирования: Морозова О.А., Краюшкина А.М., Суханова Ю.С., Иванова Т.А., Чапров К.Д. Комплексная оценка влияния белков-синуклеинов на ухудшение моторной функции при возрастных изменениях. *Патогенез*. 2024; 22(2): 67-71.

DOI: 10.25557/2310-0435.2024.02.67-71

Для корреспонденции: Морозова Ольга Александровна, e-mail: contact.morozova@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке РФФ: грант 23-24-00450.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Коллектив авторов благодарит биоресурсную коллекцию и ЦКП ИФАВ РАН за содержание колоний животных (программа FFSG-2024-0020).

Поступила: 09.06.2024.

Comprehensive assessment of the impact of synuclein proteins on motor function in age-related changes

Morozova O.A.^{1,2}, Krayushkina A.M.¹, Sukhanova Yu.S.¹, Ivanova T.A.¹, Chaprov K.D.¹

¹ Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences
Severnii pr. 1, Chernogolovka of Moscow Region 142432, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

Actuality. Dopamine neurotransmission impairment is a common phenomenon in neurodegenerative diseases associated with motor dysfunction. The involvement of synuclein proteins in the regulation of dopamine homeostasis renders their study pertinent in the context of pathology.

The aim of this study is to identify the impact of different combinations on motor function developed with ageing, in knockouts of synuclein family genes.

Materials and methods. Eight groups of animals were tested in the CatWalk XT automated system, and their muscle strength was evaluated using the Grip Strength Test Meter at 6, 12, 18 and 24 months of age. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism Software 7.0.

Results. A significant reduction in the 'print length' parameter with age was observed in the groups of animals lacking functional alpha-synuclein. Furthermore, other gait abnormalities were observed in these animals. Our study indicates that the absence of beta- and gamma-synuclein is associated with a significant reduction in body weight and impaired grip strength.

Conclusion. The present study has demonstrated the pivotal role of synuclein family proteins in the impairment of motor function in animals with age. Furthermore, it has identified several hidden parameters that introduce changes in the gait of animals with different combinations of synuclein genes knockouts.

Key words: alpha-synuclein; beta-synuclein; gamma-synuclein; synucleins; motor dysfunction; gait analysis; neurodegenerative diseases.

For citation: Morozova O.A., Krayushkina A.M., Sukhanova Yu.S., Ivanova T.A., Chaprov K.D. [Complex assessment of the synuclein proteins effect on the deterioration of motor function in age-related changes]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2024; 22(2): 67-71. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2024.02.67-71

For correspondence: Morozova Olga Aleksandrovna, e-mail: contact.morozova@gmail.com

Funding. The study was carried out with the support of the RSF: 23-24-00450.

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

Acknowledgments. To the Bioresource Collection and the Centre for Collective Use IPAC RAS for their assistance in the maintenance of animal colonies (program FFSG-2024-0020).

Received: 09.06.2024.

Введение

Многие нейродегенеративные заболевания, связанные с моторной дисфункцией, имеют в своем патогенезе нарушение регуляции гомеостаза дофамина. Одним из регуляторов нейротрансмиссии дофамина в пресинаптических окончаниях является белок альфа-синуклеин, преимущественно локализованный в центральной нервной системе. Нарушение метаболизма альфа-синуклеина, связанное с его агрегацией и образованием телец Леви, является характерным патоморфологическим признаком болезни Паркинсона [1]. Два других белка семейства синуклеинов также экспрессируются в нейронах и участвуют в нейротрансмиссии, что делает актуальным изучение влияния семейства белков-синуклеинов на осуществление моторной функции в контексте нейродегенеративных заболеваний [2]. Исходя из этого, нами была поставлена следующая цель исследования: охарактеризовать изменения моторной функции мышей с различными комбинациями нокаутов по генам белков семейства синуклеинов с возрастом. Ранее на аналогичных моделях уже было показано изменение двигательной функции [3]. Исследуемые животные содержат принципиально иной тип нокаута по гену альфа-синуклеина – B6-Snca^{tm1.2Vib}/J, в котором отсутствуют посторонние генетические вставки, что минимизирует влияние на экспрессию соседних генов [4].

