

*На правах рукописи*

**Лысикова Екатерина Андреевна**

**НОВАЯ МОДЕЛЬ ФРОНТО-ТЕМПОРАЛЬНОЙ  
ДЕМЕНЦИИ НА ТРАНСГЕННЫХ МЫШАХ С МЕДЛЕННО  
ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ FUS-ПРОТЕИНОПАТИЕЙ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.01.04 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук и ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

**Научные руководители:**

**Нинкина Наталья Николаевна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

**Устюгов Алексей Анатольевич** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биологических испытаний ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

**Пинелис Всеволод Григорьевич** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ "НМИЦ здоровья детей" Министерства здравоохранения РФ.

**Мошковский Сергей Александрович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии МБФ РНИМУ, заведующий отделом персонализированной медицины ИБМХ имени В.Н. Ореховича

**Ведущая организация:** Институт перспективных исследований мозга Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д001.003.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8 С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте <http://niiopp.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 года

**Учёный секретарь**

диссертационного совета Д 001.003.01

кандидат медицинских наук

**Л.Н. Скуратовская**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы и степень разработанности исследования.** Нарушению метаболизма и функции ДНК/РНК-связывающих белков отводится важная роль в патогенезе бокового амиотрофического склероза (БАС) и фронто-темпоральной деменции (ФТД). FUS-реактивные включения обнаруживаются в аутопсийном материале больных с рядом форм БАС и ФТД. При этом неизвестно, чем определяется анатомическая локализация патологического процесса, опосредованного FUS-протеинопатией. Не выявлены и непосредственные молекулярно-клеточные механизмы поражения нейронов коры головного мозга при ФТД, которая является второй по распространённости в мире деменцией с ранним дебютом после болезни Альцгеймера, что делает разработку патогенетической терапии заболевания исключительно актуальной. Использование современных биотехнологий позволило воспроизвести FUS-протеинопатию в генетически модифицированных животных и моделировать фенотип БАС. Однако, создание адекватных моделей ФТД, которые позволят оптимизировать выявление и исследование основных каскадных механизмов, приводящих к поражению нейронов коры головного мозга при FUS-протеинопатии, остается актуальной задачей биомедицинской науки. Ее решение откроет перспективы для определения молекулярных мишеней при разработке стратегии патогенетической терапии ФТД.

**Цель исследования.** Создание трансгенной модели ФТД на основе линии мышей с нейроспецифической

экспрессией патогенной формы белка FUS человека.

### **Задачи исследования:**

1. Провести сравнительное исследование уровней экспрессии трансгенной кассеты и содержания кодируемого ею белка FUS человека в спинном мозге и коре головного мозга мышей новой линии L-FUS[1-359] и оригинальной линии tg\_hFUS[1-359].

2. Охарактеризовать локомоторную и когнитивную функции L-FUS[1-359] мышей.

3. Провести сравнительный анализ транскриптомов L-FUS[1-359] и контрольных животных дикого типа для выявления группы генов, задействованных в механизмах, обеспечивающих эффективное подавление FUS-протеинопатии в нейронах спинного мозга L-FUS[1-359] мышей.

**Научная новизна.** Впервые получены и исследованы трансгенные животные, у которых в экспериментальных условиях произошло инвертирование характерного для оригинальной линии tg\_hFUS[1-359] фенотипа БАС на фенотип ФТД. Впервые было показано, что при снижении экспрессии патогенной формы белка FUS человека в клетках нервной системы могут блокироваться механизмы развития нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах. Впервые исследованы механизмы подавления нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах при экспрессии патогенной формы белка FUS человека. Проведен анализ транскриптомов спинного мозга L-FUS[1-359] мышей, позволивший определить группы генов с изменённой экспрессией и

