

На правах рукописи

Шелковникова Татьяна Александровна

**Клеточные и трансгенные модели патологической агрегации белков,
вовлеченных в патогенез нейродегенеративных заболеваний**

Специальность 03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории нейрехимии физиологически активных веществ и в лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Учреждения Российской академии наук Института физиологически активных веществ РАН (ИФАВ РАН).

Научные руководители:

кандидат биологических наук
Нинкина Наталья Николаевна

доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Бачурин Сергей Олегович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, член-
корреспондент РАН
Ярыгин Константин Никитич

доктор биологических наук, профессор
Георгиева Софья Георгиевна

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук
Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН

Защита диссертации состоится 19 мая 2011 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАН (ИБМХ РАН) по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук



Е.А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Общемировая тенденция к увеличению средней продолжительности жизни и, как следствие, повышение частоты заболеваний нервной системы, сопровождающихся прогрессирующими дегенеративными процессами, обусловило возрастающий интерес ученых и клиницистов к изучению этих расстройств. Особое внимание уделяется изучению молекулярных и клеточных механизмов развития нейрональной патологии, так как их понимание необходимо для разработки подходов к ранней диагностике и терапии этих неизлечимых в настоящее время заболеваний. Нейродегенеративные болезни – крайне неоднородная нозологическая группа, к которой относятся как социально значимые расстройства, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (БП), так и целый ряд реже встречающихся заболеваний, например, болезни двигательного нейрона (БДН) и хорея Гентингтона. Однако, несмотря на гетерогенность этой группы, недавно в патогенезе этих заболеваний был выделен общий механизм, в основе которого лежит патологическая агрегация конформационно измененных белков, сопровождаемая образованием характерных гистопатологических структур – сенильных бляшек, телец Леви, нейрофибриллярных клубков и т.п. Сходный молекулярный механизм патогенеза подобных заболеваний позволил объединить их в группу *протеинопатий*.

Как уже сформированные гистопатологические структуры, так и отдельные этапы агрегации таких белков являются потенциальными мишенями для разработки терапевтических подходов и создания болезнь-модифицирующих препаратов. В связи с этим очевидна необходимость более подробного изучения общего звена патогенеза протеинопатий. Важным инструментом для исследования молекулярных изменений, ведущих к развитию протеинопатий, является их моделирование как в бесклеточных *in vitro* системах, так и *in vivo* – с использованием клеточных линий и генетически модифицированных лабораторных животных. В настоящее время ведется активная работа по созданию и характеристике таких моделей. Модельные *in vivo* системы позволяют, во-первых, изучать физиологические функции и нарушения метаболизма склонных к агрегации белков, лежащие в основе патогенеза протеинопатий, а во-вторых, могут быть использованы для первичного отбора потенциально эффективных в отношении протеинопатии терапевтических средств.

В последнее время был выявлен ряд новых белков, вовлеченных в патогенез протеинопатий, что, в свою очередь, потребовало создания новых модельных систем, а также характеристики на новом уровне уже имеющихся *in vivo* моделей, для того чтобы более полно использовать их потенциал.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлось создание и характеристика клеточных и трансгенных моделей патологической агрегации белков, участвующих в развитии и прогрессии нейродегенеративных процессов, и их использование для исследования нейропротекторных свойств лекарственного препарата Димебон. В задачи работы входили:

1. Сравнительная морфологическая и функциональная характеристика моторных и сенсорных систем трансгенных мышей с прогрессирующей гамма-синуклеинопатией (линия *Thy1 μ SN*) с целью подтверждения возможности использования этой линии в качестве модели нейродегенеративных заболеваний со специфическим повреждением двигательных нейронов.

2. Исследование влияния препарата Димебон на молекулярно-клеточные процессы, сопровождающие развитие гамма-синуклеинопатии у трансгенных мышей линии *Thy1 μ SN*.

3. Исследование эффектов препарата Димебон в ранее охарактеризованной трансгенной модели альфа-синуклеинопатии, воспроизводящей ранние стадии БП.

4. Разработка методов моделирования протеинопатий, ассоциированных с мутациями в генах, кодирующих белки FUS и TDP-43 человека, и изучение патогенетических свойств указанных белков.

Научная новизна работы. В ходе выполнения работы впервые:

- проведена сравнительная характеристика состояния сенсорной и моторной функций у трансгенных мышей линии *Thy1 μ SN* с повышенной продукцией склонного к агрегации белка гамма-синуклеина, характеризующихся прогрессирующей нейродегенеративной патологией, и получены данные о воспроизведении симптоматических признаков БДН у мышей данной линии;
- получены модели FUS и TDP-43 протеинопатий в культуре клеток человека, с помощью которых исследованы особенности внутриклеточной локализации и агрегационные свойства мутантных форм FUS и TDP-43, а также обнаружена

корреляция этих свойств с клиническими характеристиками пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС), являющихся носителями этих мутаций.

- с использованием трансгенной модели (мышь линии *Thy1mySN*) показано, что мишенями нейропротекторного действия Димебона могут являться высокоагрегированные формы амилоидогенного белка гамма-синуклеина;
- получено указание на то, что молекулярный механизм действия Димебона может быть связан с его эффектом на убиквитин-протеасомную систему;
- обнаружена селективность действия Димебона в отношении типа нейронов или в отношении метаболизма определенных склонных к агрегации белков, что вносит существенный вклад в понимание механизма нейропротекторного действия этого препарата.

Практическая значимость. Характеристика мышинной модели гамма-синуклеинопатии, выполненная в рамках данной работы, подтвердила возможность использования трансгенной линии *Thy1mySN* в качестве модели БДН для тестирования новых подходов к терапии этих тяжелых заболеваний. Идентификация молекулярных мишеней препарата Димебон с использованием мышинной модели гамма-синуклеинопатии, а также данные по ограниченному эффекту этого препарата в модели БП могут использоваться для разработки рекомендаций по клиническому применению препарата. Полученные в исследовании линии клеток, экспрессирующих мутантные формы белков FUS и TDP-43, могут быть использованы как для дальнейшего изучения метаболизма этих белков и оценки их роли в развитии внутриклеточной патологии, так и для отбора препаратов, способных направленно действовать на метаболизм этих белков – потенциальных мишеней для терапии FUS и TDP-43 протеинопатий. В целом, полученные данные могут найти практическое применение в фармацевтической химии, биоскрининге и доклинических исследованиях.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на 11-м Международном симпозиуме по достижениям в области терапии болезни Альцгеймера (Женева, Швейцария, 2010), на Ежегодном съезде Европейского общества молекулярных биологов (Барселона, Испания, 2010), на 6-ом Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2010), на 40-ой конференции Общества нейронаук

США (Сан-Диего, США, 2010), на 23-ей Международной молодежной зимней школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2011), а также на 10-ой Международной конференции по болезням Альцгеймера и Паркинсона (Барселона, Испания, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в периодических изданиях, включенных в Перечень ВАК, и 7 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 150 страницах, содержит 24 рисунка и 3 таблицы и состоит из следующих разделов: введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 150 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и введение препарата Димебон. В работе были использованы трансгенные мыши линии *Thy1mySN*, характеризующейся пан-нейрональной сверхпродукцией гамма-синуклеина мыши, и линии *aSyn (I-120)*, характеризующейся продукцией укороченной формы альфа-синуклеина человека в дофаминергических нейронах. Обе линии велись на генетическом фоне C57BL/6J. Экспериментальные и контрольные группы трансгенных мышей начинали получать Димебон с возраста 1 мес (*Thy1mySN*) или 3 мес (*aSyn (I-120)*) с питьевой водой (10 мкг/мл), доступ к которой не ограничивался. Спонтанную двигательную активность мышей оценивали в тесте «домашняя клетка». Координацию движений животных анализировали в тестах «ротарод» при постепенном ускорении вращения стержня и тесте «перевернутая сетка». Для оценки тактильной чувствительности использовали набор калиброванных волосков фон Фрея.

Гистохимический анализ и антитела. Головной мозг, спинномозговые корешки и узлы после фиксации окрашивали на амилоид в 1% водном растворе тиофлавина S, для окраски по Нисслю использовали 0,5% раствор крезилового фиолетового, для толуидинового окрашивания срезов – раствор, содержащий 1% толуидина и 1% тетрабората натрия. Для детекции с помощью биотинилированных вторичных антител использовали 3,3-диаминобензидин в качестве хромогена. Число ТГ-позитивных нейронов в вентральной области покрышки и черной субстанции или

нейронов в спинномозговых нервных узлах определяли стереологически на окрашенных серийных срезах, с учетом поправки Аберкромби. Для детекции микроглии использовали биотинилированный агглютинин I из *Ricinus communis*. Для специфической детекции белка FUS в экспериментах на культурах клеток использовали моноклональные антитела против С-концевого эпитопа FUS. Для детекции белков (иммуногисто- и цитохимическое окрашивание, иммуноблоттинг) использовали следующие первичные антитела: кроличьи против GFAP и GFP, мышьиные против ТГ, убиквитина, альфа-синуклеина и гамма-синуклеина. В качестве вторичных использовали антитела против IgG мыши или кролика: биотинилированные или конъюгированные с флуорохромами Alexa546 или Alexa488.