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на самцах восьми линий мышей: на одиночных нокаутах по альфа- B6-Snca^{tm1.2Vib} (A-syn KO, $n = 13$); бета- B6-Sncb^{tm1Sud} (B-syn KO, $n = 17$) и гамма-синуклеину B6-Sncg^{tm1Vib} (G-syn KO, $n = 17$); а также на двойных нокаутах (A,B-syn KO, $n = 18$; A,G-syn KO, $n = 15$ и B,G-syn KO, $n = 15$), и бессинуклеиновых мышцах (A,B,G-syn KO, $n = 22$), которые в свою очередь были получены путём попарного скрещивания одиночных нокаутов. Все животные поддерживались на генетическом фоне линии C57BL/6J [5, 6]. В качестве контрольной группы использовались животные из промежуточных скрещиваний без генетических модификаций (WT, $n = 14$). Все животные были прогенотипированы путем полимеразной цепной реакции с последующим электрофорезом из биопсии уха по следующему протоколу [7].

Тестирование походки исследуемых животных проводилось в автоматизированной системе CatWalk XT (Noldus Information Technology, Нидерланды) в 6-, 12-, 18- и 24-месячном возрасте. Данная установка представляет собой узкий закрытый коридор, расположенный на стеклянной прозрачной пластине, с длинного края просвечиваемой зелёным светом. Животное помещается на начало пластины и проходит её от начала до конца несколько раз. Для математического анализа походки используется минимум три пробежки от одного животного с отклонением средней скорости движения не более 60%. Во время движения мыши по коридору в местах соприкосновения её лап с прозрачным полом свет рассеивается и детектируется расположенной под пластиной высокоскоростной камерой, таким образом и формируются изображения следов животного. Красный свет, исходящий с потолка коридора, позволяет камере регистрировать контур тела животного. Коэффициент усиления камеры устанавливался на 20 дБ, красный верхний свет на 17,7 В, зелёный свет на дорожке на 16,5 В. Все проходки животных анализировались при пороге интенсивности зелёного света, настроенном на 20.

Каждое животное взвешивали перед тестированием на установке. Перед каждой тестируемой мышью пол установки и стенки коридора обрабатывались 70%-ным раствором этилового спирта. Изображения следов, полученные установкой, автоматически идентифицировались программой как одна из четырех лап животного или как неспецифичные изображения. Далее автоматически распознанные записи проверяли вручную и на каждом следе лап выставляли отрезки, определяющие длину следа и расстояния между пальцами.

На каждой временной точке у мышей оценивалась сила хвата передних лап с помощью измерителя Grip Strength Test Meter (ИТС Life Science, США). Данное устройство имеет вид тонкой металлической решетки, соединенной с детектором силы натяжения, где единицей измерения является грамм. После того как животное захватывало передними лапами сетку, его тянули назад до тех пор, пока оно не разжимало лапы. На экране датчика силы хвата отображалось максимальное значение, с которым животное оттягивало решетку. По каждому животному в обработку брали усредненное значение пяти таких измерений.

Протокол исследования на животных был одобрен Локальным этическим комитетом Института (протокол

№48 от 15.01.2021). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014: «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» в соответствии с принципами, изложенными в Директиве 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях.

Статистическая обработка данных проводилась в программе «GraphPad Prism Software 7.0» (GraphPad Software Inc, США). Выборки проверялись на нормальность распределения критерием Д'Агостино-Пирсона. Для дальнейшей обработки использовали двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями. Гипотеза о статистической значимости различий между группами по изучаемому критерию принималась при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Для исследования вовлеченности каждого из белков семейства синуклеинов в изменение моторной функции с возрастом были сформированы восемь групп животных с различными комбинациями нокаутов по генам семейства синуклеинов. Мыши с одиночным нокаутом представляли модель дисфункции конкретного гена синуклеина и сравнивались с животными без модификации генома, тогда как на двойных нокаутах был воспроизведен эффект от единственного оставшегося из трёх функциональных белков семейства, группой сравнения к которым являлись бессинуклеиновые мыши (тройной нокаут). Группы сравнения WT и A,B,G-syn KO также были сопоставлены между собой на графиках. В статистическую обработку были взяты только те животные, которые проходили тестирование на всех четырех временных точках.