идентифицировать кодируемые ими белки, которые могут быть вовлечены в активацию собственных внутриклеточных защитных систем двигательных нейронов для купирования FUS-протеинопатии.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Инвертирование фенотипа БАС на ФТД в трансгенных мышцах было достигнуто снижением уровня экспрессии трансгена, кодирующего патогенную форму FUS, и явилось экспериментальным доказательством того, что даже высоко патогенная форма белка FUS не может быть триггером протеинопатии в двигательных нейронах, а для инициации процесса необратимой агрегации FUS необходима определенная критическая концентрация, после которой внутренние защитные механизмы нейрона не способны осуществлять эффективную контролируемую деградацию патогенных форм FUS. Создана новая трансгенная модель ФТД без развития сопутствующей моторной дисфункции. Новая линия L-FUS[1-359] может быть использована в исследованиях для изучения механизма агрегации мутантных белков, а также применена для поиска новых нейропротекторных препаратов с механизмом действия, направленным на сохранение и восстановление функции поврежденных нейронов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработана новая трансгенная модель FUS-протеинопатии в линии мышей L-FUS[1-359] с нейроспецифической экспрессией патогенной формы белка FUS человека, исследована когнитивная функция полученных животных и выявлены нарушения, которые

соответствуют ключевым характеристикам фенотипа ФТД.

2. Сравнительный анализ уровней экспрессии трансгенной кассеты в нервной системе и содержания патогенной формы белка FUS в нейронах L-FUS[1-359] мышей с фенотипом ФТД и мышей оригинальной линии tg\_hFUS[1-359] с фенотипом БАС показал, что при снижении содержания в клетке аберрантного FUS не происходит гибель двигательных нейронов спинного мозга, но происходит инверсия на фенотип ФТД.

3. Исследование транскриптомов спинного мозга L-FUS[1-359] мышей выявило группы генов, которые потенциально могут быть вовлечены в регуляцию собственных защитных механизмов подавления FUS-протеинопатии в двигательных нейронах. Анализ кодируемых выявленными генами белков показал, что компенсаторные механизмы осуществляются путём модуляции процессов клеточной адгезии, организации внеклеточного матрикса, сборки белков, включают регуляцию циркадных ритмов и могут влиять на процессы дифференцировки нейронов.

**Апробация результатов.** По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах (1 статья входит в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 12 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Результаты диссертационной работы были представлены на 10-м Международном форуме по нейронаукам FENS (Копенгаген, Дания, 2016); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных

«Ломоносов-2017» (Москва, Россия, 2017); 21-й Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «БИОЛОГИЯ – НАУКА 21 ВЕКА» (Пущино, Россия, 2017); 19-ой студенческой конференции EURON (Маастрихт, Нидерланды, 2017); «VIII ежегодной конференции молодых учёных ИФАВ РАН» (Черноголовка, Россия, 2018); XXIV Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2018» (Санкт-Петербург, Россия, 2018); 25-ой Международной конференции по нейронауке и биологической психиатрии «STRESS AND BEHAVIOR» (Санкт-Петербург, Россия, 2018); 11-ом форуме по нейронаукам FENS (Берлин, Германия, 2018); XXXI зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2019); «XX зимней молодёжной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии» (Гатчина, Россия, 2019); XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2019» (Санкт-Петербург, Россия, 2019); ежегодной Европейской конференции по лечению БАС ENCALS (Тур, Франция, 2019).

**Личный вклад автора.** Разработка основной научной идеи и планирование исследования выполнено при непосредственном активном участии автора. Все ключевые эксперименты выполнены автором лично. Анализ хромосомной локализации трансгенной кассеты методом флуоресцентной *in situ* гибридизации выполнен автором совместно с S. Woyle в Институте генетики и молекулярной медицины университета Эдинбурга, Великобритания. Биоинформационный анализ был проведен на базе Института

молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (Москва) совместно с С.Ю. Фуниковым и А.П. Резвых.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа содержит: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы, включающий работы на русском (16) и иностранном (237) языках. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 25 рисунками, содержит 2 таблицы.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Линии трансгенных мышей. tg\_hFUS[1-359] с эктопной экспрессией трансгенной кассеты, кодирующей аберрантную форму белка FUS человека, воспроизводящая фенотип БАС. L-FUS[1-359] с экспрессией той же трансгенной кассеты и фенотипом ФТД.