Генетические конструкции и клеточные культуры. Для трансфекции культивируемых клеток использовали плазмидные конструкции на основе вектора рEGFP-C1, позволяющего экспрессировать рекомбинантные белки, слитые с GFP. Мутантные варианты гена FUS человека были созданы путем введения в участок кДНК, кодирующий сигнал ядерной локализации, четырех точечных замен, вызывающих изменение аминокислотной последовательности (R518K, R522G, P525L и R524T) в кодируемом белке. В конструкциях для экспрессии укороченных форм белков FUS и TDP-43 были полностью удалены участки генов, кодирующие сигнал ядерной локализации. В работе использована перевиваемая культура клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Клетки выращивали на покровных стеклах, обработанных поли-L-лизинном, или на чашках Петри, трансфекцию осуществляли с помощью реагента Lipofectamine2000 (Invitrogen, США). Для микроскопии клеточные культуры фиксировали последовательно холодным 4% ПФА и 100% метанолом, ядра окрашивали DAPI. При использовании флуорохром-конъюгированных вторичных антител микрофотографии получали при помощи оснащенного камерой конфокального микроскопа (Leica Microsystems, Швейцария).

Дифференциальное фракционирование растворимых и агрегированных белковых форм осуществляли при помощи ультрацентрифугирования (при 100 000 g) с использованием набора высокосолевых буферов с различным содержанием детергентов. Детекцию белков проводили методом иммуноблоттинга.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительная морфологическая и функциональная характеристика моторных и сенсорных систем у трансгенных мышей с прогрессирующей гамма-синуклеинопатией

В тканях нервной системы трансгенных мышей линии *Thy1 μ SN* накопление склонного к агрегации белка гамма-синуклеина сопровождалось прогрессирующим нарушением координации движений, а на поздних стадиях - параличом конечностей. Это наблюдение позволило предположить развитие у животных этой линии патологии двигательных нейронов, сходной с патологией, характерной для БДН человека. Однако функция сенсорных нейронов, которая у большинства пациентов с БДН существенно не нарушена, у мышей трансгенной линии *Thy1 μ SN* ранее не изучалась. Для того чтобы подтвердить селективность поражения двигательных нейронов и, следовательно, что данная линия является адекватной моделью основных аспектов патологии при БДН, была выполнена сравнительная оценка степени нарушения сенсорной и моторной функций у мышей трансгенной линии *Thy1 μ SN*. Для этого был использован комплексный подход, включающий поведенческое тестирование, оценку числа сенсорных и моторных нейронов в отдельных клеточных популяциях (или отдельных структурах нервной системы), гистологическую и биохимическую оценку состояния этих нейронов и нервных волокон.

Для оценки двигательной функции животных был использован тест на способность удерживаться на перевернутой сетке. У мышей линии *Thy1 μ SN* (возраст от 2 до 12 мес) по сравнению с животными дикого типа (возраст 18 мес) было зарегистрировано возраст-зависимое ухудшение двигательной функции, при этом в возрасте 12 мес трансгенные животные были практически неспособны удерживаться на сетке, тогда как большинство животных дикого типа даже в возрасте 18 мес могли удерживаться на сетке в течение 60 сек (Рис. 1, В). Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее данными теста «ротарод», указавшими на прогрессирующее нарушение двигательной функции у мышей линии *Thy1 μ SN*. Затем при помощи набора волосков Фрея была исследована тактильная чувствительность трансгенных животных и животных дикого типа. Статистически значимых различий между контрольными и трансгенными животными в возрасте 4 мес выявлено не было (Рис. 1, А), ухудшения состояния сенсорной функции с возрастом также не отмечалось (Рис. 1, Б).

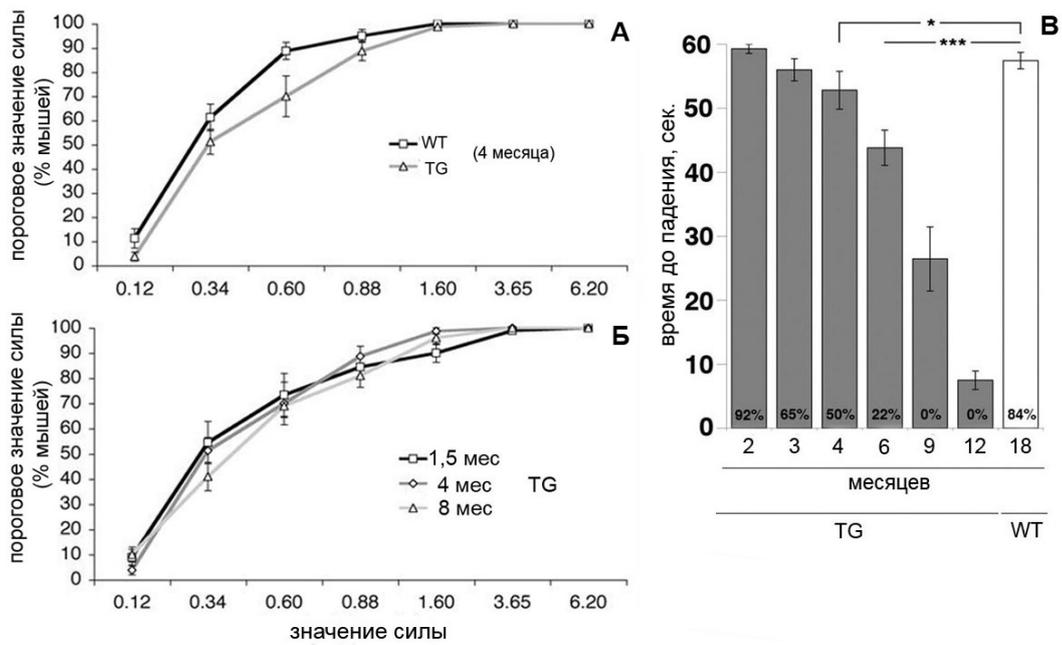


Рис. 1. Сравнительный анализ двигательной и сенсорной функций у трансгенных животных линии *Thy1mySN* (TG) и животных дикого типа (WT). Тактильная чувствительность у животных в возрасте 4 мес (А) и различного возраста (Б). (В) Двигательная функция животных в тесте «перевернутая сетка». А и Б – на оси Y указан % мышей, которые отдергивали конечность при соответствующем значении силы волоска. В – у основания столбца – процент мышей в данной возрастной группе, способных удерживаться на сетке 60 сек как минимум в одной из 3 попыток. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

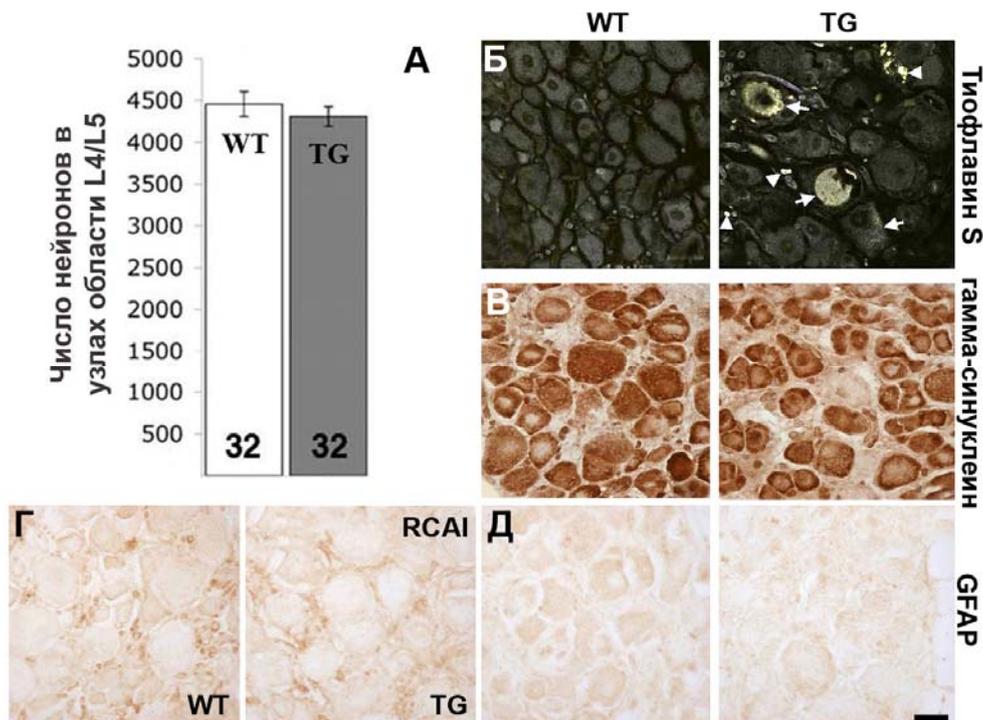


Рис. 2. Нейроны в спинномозговых чувствительных узлах мышей линии *Thy1mySN* (TG) и мышей дикого типа (WT). (А) Число нейронов в нервных узлах поясничной области (L4-L5). (Б) Окрашивание амилоид-специфическим красителем Тиофлавином S. Иммунореактивность на гамма-синуклеин (В) и маркеры нейровоспалительных реакций микроглиоза (RCAI) (Г) и астроглиоза (GFAP) (Д). У основания столбцов указано число проанализированных узлов. Стрелками указаны Тиофлавин S-позитивные включения. Шкала для всех рисунков - 25 мкм.