Статистический анализ параметров походки животных, полученных в системе CatWalk XT, позволил проанализировать и оценить даже незначительные изменения моторной функции мышей: отпечатки следов, их размеры и ориентацию положения лап относительно тела животного, паттерн походки и т.д. В результате, было выявлено, что внутри генотипов значения параметров, получаемые отдельно для правой и левой лапы, имеют общий тренд. «Длина следа» достоверно снижалась с возрастом в группах животных без функционального альфа-синуклеина. Также были выявлены отличия A,B,G-syn KO мышей от групп A,B-syn KO и B,G-syn KO по этому же параметру.

По критерию «Угол между длиной следа задней лапы и осью тела животного» бессинуклеиновые животные отличаются от A,G-syn KO и B,G-syn KO мышей, а животные без модификаций генома от A-syn KO и B-syn KO.

Измерение массы тела животных на протяжении всего эксперимента показало значительное снижение веса у A,B,G-syn KO мышей в сравнении с WT, что также наблюдалось в группах животных без гамма-синуклеина (G-syn KO и B,G-syn KO). Снижение с возрастом

силы хвата почти в два раза было выявлено у A,B,G-syn KO. На последней временной точке данный показатель был достоверно ниже в группах A,B-syn KO и A,G-syn KO (рис. 1.).

Обсуждение

В предыдущих исследованиях уже было установлено влияние нокаута альфа-синуклеина на нормальное функционирование ЦНС. Было показано, что такие животные имеют расстройства памяти и снижение способности к обучению [8]. У полностью бессинуклеиновых животных было показано возникновение дисфункции нейронов с возрастом [9]. В нашем исследовании с новым вариантом нокаута по альфа-синуклеину было подтверждено его влияние на осуществление моторной функции. Мы предполагаем, что это связано с нарушением дофаминовой трансмиссии, в обеспечении которой в норме он принимает участие. У животных без функционального альфа-синуклеина нарушается походка, что выражается в постановке не полностью распрямленной в пальцах лапы и в уменьшении угла между следами задних лап и осью тела, то есть более параллельное расположение стоп относительно тела.

Масса тела бессинуклеиновых животных достоверно снижена по сравнению с WT, A,B-syn KO и A,G-syn KO, однако, не имеет отличий от B,G-syn KO. В свою очередь, животные без модификации генома набирают большую мышечную массу чем G-syn KO и B-syn KO, что свидетельствует о важной роли бета- и гамма-синуклеинов в регулирующих вес процессах. Действительно, ранее уже было показано, что G-syn KO мыши хуже набирают вес и при этом активнее расходуют энергию, тогда как бета-синуклеин обладает способностью к связыванию липидов [10, 11]. Ослабление силы хвата также преимущественно связано с отсутствием бета- и гамма-синуклеинов, что коррелирует с вышеназванными функциями данных белков.

Заключение

Таким образом, нами была показана важная роль белков семейства синуклеинов в ухудшении двигательной функции животных с возрастом путем комплексной оценки различных комбинаций нокаутов в ряде моторных тестов. В результате проведенного анализа были выявлены некоторые скрытые параметры, описывающие изменения походки генетически модифицированных животных.

Заявленный вклад авторов

Морозова О.А., Краюшкина А.М. — написание статьи, сбор и анализ данных. Суханова Ю.С., Иванова Т.А. — написание статьи, подготовка групп синхронных животных, сбор данных. Чапров К.Д. — написание