Генотипирование проводили методом конвенционной ПЦР. Сравнительный анализ копийности трансгенной кассеты в геномах tg\_hFUS[1-359] и L-FUS[1-359] мышей проводили на очищенной геномной ДНК в реакции ОТ-ПЦР. В качестве внутреннего контроля использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Анализ экспрессии РНК выполняли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Выделяли тотальную РНК, синтезировали комплементарную цепь в реакции обратной транскрипции и использовали ее в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (все реагенты Евроген, Россия).

Анализ белка проводили методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих специфических первичных



антител и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Детекцию связанных антител осуществляли с помощью реагентов WesternBright Sirius HRP (Advansta).

Патогистологический анализ. Ткани фиксировали в 4% ПФА и после дегидратации заключали в парафиновые блоки в станции Leica EG1160 (Leica Biosystems). Готовили срезы толщиной 8 мкм. Для визуализации мотонейронов применяли окраску по Ниссию в растворе Crezyl violet (Santa Cruz). Для иммуногистохимического окрашивания использовали поликлональные антитела, специфичные к N-концу FUS человека 14080, предоставленные лабораторией D.Cleavland.

Флуоресцентная in situ гибридизация. Готовили препараты метафазных хромосом лейкоцитов костного мозга и гибридизовали с ДНК-пробой плазмидной части трансгенной кассеты, содержащей последовательность FUS человека. Гибридизацию пробы детектировали с помощью Fab-фрагментов антител овцы к антидигоксигенину, меченых флуоресцином (Roche). Для визуализации связывания использовали кроличьи антитела против антидигоксигенина овцы, конъюгированные с FITC (Vector Laboratories). Для окрашивания препаратов метками к индивидуальным хромосомам в состав гибридизационной смеси добавляли готовые хромосомные красители MMU2 (Cambio). Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Zeiss AxioPlan II (Carl Zeiss).

Поведенческое тестирование проводили на группах гомозиготных самцов линии L-FUS[1-359] и контрольных дикого типа в возрасте 5 месяцев. Когнитивные функции исследовали в тестах: индуцированный груминг, тёмно-светлая камера, приподнятый О-лабиринт. Формирование памяти оценивали в тесте моделирование страха,

социальное взаимодействие оценивали в тесте резидент-интродер.

Секвенирование РНК. Выделение тотальной РНК проводили набором RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen) и синтезировали кДНК, используя реагенты Illumina TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Illumina). Одноконцевое секвенирование осуществляли на Illumina NextSeq 500 (Illumina). Для полученных ридов проводили тримминг и картирование на референсный геном мыши. Статистический анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью пакета edgeR, дифференциально-экспрессируемыми считали гены с различиями в абсолютном значении экспрессии в логарифмической шкале  $\geq 1$ .

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.) и GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). В зависимости от размера выборок или конкретных экспериментов применяли статистические критерии Манна-Уитни или дисперсионный анализ ANOVA.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Получение и характеристика линии L-FUS[1-359] мышей**

Линия трансгенных мышей L-FUS[1-359] была получена на основе описанной ранее оригинальной линии tg\_hFUS[1-359] [Дейкин А.В. с соавт., 2014; Shelkovnikova T.A. et al., 2013a] в серии обратных скрещиваний. В нервной системе обеих линий животных экспрессировалась аберрантная форма белка FUS человека с удаленными аминокислотами с 359 по 526, что вело к потере сигнала ядерной локализации и части РНК-связывающего домена. У животных выделенной линии L-FUS[1-359] не развивались клинические симптомы БАС и была существенно увеличена

по сравнению с оригинальной линией продолжительность жизни (рис.1А).

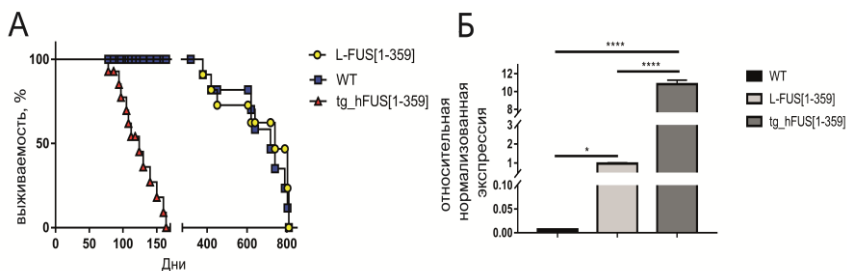


Рисунок 1. Сравнение продолжительности жизни и уровней экспрессии трансгенной кассеты у L-FUS[1-359] и оригинальной линии tg\_hFUS[1-359] мышей.