Таким образом, в данной модели на поведенческом уровне действительно имеет место прогрессивная двигательная патология, не сопровождаемая ухудшением сенсорной функции. Избирательное угасание двигательной функции у трансгенных животных может быть связано с гибелью отдельных популяций двигательных нейронов при накоплении токсических продуктов агрегации гамма-синуклеина, при этом сенсорные нейроны, по-видимому, более устойчивы, либо обладают более высокими компенсаторными возможностями. Для подтверждения избирательной гибели двигательных, но не сенсорных нейронов в данной модели была изучена популяция нейронов спинномозговых узлов, включающих тела только сенсорных нейронов. Статистически значимой разницы в числе сенсорных нейронов у трансгенных мышей с развитой симптоматикой и мышей дикого типа соответствующего возраста обнаружено не было (Рис. 2, А). Несмотря на то, что у трансгенных животных в нервных узлах обнаруживались Тιοфлавин S-позитивные амилоидные отложения (Рис. 2, Б), окрашивание на убиквитин и гамма-синуклеин не позволило обнаружить структуры, содержащие эти белки (Рис. 2, В). Состав отложений амилоидного типа в данном участке нервной системы требует дальнейшего изучения. Гистологический анализ признаков нейровоспаления – окраска срезов на маркеры астроглиоза (GFAP) и микроглиоза (RCAI) – не выявил каких-либо отклонений от нормы (Рис. 2, Г, Д). В целом, существенных различий по состоянию спинномозговых узлов между трансгенными мышами и мышами дикого типа обнаружено не было, что согласуется с данными поведенческого тестирования.

Для исследования выживаемости двигательных нейронов были выбраны две популяции – нейроны передних рогов спинного мозга и нейроны двигательного ядра тройничного нерва. Число нейронов в передних рогах спинного мозга даже у гетерозиготных по трансгену животных в возрасте 12 мес по сравнению с мышами дикого типа было существенно снижено (Рис. 3, А). Сходная картина была выявлена и при изучении популяции мотонейронов в двигательном ядре тройничного нерва трансгенных мышей, где, помимо статистически значимого снижения числа нейронов, также наблюдались выраженные нейровоспалительные изменения – микроглиоз и реактивный астроглиоз (Рис. 3, Б, В). Следующим этапом в оценке состояния сенсорной и моторной систем в линии *Thy1mySN* стал анализ состояния нервных волокон, интактность которых необходима для нормальной передачи

нервного импульса от двигательного нейрона к мышце. Методом иммуногистохимического анализа оценен уровень продукции гамма-синуклеина в седалищном нерве животных трансгенных мышей и мышей дикого типа (Рис. 4, А). Было обнаружено, что гамма-синуклеин в большом количестве накапливается в нервных волокнах у трансгенных животных, что позволило предположить существование негативного воздействия олигомерных и/или высокоагрегированных форм белка на отростки нервных клеток. Для определения возможного эффекта избыточного накопления гамма-синуклеина отдельно на чувствительные и двигательные волокна были исследованы передние (эфферентные) задние (афферентные) корешки спинного мозга. При анализе поперечных срезов через задний корешок (Рис. 4, Г) у трансгенных животных морфологических изменений по сравнению с животными дикого типа обнаружено не было, тогда как в передних корешках спинного мозга трансгенных мышей отмечались выраженные дегенеративные изменения, включая многочисленные убиквитинированные включения, а также микроглиоз (Рис. 4, В). Для количественной оценки степени повреждения нервных волокон была определена средняя площадь волокон А-типа (наиболее крупные миелинизированные волокна) на поперечных срезах через передние и задние корешки. Действительно, этот показатель у мышей линии *Thy1mySN* по сравнению с животными дикого типа был ниже для передних, но не для задних корешков (Рис. 4, Б). Гибель нервных волокон в данном случае может происходить как антероградно – начинаться после нарушения связи между телом нейрона и отростком в связи с накоплением токсичных продуктов агрегации гамма-синуклеина и/или при механическом повреждении волокна крупными агрегатами, так и уже после гибели нейрона.

Таким образом, существование моторной дисфункции в данной модели было подтверждено на всех уровнях, тогда как существенных изменений в сенсорной системе обнаружить не удалось. Мышей линии *Thy1mySN* можно считать адекватной моделью БДН, не сопровождаемых развитием сенсорной нейропатии, к которым принадлежит подавляющее большинство случаев этих заболеваний. Данная модель может быть использована для отбора нейропротекторных препаратов, способных защищать двигательные нейроны от токсичности, вызванной агрегацией амилоидогенных белков.

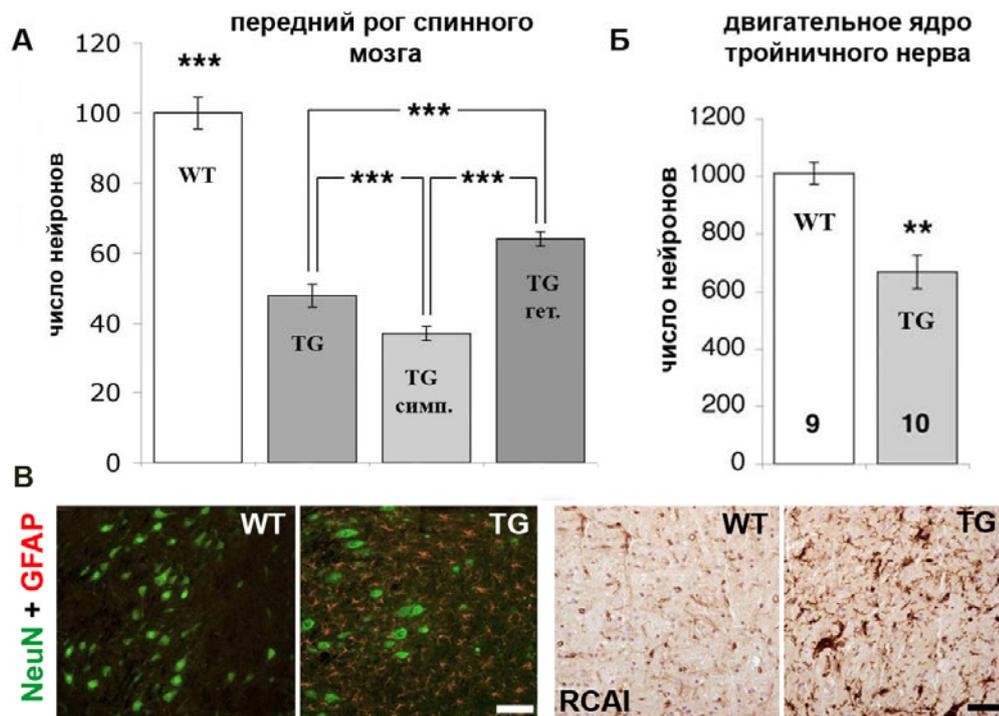


Рис. 3. Популяции мотонейронов 12-месячных мышей линии *Thy1mySN* (TG) и мышей дикого типа (WT). (А) Число мотонейронов в передних рогах спинного мозга и (Б) в двигательном ядре тройничного нерва. (В) Нейровоспалительные процессы в двигательном ядре тройничного нерва. *TG симп.* – трансгенные животные с развитой нейрональной симптоматикой, *TG гет.* – животные с одной копией трансгена. У основания столбца указано число животных. ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$. Шкала 50 мкм.