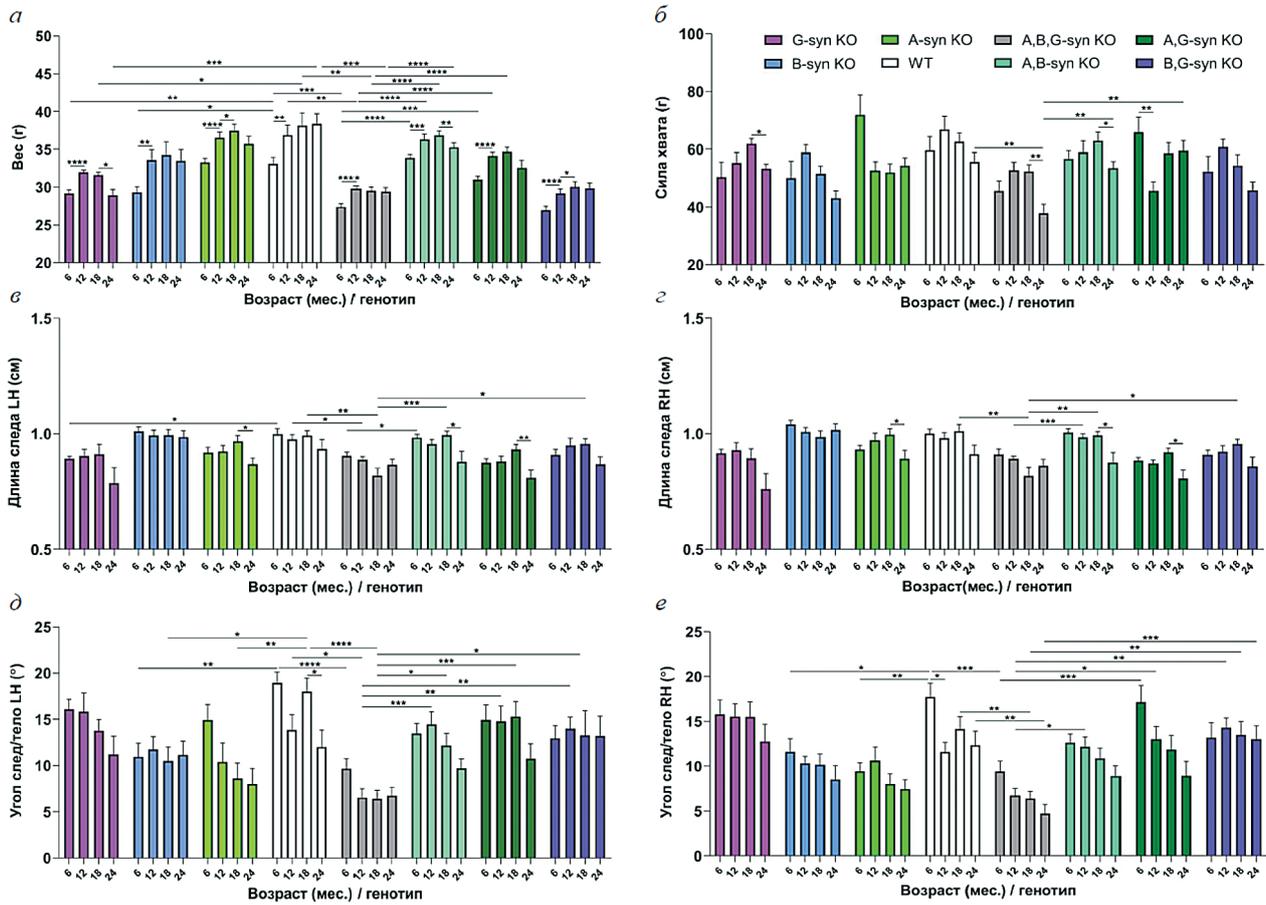


Рис. 1. Анализ показателей веса, мышечной силы и параметров походки животных в 6-, 12-, 18- и 24-месячном возрасте. а – масса тела животных; б – сила хвата; в – длина следа левой задней лапы; г – длина следа правой задней лапы; д – угол между длиной следа левой задней лапы и осью тела животного; е – угол между длиной следа правой задней лапы и осью тела животного. LH – левая задняя лапа (left hind), (RH) – правая задняя лапа (right hind). Данные представлены в виде среднего со стандартной ошибкой среднего ($M \pm SEM$). Обозначения статистической значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки).

статьи, анализ данных, научное руководство; концепция исследования.

Список литературы

1. Bisaglia M., Mammi S., Bubacco L. Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB J.* 2009; 23(2): 329–340. DOI: 10.1096/fj.08-119784
2. Bougea A. Synuclein in neurodegeneration. *Adv. Clin. Chem.* 2021; 103: 97–134. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.08.007
3. Connor-Robson N., Peters O.M., Millership S., Ninkina N., Buchman V.L. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. *Neurobiol. Aging.* 2016; 46: 107–112. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.020
4. Чапров К.Д., Тетерина Е.В., Роман А.Ю., Иванова Т.А., Голоборшова В.В., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Лыскова Е.А., Лыткина О.А., Королева И.В., Попова Н.Я., Антохин А.И., Овчинников Р.К., Кухарский М.С. Сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП на двух линиях мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина. *Молекулярная биология.* 2021; 55(1): 152–163. DOI: 10.31857/S0026898421010031
5. Ninkina N., Papachroni K., Robertson D.C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F., Court F., Rosenthal A., Fleetwood-Walker S.M., Davies A.M., Buchman V.L. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of

the gene. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23(22): 8233–8245. DOI: 10.1128/MCB.23.22.8233-8245.2003