А: Кривая выживаемости Каплан-Майера. n=24 в каждой группе. Б: Анализ уровней экспрессии трансгенной кассеты в спинном мозге мышей методом ОТ-ПЦР в реальном времени. (\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , тест Манна-Уитни). n=8.

Анализ копияности трансгенной кассеты в геноме L-FUS[1-359] мышей показал, что в семи поколениях обратных скрещиваний она не изменилась по сравнению с оригинальной линией. При этом уровень экспрессии трансгенной кассеты, определенный методом ОТ-ПЦР в реальном времени, был на порядок ниже, чем у tg\_hFUS[1-359] мышей (рис.1Б). Такой уровень экспрессии трансгенной кассеты оказался достаточным для синтеза детектируемых количеств патогенной формы белка FUS (55 кДа) человека в нейронах L-FUS[1-359] мышей (рис.2). Методом иммуноблоттинга было исследовано содержание формы 55 кДа FUS в образцах спинного и головного мозга L-FUS[1-359] и tg\_hFUS[1-359] мышей. У животных линии L-FUS[1-359] было выявлено снижение содержания формы

55 кДа в спинном мозге (рис. 2а) и увеличение в коре головного мозга по сравнению с tg\_hFUS[1-359] (рис.2б).

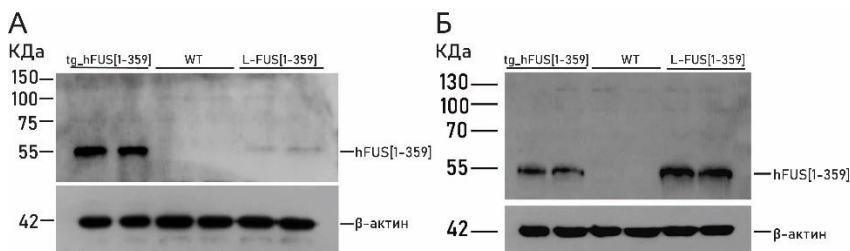


Рисунок 2. Анализ содержания патогенной формы белка FUS человека (55 кДа) у tg\_hFUS[1-359] и L-FUS[1-359] мышей методом иммуноблоттинга в спинном (А) и головном (Б) мозге в возрасте 9 недель. В качестве отрицательного контроля использованы образцы тканей животных дикого типа (WT). Для нормализации количеств нанесенного белка мембраны инкубировали с антителами против б-актина мыши.

### **Патогистологический анализ FUS-реактивных включений в нейронах спинного и головного мозга L-FUS[1-359] мышей**

FUS-протеинопатия оригинальной tg\_hFUS[1-359] линии характеризуется присутствием крупных цитоплазматических и ядерных FUS-реактивных включений, которые детектируются в двигательных нейронах уже на ранних пресимптоматических стадиях и накапливаются по мере прогрессии модельного заболевания [Дейкин А.В. с соавт., 2014; Shelkovnikova T.A. et al., 2013a]. Однако проведенный нами иммуногистохимический анализ не выявил крупных FUS-реактивных включений в нейронах спинного мозга L-

FUS[1-359] мышей (рис. 3). В отличие от tg\_hFUS[1-359] наблюдалось диффузное накопление патогенного белка FUS без признаков его агрегации.