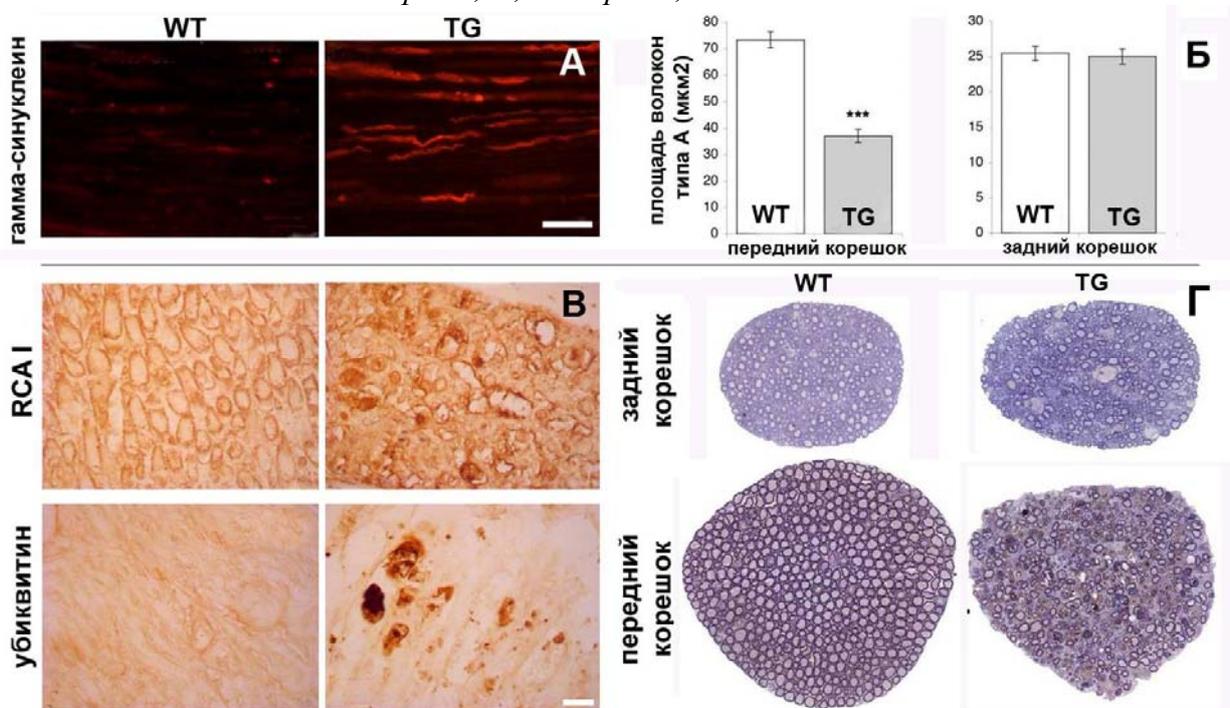
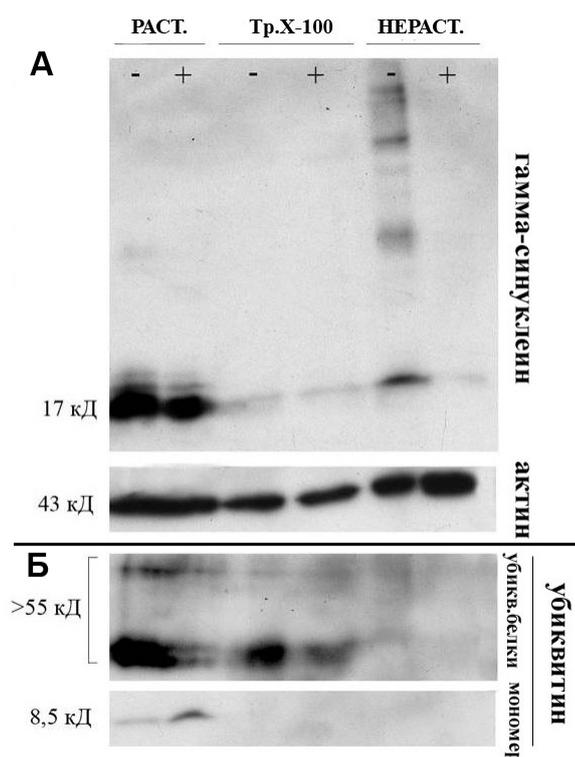


Рис. 4. Нервные волокна 12-месячных мышей линии *Thy1mySN* (TG) и мышей дикого типа (WT). (А) Экспрессия гамма-синуклеина в седалищном нерве: продольный срез через нерв. (Б) Средняя площадь волокон типа А на срезах через передний и задний корешки. (В) Иммуногистохимическая детекция убиквитина и активированной микроглии в передних корешках. (Г) Поперечный срез через передний и задний корешки спинного мозга (окрашивание толуидином). *** - $p < 0,001$. Шкала 20 мкм.

2. Влияние препарата Димебон на содержание нерастворимых форм амилоидогенного белка и на состояние убиквитин-протеасомной системы в трансгенной модели гамма-синуклеинопатии

Ранее было показано, что препарат Димебон, у которого были обнаружены нейропротекторные свойства, способен влиять на молекулярно-клеточные процессы образования и/или ликвидации патологических белковых отложений *in vivo*. Тем не менее, точный молекулярный механизм действия этого препарата до сих пор не установлен. Задачей данного раздела работы стало изучение действия Димебона на конечные продукты белковой агрегации – нерастворимые белковые включения, а также оценка состояния одной из систем клеточной защиты, активируемой при протеинопатиях, – убиквитин-протеасомной системы. В качестве объекта исследования использовались мыши линии *Thy1mySN*, для которых было ранее показано накопление нерастворимых форм амилоидогенного белка и высокая активность убиквитин-протеасомной системы в спинном мозге. Кроме того, ранее была показана способность препарата Димебон приводить к снижению числа амилоидных агрегатов и реактивного астроглиоза в спинном мозге в этой модели, а также улучшать двигательную функцию животных. У получавших Димебон животных удалось выявить существенное снижение содержания агрегированных нерастворимых форм гамма-синуклеина в препаратах спинного мозга (Рис. 5, А). При этом содержание детергент-растворимых промежуточных продуктов белковой



агрегации, которые высвобождаются из осадков в присутствии неионного детергента Тритон X-100, было одинаковым в препаратах из экспериментальной и контрольной групп. Обнаруженный эффект снижения содержания нерастворимых форм белка под действием Димебона в спинном мозге мышей линии *Thy1mySN* согласуется с выявленным ранее

Рис. 5. Растворимые (раст.), растворимые в присутствии детергента Тритон X-100 (Тр.Х-100) и детергент-нерастворимые (нераст.) белки в препаратах спинного мозга трансгенных животных, получавших (+) и не получавших (-) Димебон. В качестве положительного контроля использовался бета-актин.

уменьшением числа амилоидных включений при хроническом введении Димебона. Одним из возможных механизмов описанного эффекта может являться активация в присутствии Димебона внутриклеточных систем очистки от агрегированных форм белков, в том числе, убиквитин-протеасомной системы. Действительно, содержание мономерного убиквитина у получавших препарат мышей было выше, а количество убиквитинированных белков – ниже, чем у контрольных животных (Рис. 5, Б). Эти результаты могут свидетельствовать о повышенной активности убиквитин-протеасомной системы в клетках спинного мозга получавших Димебон мышей. В целом, эти данные являются свидетельством того, что Димебон способен влиять на процесс формирования или стабильность конечных продуктов белковой агрегации – детергент-нерастворимых структур, которые составляют основу амилоидных включений при различных формах протеинопатий.

3. Исследование эффекта Димебона на патологические изменения, вызванные сверхэкспрессией укороченной формы альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах мышей линии *aSyn (1-120)*

В задачи данного раздела входило сравнительное изучение эффекта Димебона в другой *in vivo* модели протеинопатии, вызванной накоплением в нервной ткани еще одного представителя семейства синуклеинов – альфа-синуклеина. Альфа- и гамма-синуклеины имеют сходную структуру, физико-химические свойства и способность к агрегации. Однако при альфа-синуклеинопатиях специфической гибели двигательных нейронов не выявлено. Классическим примером альфа-синуклеинопатии является болезнь Паркинсона (БП), при которой имеют место агрегация альфа-синуклеина и специфическая гибель дофаминергических нейронов. При выборе модели для данного исследования предпочтение было отдано линии, воспроизводящей ранние стадии развития патологии при БП. Линия мышей *aSyn (1-120)* характеризуется продукцией укороченной с С-конца формы альфа-синуклеина человека в дофаминергических нейронах (под контролем промотора гена ТГ). У взрослых животных этой линии снижен уровень дофамина в полосатом теле, что приводит к снижению двигательной активности, при этом укороченный альфа-синуклеин накапливается в телах нейронов. Тем не менее, выраженных нарушений двигательной функции, характерных для поздней стадии БП, у мышей данной линии не регистрируется. Известно, что ольфакторные нарушения, вызванные изменениями в обонятельной луковице,

наблюдаются у 70-95% пациентов на ранних стадиях БП и предшествуют развитию двигательной дисфункции. У мышей линии *aSyn (1-120)* наиболее высокий уровень экспрессии трансгена и накопления белка наблюдаются в дофаминергических нейронах обонятельной луковицы. Таким образом, *aSyn (1-120)* трансгенные мыши представляют собой модель ранних изменений в функции дофаминергической системы, которые предшествуют гибели нейронов на поздних стадиях БП.