6. 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 α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16615. DOI: 10.1038/srep16615
7. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci.* 2011; 31(20): 7264–7274. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6194-10.2011
8. Kokhan V.S., Afanasyeva M.A., Van'kin G.I. α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behav. Brain Res.* 2012; 231(1): 226–230. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.03.026
9. Gretchen-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Makani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010; 107(45): 19573–19578. DOI: 10.1073/pnas.1005005107
10. Millership S., Ninkina N., Rochford J.J., Buchman V.L. γ -synuclein is a novel player in the control of body lipid metabolism. *Adipocyte.* 2013; 2(4): 276–280. DOI: 10.4161/adip.25162
11. Hayashi J., Carver J.A. β -Synuclein: An Enigmatic Protein with Diverse Functionality. *Biomolecules.* 2022; 12(1): 142. DOI: 10.3390/biom12010142

References

1. Bisaglia M., Mammi S., Bubacco L. Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB J.* 2009; 23(2): 329–340. DOI: 10.1096/fj.08-119784
2. Bougea A. Synuclein in neurodegeneration. *Adv. Clin. Chem.* 2021; 103: 97–134. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.08.007
3. Connor-Robson N., Peters O.M., Millership S., Ninkina N., Buchman V.L. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. *Neurobiol. Aging.* 2016; 46: 107–112. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.020
4. Chaprov K.D., Teterina E.V., Roman A.Y., Ivanova T.A., Goloborshcheva V.V., Kucheryanu V.G., Morozov S.G., Lysikova E.A., Lytkina O.A., Koroleva I.V., Popova N.I., Antohin A.I., Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S. [Comparative Analysis of MPTP Neurotoxicity in Mice with a Constitutive Knockout of the α -Synuclein Gene]. *Molekulyarnaya biologiya [Molecular Biology]*. 2021; 55(1): 152–163. DOI: 10.31857/S0026898421010031 (in Russian)
5. Ninkina N., Papachroni K., Robertson D.C., Schmidt O., Delaney L., O'Neill F., Court F., Rosenthal A., Fleetwood-Walker S.M., Davies A.M., Buchman V.L. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23(22): 8233–8245. DOI: 10.1128/MCB.23.22.8233-8245.2003
6. 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 α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16615. DOI: 10.1038/srep16615
7. Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci.* 2011; 31(20): 7264–7274. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6194-10.2011
8. Kokhan V.S., Afanasyeva M.A., Van'kin G.I. α -Synuclein knockout mice have cognitive impairments. *Behav. Brain Res.* 2012; 231(1): 226–230. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.03.026
9. Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A.M., Nie E.H., Makani S., Tian N., Castillo P.E., Buchman V.L., Chandra S.S. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010; 107(45): 19573–19578. DOI: 10.1073/pnas.1005005107
10. Millership S., Ninkina N., Rochford J.J., Buchman V.L. γ -synuclein is a novel player in the control of body lipid metabolism. *Adipocyte.* 2013; 2(4): 276–280. DOI: 10.4161/adip.25162
11. Hayashi J., Carver J.A. β -Synuclein: An Enigmatic Protein with Diverse Functionality. *Biomolecules.* 2022; 12(1): 142. DOI: 10.3390/biom12010142

Сведения об авторах:

Морозова Ольга Александровна — лаборант группы изучения моделей протеинопатий Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук; студентка Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет); <https://orcid.org/0009-0005-0538-4087>

Краюшкина Анастасия Михайловна — младший научный сотрудник группы изучения моделей протеинопатий Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0002-6830-3820>

Суханова Юлия Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0002-1867-6813>

Иванова Тамара Александровна — научный сотрудник группы изучения моделей протеинопатий Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук

Чаров Кирилл Дмитриевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник, руководитель группы изучения моделей протеинопатий Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0002-0258-1879>