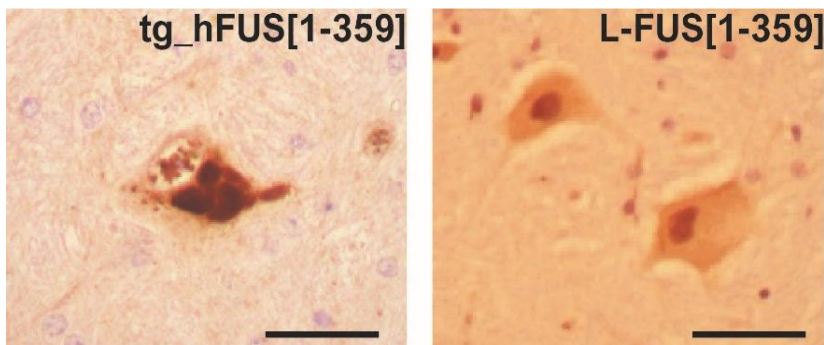


Рисунок 3. Иммуногистохимическое окрашивание нейронов спинного мозга tg\_hFUS[1-359] и L-FUS[1-359] мышей в возрасте 9 недель антителами против FUS человека. Шкала = 50мкм.

Присутствие в нейронах спинного мозга L-FUS[1-359] мышей патогенной формы FUS не вызывало их дегенерацию даже у стареющих животных в возрасте 18 месяцев, что было установлено методом морфометрического анализа нейронов. Более того, патогенная форма FUS человека обнаруживалась в цитоплазме крупных нейронов V слоя коры головного мозга L-FUS[1-359] мышей уже в возрасте 9 недель, она также имела диффузное распределение, а крупные белковые агрегаты отсутствовали (рис. 4).

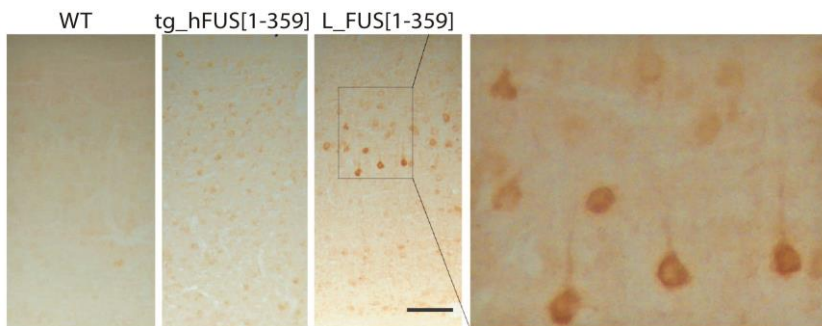


Рисунок 4. Иммуногистохимическое окрашивание срезов фронтальной коры головного мозга животных дикого типа (WT), tg\_hFUS[1-359] и L-FUS[1-359] антителами против FUS человека.

В качестве отрицательного контроля использованы образцы тканей животных дикого типа (WT). Шкала = 100 мкм.

### **Исследование когнитивной функции L-FUS[1-359] мышей**

Увеличение продолжительности жизни L-FUS[1-359] мышей при сохраненном высоком уровне экспрессии патогенной формы белка FUS человека с преимущественно цитоплазматической компартментализацией в нейронах коры головного мозга позволило предположить возможность развития клинической картины фронтотемпоральной деменции. Действительно, изменения показателей уровня тревожности, исследованные в тестах «тёмно-светлая камера» и «О-лабиринт», были выявлены у L-FUS[1-359] мышей уже в возрасте 5 месяцев (рис. 5). У них также обнаруживались признаки нарушения формирования памяти и изменение социального поведения (рис. 6).

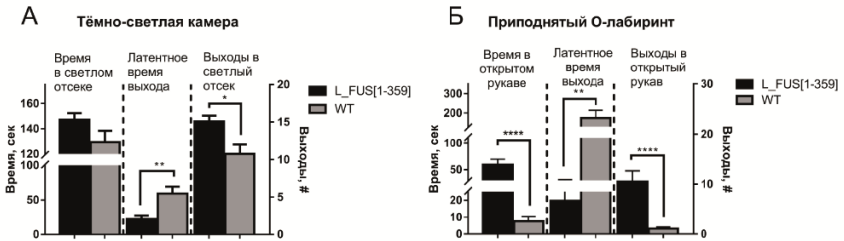


Рисунок 5. Изменение тревожного поведения L-FUS[1-359] мышей в возрасте 5 месяцев.

А: «тёмно-светлая камера»; Б: приподнятый «О- лабиринт».

(\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ . Тест Манна-Уитни).  $n=12$ .