Эффект хронического введения Димебона на поведенческие характеристики мышей. При анализе двигательной активности получавших Димебон и контрольных трансгенных мышей в тесте «домашняя клетка» в течение 24 ч значимых различий между группами обнаружено не было ($p=0,662$, Рис. 6, А), что свидетельствует об отсутствии эффекта препарата на спонтанную двигательную активность мышей линии *aSyn (1-120)*. Тем не менее, получавшие Димебон трансгенные животные были значительно более активны по сравнению с контрольными животными ($p=0,019$) в первые 15 мин пребывания в новом окружении; активность в этой группе приближалась к активности животных дикого типа (Рис. 6, Б). Таким образом, Димебон стимулирует исследовательскую активность стареющих мышей линии *aSyn (1-120)*. Так как исследовательское поведение животных обусловлено скоординированной работой многих участков головного мозга и зависит не только от дофаминергической системы, наблюдаемый эффект отражает общее улучшение функции стареющего мозга при использовании Димебона, что согласуется с данными предыдущих исследований. Равновесие и координация движений получавших и не получавших Димебон трансгенных мышей и мышей дикого типа одинакового возраста оценивались с помощью тестов «перевернутая сетка» и «ротарод» (Рис. 6, В и Г). Различий между группами в тесте «перевернутая сетка» обнаружено не было, однако результаты трансгенных животных в тесте «ротарод» были значительно хуже результатов животных дикого типа ($p=0,030$), введение Димебона не улучшало этих показателей ($p=0,806$). Известно, что на стадиях БП с развитой двигательной дисфункцией детектируется снижение уровня дофамина в полосатом теле на 80%, тогда как у мышей линии *aSyn (1-120)* оно достигает лишь 30%, поэтому ухудшение показателей животных в тесте «ротарод» нельзя объяснить только дефицитом дофамина. Здесь, вероятно, играют роль другие патологические изменения в дофаминергических нейронах и/или их синапсах, вызванные сверхпродукцией укор-

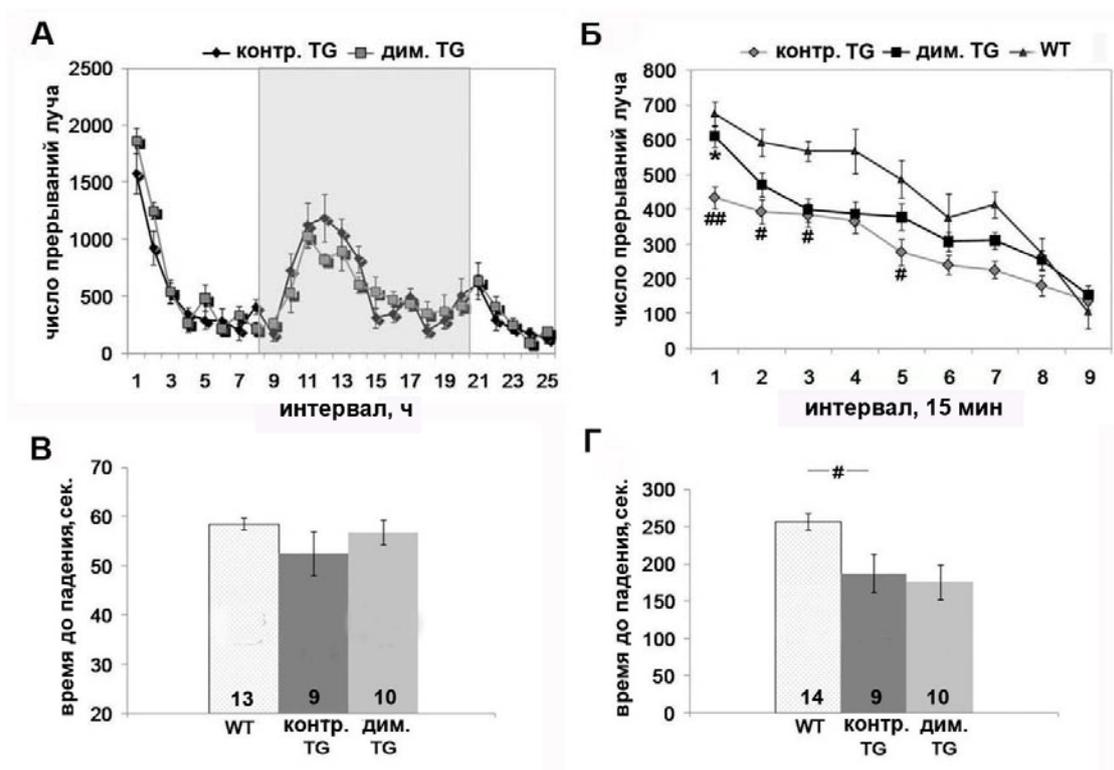


Рис. 6. Результаты поведенческого тестирования мышей линии *aSyn* (1-120), получавших и не получавших Димебон (контр. TG и дим. TG соответственно), и мышей дикого типа (WT). Спонтанная двигательная активность в течение 24 ч (А) и 2 ч (Б) тесте «домашняя клетка». Темное время суток выделено серым цветом. Анализ координации движений в тестах «перевернутая сетка» (В) и «ротарод» (Г). У основания столбца указано число протестированных животных в группе. # и * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) между показателями животных дикого типа и трансгенных животных и между показателями получавших и не получавших Димебон трансгенных мышей соответственно.

ченного альфа-синуклеина. Сниженные показатели трансгенных мышей в тесте «ротарод» и отсутствие различий между группами в тесте «перевернутая сетка» указывают на то, что сверхэкспрессия альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах вызывает селективные изменения в нервной системе животных.

Действие Димебона на число дофаминергических нейронов и содержание моноаминов в полосатом теле. Ранее было показано, что экспрессия укороченной формы альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах приводит к развитию патологических изменений в области черной субстанции: образованию белковых включений, микроглиозу, а также снижению уровня моноаминов в полосатом теле. Был оценен эффект Димебона на число дофаминергических нейронов в этом участке мозга и содержание дофамина и его метаболита дигидрофенилуксусной кислоты в дорсальной части полосатого тела. Различий в числе нейронов и содержании моноаминов между опытной и контрольной группами обнаружено не было (Рис. 7).

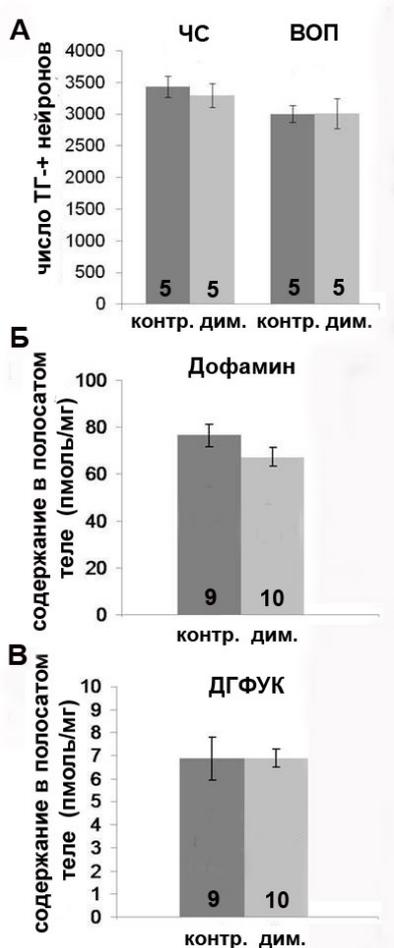


Рис. 7. Функция nigrostriарной системы у мышей линии *aSyn (1-120)*. (А) Число дофаминергических нейронов в области черной субстанции (ЧС) и вентральной области покрышки (ВОП). Содержание дофамина (Б) и его метаболита дифенилгидроуксусной кислоты (ДФУК) (В) в дорсальной части полосатого тела у получавших (дим.) и не получавших (контр.) Димебон трансгенных животных. У основания столбца указано число животных.

Таким образом, Димебон не способствует улучшению состояния nigrostriарной системы в данной модели.

Эффект Димебона на экспрессию гена укороченного альфа-синуклеина и на содержание и локализацию его белкового продукта в дофаминергических нейронах обонятельной луковицы. Поскольку наиболее высокий уровень экспрессии трансгена в данной линии обнаруживается в обонятельной луковице, в эксперименте использовали объединенные образцы ткани обонятельных луковиц получавших (D1, D2) и не получавших Димебон (C1, C2)

мышей. Для оценки эффекта препарата на экспрессию трансгена у мышей опытной и контрольной групп были определены уровни мРНК альфа-синуклеина человека с помощью обратной транскрипции-количественной ПЦР и кодируемого ею белка с помощью иммуноблоттинга. Во всех образцах уровень мРНК был одинаковым (Рис. 8, А), интенсивность полос при иммуноблоттинге, соответствующих укороченному

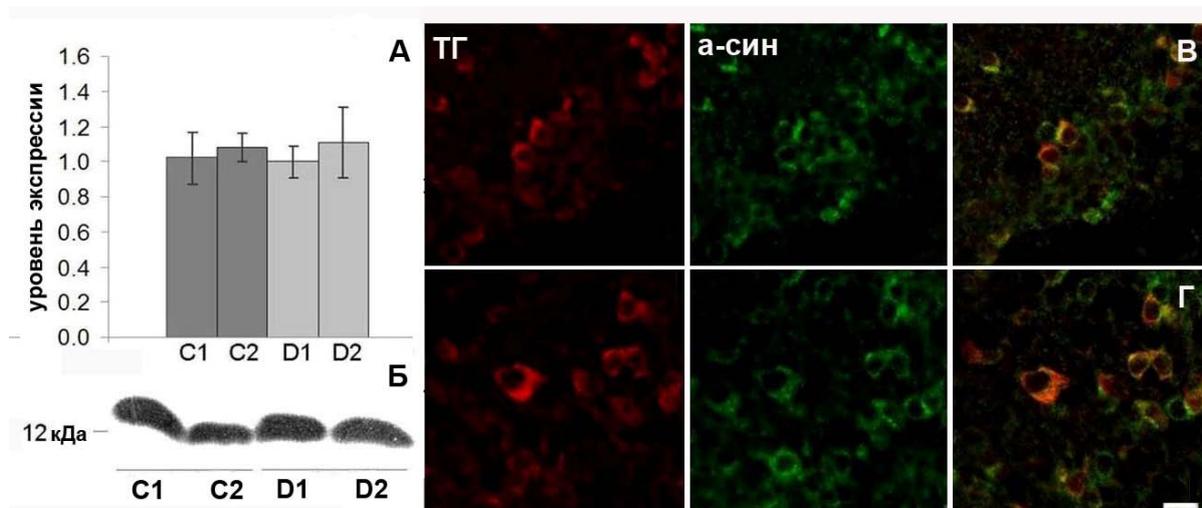


Рис. 8. Экспрессия трансгена (А) и содержание (Б) и локализация (В, Г) альфа-синуклеина в нейронах обонятельной луковицы получавших Димебон (D1 и D2, Г) и контрольных (C1 и C2, В) трансгенных мышей. Шкала 20 мкм.

альфа-синуклеину, также была сходной (Рис. 8, Б). Эти результаты указывают на то, что Димебон не изменяет экспрессию трансгена, направляемую промотором ТГ, и не меняет уровень накопления альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах обонятельной луковицы.

В отличие эндогенного альфа-синуклеина, локализованного в основном пресинаптически, укороченный белок накапливается в телах дофаминергических нейронов гломерулярного слоя обонятельной луковицы, поэтому данная популяция нейронов была подходящим объектом для оценки эффекта препарата на накопление белка и его внутриклеточную локализацию. Однако двойное иммуноокрашивание срезов обонятельных луковиц с помощью антител против альфа-синуклеина и ТГ не обнаружило каких-либо эффектов Димебона на локализацию и содержание укороченного альфа-синуклеина (Рис. 8, В, Г).

Таким образом, было показано, что Димебон не оказывает эффекта на биохимические, гистологические и поведенческие изменения при модельной протеинопатии, вызванной экспрессией укороченной формы альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах.

На основании описанных выше и литературных данных по эффекту Димебона в двух трансгенных мышинных моделях (линии *Thy1mySN* и *aSyn (1-120)*), можно предположить, что действие этого препарата селективно в отношении определенных типов нейронов и/или в отношении определенных белков. Действительно, метаболизм и функции двух изучаемых групп нейронов – дофаминергических и двигательных – существенно различаются, следовательно, они могут быть в разной степени чувствительны к агрегации и токсическому действию белковых агрегатов. Также не следует исключать возможность селективного эффекта препарата только в отношении одного из синуклеинов. Полученные данные позволяют также заключить, что Димебон, по-видимому, не может рассматриваться в качестве эффективного болезнь-модифицирующего средства для лечения альфа-синуклеинопатий.

4. Моделирование FUS и TDP-43 протеинопатий *in vitro* и свойства модифицированных форм этих белков

Белки TDP-43 и FUS стали своеобразным «связующим звеном» между наследственными и идиопатическими формами бокового амиотрофического склероза (БАС) – наиболее часто встречающегося заболевания группы БДН – и еще одной

протеинопатии, фронтотемпоральной дегенерации (ФТД), так как оба эти белка были обнаружены в составе гистопатологических агрегатов при обоих заболеваниях. Белковые молекулы FUS и TDP-43 имеют сходную доменную структуру и выполняют в клетке сходные функции – участвуют в регуляции процессинга РНК и ее транспорте. Существуют указания на то, что нарушение именно этих функций FUS и TDP-43 является причиной развития заболевания, поэтому все большее внимание стало уделяться роли нарушения метаболизма РНК в патогенезе БАС и ФТД. Однако биохимические различия в свойствах изоформ белка, кодируемых мутантными вариантами гена FUS, в первую очередь, их способности к агрегации, исследованы недостаточно. В работе были исследованы агрегационные свойства aberrантных форм белка FUS человека, которые кодируются некоторыми мутантными вариантами гена, выявленными у пациентов с БАС (Рис. 9, Б). Исследованные мутации локализовались в участке, кодирующем, согласно данным *in silico*, сигнал ядерной локализации. Всего было исследовано четыре изоформы белка со следующими аминокислотными заменами: R524T, R518K, R522G и P525L. Кроме того была создана модельная конструкция для продукции укороченной формы белка FUS (Δ 514-526), в которой сигнал ядерной локализации был полностью удален (Рис. 9, В).

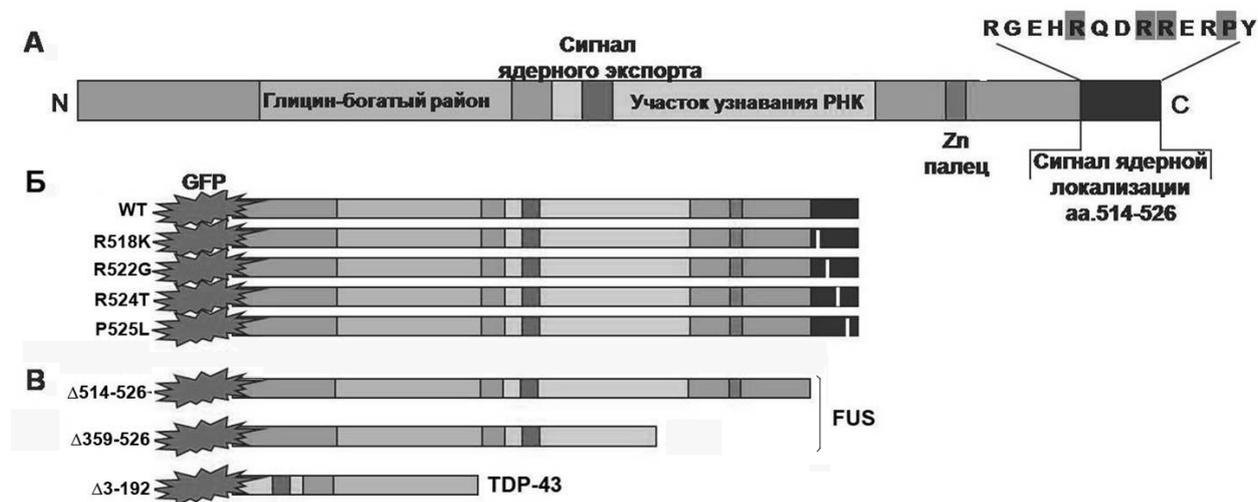
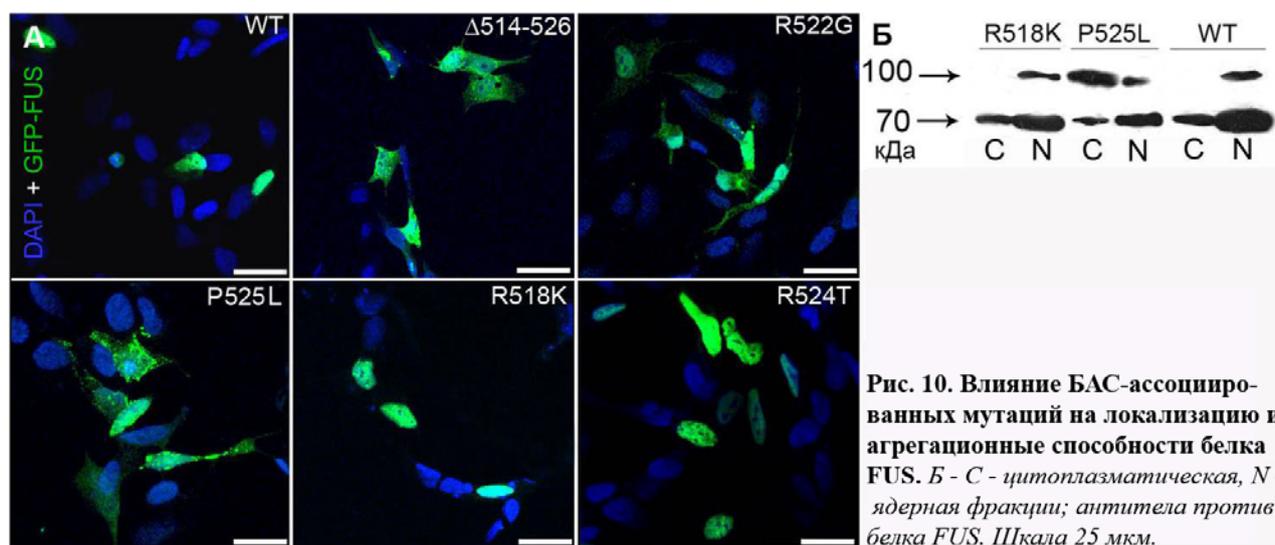


Рис. 9. Структурная организация белка FUS и его модифицированных форм, использованных в исследовании. (А) Доменная структура белковой молекулы FUS. (Б) Варианты рекомбинантных форм белка FUS, продуцируемые при транзиторной трансфекции клеток экспрессионными кассетами: нормальный полноразмерный белок (WT) и четыре мутантных варианта с аминокислотными заменами. (В) Укороченные варианты белков FUS и TDP-43. А и Б – Положения аминокислотных замен в С-концевом участке выделены затемнением или белой полосой.