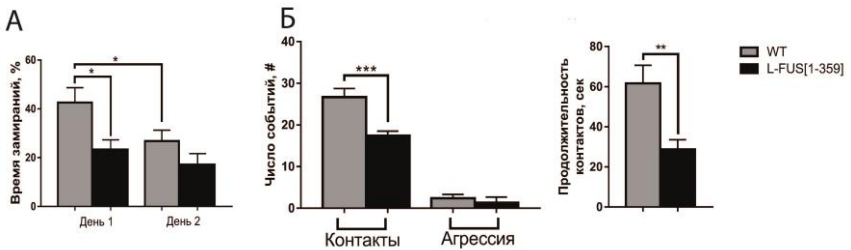


Рисунок 6. Нарушения формирования памяти и социального поведения у L-FUS[1-359] мышей в возрасте 5 месяцев.

А: тест «формирование страха»; Б: тест «резидент-интродер».

(\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ . Тест Манна-Уитни).  $n=12$ .

Совокупность выявленных особенностей поведения L-FUS[1-359] мышей, включающих сниженный уровень тревожности, нарушение формирования и угасания долговременной памяти, а также уменьшение количества и продолжительности социальных взаимодействий, которые считаются важными симптомами ФТД, позволяет

охарактеризовать новую линию как животную модель ФТД.

### **Локализация трансгенной кассеты в геномах tg\_hFUS[1-359] и L-FUS[1-359] мышей**

Снижение уровня экспрессии трансгенной кассеты в нейронах L-FUS[1-359] мышей сопровождалось модуляцией FUS-протеинопатии и инверсией фенотипа модельного заболевания. Такие изменения могли быть следствием изменения положения трансгенной кассеты в геноме, поскольку в многочисленных исследованиях были описаны транслокации гена FUS, являющиеся частыми хромосомными аномалиями, выявленными у пациентов с миелоидными лейкомиями и миксоидной липосаркомой. Для исследования изменения положения трансгена был выполнен хромосомный анализ методом флуоресцентной гибридизации с использованием пробы, комплементарной к последовательности гена FUS человека, который показал, что у оригинальной линии tg\_hFUS[1-359] встраивание трансгенной кассеты в геном произошло на 11 хромосоме, а у животных линии L-FUS[1-359] она картировалась на 12 хромосоме (рис. 7).

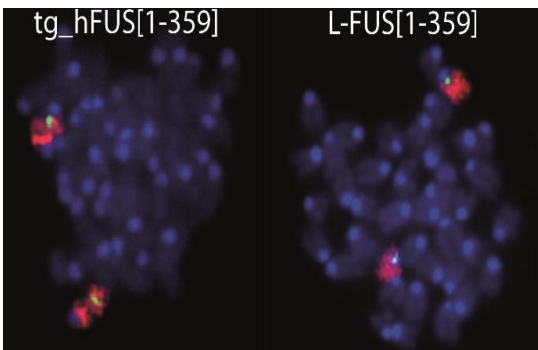


Рисунок 7.  
Картирование трансгенной кассеты на метафазных лейкоцитах костного мозга tg\_hFUS[1-359] и L-FUS[1-359] мышей методом флуоресцентной *in*



*situ* гибридизации. Зелёный сигнал – гибридизация с пробой к FUS человека. Красный сигнал – коммерческие специфические красители для хромосом 12 и 11.

Таким образом, было установлено, что изменение хромосомной локализации трансгенной кассеты сопровождается изменением уровня её транскрипции и замедлением прогрессии нейродегенеративного процесса.

### **Сравнительный анализ транскриптомов спинного мозга L-FUS[1-359] мышей и животных дикого типа**

Отсутствие клинической симптоматики БАС у L-FUS[1-359] мышей может свидетельствовать о недостаточности пороговой концентрации патогенной формы белка FUS для запуска каскадного процесса протеинопатии в двигательных нейронах вследствие эффективности внутриклеточных защитных систем утилизации aberrантного белка. На основании полученных данных гистологического анализа нами было сделано предположение, что активация определенных каскадных механизмов в ответ на повышение концентрации патогенного FUS предотвращала гибель двигательных нейронов спинного мозга у L-FUS[1-359] мышей. Для того, чтобы установить молекулярно-клеточные механизмы, активация и/или подавление которых может компенсировать развитие FUS-протеинопатии в двигательных нейронах, был проведен сравнительный анализ транскриптомов тканей спинного мозга молодых мышей L-FUS[1-359]. В результате были определены группы генов, экспрессия которых изменена по сравнению с контрольными животными дикого типа (рис. 8). Среди