Было обнаружено, что при сверхэкспрессии FUS дикого типа, а также R524T и R518K в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y рекомбинантные белки локализуются исключительно в ядре, при этом чаще всего они распределены диффузно (Рис. 10, А). Напротив, в клеточных культурах, трансфецированных конструкциями P525L-, R522G- и Δ 514-526-GFP, химерный белок накапливался в основном в цитоплазме в виде агрегатов различного размера и формы. Диффузное распределение белка в этом случае встречалось редко, а агрегированные формы локализовались в основном в непосредственной близости от ядра. Эти результаты были подтверждены при помощи иммуноблоттинга (Рис. 10, Б).



Для объяснения полученных результатов можно предложить две гипотезы. Согласно первой, 13 С-концевых аминокислот – необходимая часть домена, ответственного за транспорт белка в ядро, при этом аминокислотные остатки в положениях 518 и 524 не критичны для нормального функционирования сигнала ядерной локализации, а остатки в положениях 522 и 525 – являются ключевыми для ядерного транспорта FUS. Второе возможное объяснение – aberrantные формы белка P525L и R522G, а также форма, в которой С-концевой участок отсутствует, агрегируют непосредственно после синтеза, поэтому мономерный белок «не успевает» транспортироваться в ядро и детектируется в цитоплазме в виде включений.

На основе имеющихся литературных данных были проанализированы характеристики течения заболевания в зависимости от типа ассоциированной с ним мутации (Табл.1). У пациентов – носителей мутаций R518K и R524T заболевание начинается относительно поздно и характеризуется сравнительно медленной

прогрессией, продолжительность жизни после проявления симптомов в среднем превышает 25 месяцев. При наличии мутаций R522G и P525L, а также делеций R495X и p.G466VfsX14, при которых полностью отсутствует С-концевой участок FUS, заболевание, как правило, начинается рано (до 30 лет), течение болезни более тяжелое и стремительное. Таким образом, по-видимому, существует корреляция между клеточной локализацией мутантного белка, его агрегационными свойствами и возрастом начала заболевания.

Таблица 1. БАС-ассоциированные мутации: характеристики течения заболевания.

Мутация (соответствующая конструкция)	Характеристики мутантной формы		Клиническое течение заболевания *		
	Локализация	Способность к агрегации	Средний возраст дебюта, лет	Скорость прогрессии	Выживаемость, мес
R518K	Ядро	Низкая	40.3 ± 6.6	Медленно	26.7 ± 14.4
R524T	Ядро	Низкая	61.6 ± 4.8	Медленно	32.9 ± 18.2
R522G	Цитопл.	Высокая	28.5 ± 14.8	Медленно	25.1 ± 15.6
P525L	Цитопл.	Высокая	22.0	Быстро	6.0
R495X (Δ514-526)	Цитопл.	Высокая	35.0 ± 16.0	Быстро	14.8
p.G466VfsX14 (Δ514-526)	Цитопл.	Высокая	20.0	Быстро	<24

*Данные литературы.

Агрегационные свойства укороченных форм TDP-43 и FUS. При анализе гистологического материала от пациентов с БАС и ФТД белок TDP-43 в составе включений присутствовал главным образом в модифицированной форме – гиперфосфорилированной, убиквитинированной или укороченной с N-конца (фрагменты ~25 кДа). Напротив, модифицированные формы FUS в составе агрегатов в нервной системе больных БАС и ФТД не были обнаружены. Структурные домены, находящиеся на N-конце TDP-43, в молекуле FUS находятся на С-конце. Таким образом, по своей структуре эти два белка являются «зеркальным отображением» друг друга. В настоящем исследовании были изучены агрегационные свойства укороченного с N-конца TDP-43, соответствующего формам, обнаруживаемым в составе агрегатов у больных БАС и ФТД, и структурно подобного ему белка FUS с укороченным С-концом. В работе использовались генетические конструкции для продукции слитых с GFP укороченных форм TDP-43 и FUS: TDP-43 с делецией аминокислотных остатков с 3 по 192 (TDP-43(Δ3-192)) и FUS – с 359 по 526 (FUS(Δ359-526)) (Рис. 9, В). В трансфицированных клетках GFP-TDP-43(Δ3-192) образовывал ядерные и цитоплазматические убиквитинированные включения

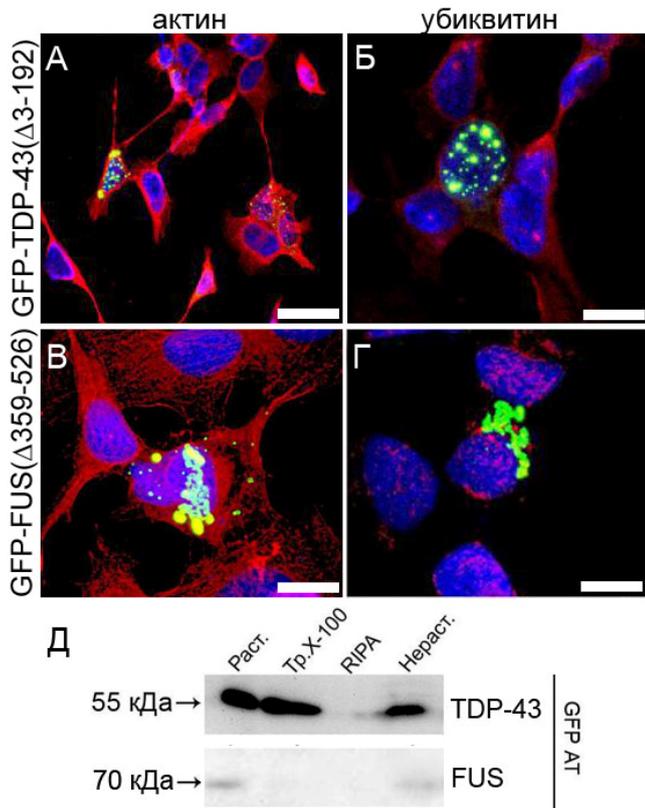
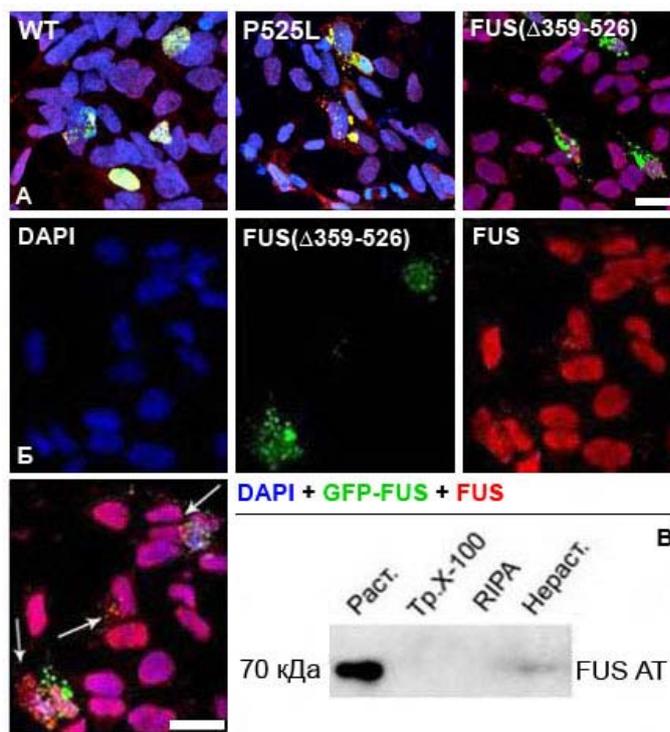


Рис. 11. Морфология и статус убиквитинирования агрегатов, образуемых TDP-43(Δ3-192) (А, Б) и FUS(Δ359-526) (В,Г), и растворимость агрегатов в детергент-содержащих буферах (Д). *GFP AT* – антитела против GFP. Шкала А–25 мкм, Б-Г–15 мкм.

(Рис. 11, А, Б). GFP-FUS(Δ359-526) также обладал высокими агрегационными свойствами, однако все образуемые им включения локализовались в цитоплазме. Кроме того, диффузное распределение белка в клетке было обнаружено в случае GFP-TDP-43(Δ3-192), но не GFP-FUS(Δ359-526) (Рис. 11, В, Г). Включения GFP-FUS(Δ359-526) обнаруживались уже через 4 ч после трансфекции – вероятно,

агрегационные способности этой формы белка, очень высоки, поэтому начинает агрегировать непосредственно после синтеза, не накапливаясь в цитоплазме в мономерной форме. Агрегаты обоих химерных белков не окрашивались антителами против убиквитина (Рис. 11, Б, Г), это согласуется с литературными данными о том, что убикитинирование – позднее событие в формировании TDP-43 и FUS положительных гистопатологических структур. Результаты дифференциального фракционирования подтвердили, что агрегаты GFP-FUS (Δ359-526) и GFP-TDP-43(Δ3-192) являются детергент-нерастворимыми (Рис. 11, Д).

Рис. 12. Детекция эндогенного белка и рекомбинантных форм FUS при помощи антител против С-концевого эпитопа. *GFP-FUS(Δ359-526)* агрегаты, в составе которых присутствует эндогенный белок FUS, указаны стрелками. Шкала: А – WT – 25 мкм, P525L и FUS(Δ359-526) – 20 мкм; Б – 15 мкм.



Таким образом, укороченные формы двух исследованных белков обладают гораздо более высокой способностью к агрегации по сравнению с полноразмерными немутированными белками.

Способность GFP-FUS(Δ 359-526) включать эндогенный FUS в агрегаты. В последнее время было найдено множество свидетельств способности белков, не имеющих определенной третичной структуры и обладающих высокими агрегационными свойствами, к индукции агрегации белковых молекул. Такие белки некоторые исследователи предлагают объединить в группу прионогенных белков ввиду их «инфекционных» свойств, пусть и не так ярко выраженных, как у прионовых белков. Прионовый домен был обнаружен и на N-конце белка FUS (aa.1-239). В связи с высокими агрегационными способностями и присутствием потенциального прионового домена в составе GFP-FUS(Δ 359-526) была изучена способность этой формы белка индуцировать агрегацию нормального эндогенного белка в трансфицированных клетках. Для этого агрегаты, образованные GFP-FUS(Δ 359-526), были исследованы на предмет присутствия эндогенного белка с помощью антител против С-концевого эпитопа FUS. Антитела узнавали как эндогенный белок, локализованный преимущественно в ядре, так и рекомбинантные белки, в том числе и в составе агрегатов. Исключение составлял GFP-FUS(Δ 359-526) – антитела не детектировали образуемые им GFP-позитивные агрегаты (Рис. 12, А). Тем не менее, при дальнейшем анализе удалось обнаружить клетки, в которых некоторые из агрегатов GFP-FUS(Δ 359-526), узнавались С-конец-специфическими антителами (Рис. 12, Б). Полученные результаты были подтверждены с помощью иммуоблоттинга – эндогенный белок с молекулярной массой 70 кДа был обнаружен в детергент-нерастворимой фракции (Рис. 12, В). Таким образом, GFP-FUS(Δ 359-526) действительно способен индуцировать агрегацию эндогенного белка или каким-либо иным образом включать его в состав агрегатов. Возможность индукции агрегации нормального белка FUS изменившими свои агрегационные свойства белковыми молекулами FUS может играть важную роль в патогенезе заболевания: исключение белка из нормального метаболизма и, следовательно, нарушение его функции может иметь крайне неблагоприятные последствия для метаболизма нейронов.

В заключение следует отметить, что разработанные подходы к моделированию молекулярной патологии, характерной для ряда форм БАС и ФТД, являются важным инструментом для изучения механизма развития данных заболеваний и отбора новых препаратов, воздействующих непосредственно на патогенез этих расстройств.

ВЫВОДЫ

1. У трансгенных мышей с повышенным уровнем пан-нейрональной экспрессии амилоидогенного белка гамма-синуклеина (линия *Thy1 μ SN*) выявлена прогрессирующая с возрастом двигательная дисфункция при сохраненной тактильной чувствительности.
2. Сравнительный анализ популяций двигательных и сенсорных нейронов и их волокон у мышей линии *Thy1 μ SN* показал селективную гибель двигательных нейронов и дегенеративные изменения в эфферентных волокнах, сопровождаемые нейровоспалительной реакцией, при этом нейродегенеративных процессов в сенсорных нейронах и их отростках выявлено не было.
3. Хроническое применение препарата Димебон приводит к снижению количества нерастворимых форм гамма-синуклеина в тканях спинного мозга трансгенных мышей линии *Thy1 μ SN*, изменяя при этом соотношение убиквитинированных форм гамма-синуклеина во фракциях растворимых и нерастворимых белков.
4. В трансгенной модели альфа-синуклеинопатии, воспроизводящей характерные черты досимптоматической стадии БП и не затрагивающих двигательные нейроны (линия *aSyn (1-120)*), было показано, что хроническое применение Димебона неэффективно в отношении поведенческих, гистологических и биохимических проявлений патологии, вызванных агрегацией модифицированного альфа-синуклеина.
5. В разработанных клеточных моделях TDP-43 и FUS протеинопатий было показано, что удаление или модификация ответственных за ядерную локализацию доменов у белков TDP-43 и FUS, вовлеченных в патогенез БАС и ФТД, приводит к нарушению клеточной локализации этих белков и накоплению цитоплазматических включений, сформированных их агрегированными формами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бачурин С.О., Устюгов А.А., Петерс О., Шелковникова Т.А., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Блокада нейродегенеративных процессов, вызванных протеинопатией, как новый механизм действия нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих препаратов// Доклады Академии наук: Биохимия и Биофизика. 2009. Т.428, №2. С. 262-265.
2. Кохан В.С., Болкунов А.В., Устюгов А.А., Ванькин Г.И., Шелковникова Т.А., Редкозубова О.М., Стрекалова Т.В., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Направленная инактивация гена, кодирующего гамма-синуклеин, влияет на уровень тревожности и исследовательской активности мышей// Журнал высшей нервной деятельности. 2011. Т.61, №1. С.85-93.
3. Скворцова В.И., Бачурин С.О., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., Почигаева К.И., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А. Новые аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза// Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2011. №2. С.4-9.
4. Ustyugov A., Shelkovnikova T., Ninkina N., Bachurin S. Synucleinopathy is tempered by Dimebon// Journal of Neurochemistry, Abstracts of the 11th International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, 24-27 March, Geneva, Switzerland. 2010. P.81.
5. Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Millership S., Buchman V.L., Ninkina N.N., Bachurin S.O. Dimebon does not affect the phenotype of transgenic mice overexpressing truncated human alpha-synuclein in dopaminergic neurons// Book of Abstracts of the 5th International Interdisciplinary Congress "Neuroscience for Medicine and Psychology", June 5-15. Sudak, Ukraine. 2010. P.308-309.
6. Shelkovnikova T.A., Khritankova I.V., Buchman V.L., Bachurin S.O. and Ninkina N.N. Effects of ALS-associated mutations on the in vivo aggregation and toxicity of human FUS/TLS protein// Book of Abstracts of The EMBO Meeting 2010 September, 4-7, Barcelona, Spain. 2010. P.171.
7. Peters O., Millership S., Shelkovnikova T., Hann A., Van Der Putten H. Buchman V.L., Ninkina N.N. Gamma-synuclein transgenic mice recapitulate pathological

features of amyotrophic lateral sclerosis// Book of Abstracts of Neuroscience 2010, SfN's 40th annual meeting, November 13-17, San Diego, USA. 2010. P.109, S8 462.1.

8. Шелковникова Т.А., Нинкина Н.Н., Бухман В.Л., Бачурин С.О. БАС-ассоциированные мутации влияют на клеточную локализацию и способность к агрегации белка FUS/TLS// Сборник материалов I Международной конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 17-19 ноября, Москва, Россия. 2010. С.60.
9. Шелковникова Т.А., Нинкина Н.Н., Бухман В.Л., Бачурин С.О. Клеточная локализация и способность к агрегации мутантных форм белка FUS// Сборник материалов XXIII Международной зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 7-10 февраля, Москва, Россия. 2011. С. 13.
10. Ninkina N., Ustyugov A., Shelkovnikova T., Khritankova I., Bachurin S. Hindering of proteinopathy-induced neurodegeneration as a new mechanism of action for dimebon. Book of Abstracts of 10th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, March 9-13, Barcelona, Spain. 2011. P. 59.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
БАС	боковой амиотрофический склероз
БДН	болезни двигательного нейрона
БП	болезнь Паркинсона
ГАФДГ	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
кДа	килодальтон
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПФА	параформальдегид
ТГ	тирозингидроксилаза
ФТД	фронтотемпоральная дегенерация

Подписано в печать __.04.2011 г.

Печать трафаретная
Усл.п.л. – 1,5
Заказ № _____
Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(499) 788-78-56
www.autoreferat.ru