дифференциально-экспрессируемых генов самой многочисленной группой оказалась группа генов, вовлеченных в клеточную адгезию и формирование внеклеточного матрикса: клаудин-19 (*Cldn19*), тенасцин XB (*Tnxb*), стабиллин 1 (*Stab1*), фактор клеточной адгезии (*Vcam*), коллагены (*Coll4a1*, *Coll5a1*, *Coll18a1*), коллаген-связывающие белки (*Tgfb1*, *Nid2*), семафорины (*SEMA3G*, *SEMA4B*, *SEMA5A*) и некоторые другие гены данных семейств.

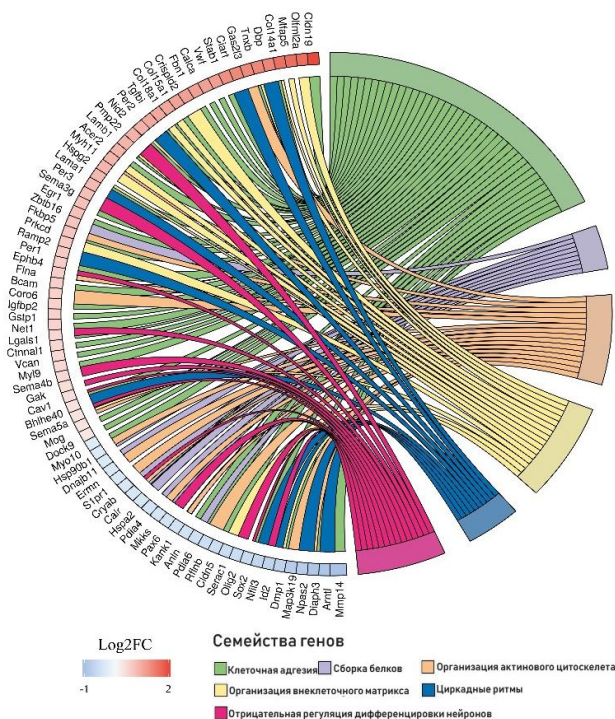


Рисунок 8. Анализ изменения профилей экспрессии генов в тканях спинного мозга L-FUS[1-359] мышей относительно контрольных животных дикого типа.

Повышение уровня экспрессии наблюдалось среди контролирующих циркадные ритмы генов-паралогов транскрипционных факторов *period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*), генов-репрессоров факторов, регулирующих транскрипцию циркадных генов (*CIART*, *BHLHE40*) и гена фактора транскрипции (*DBP*), тогда как экспрессия генов, кодирующих активаторы транскрипции циркадных генов (*ARNTL*, *NPAS2*), снижена, что образует сложный механизм регуляции по типу обратной связи. Экспрессия генов транскрипционных факторов (*SOX2*, *OLIG2*), играющих ключевую роль в дифференцировке нейрональных клеток и детерминации моторных нейронов, была достоверно снижена в спинном мозге животных L-FUS[1-359]. Экспрессия генов, кодирующих белки шапероны и шаперонины (*Hspa2*, *Hsp90b1*, *Dnajb11*, *Cryab*, *Mkks*), протеин-дисульфидные изомеразы (*Pdia4*, *Pdia6*) и  $Ca^{2+}$ -связывающий белок (*Calr*) также снижена. Активированы гены актин-связывающих белков, (*Flna*, *Coro6*, *Diaph*, *Ermn*), миозина (*Myh11*) и белков-компонентов динеинового комплекса (*Dync1i1*, *Dynll1*, *Dnaic1*, *Dnah8*). Выявленные изменения экспрессии, полученные методом секвенирования РНК спинного мозга L-FUS[1-359] мышей, были подтверждены методом ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 9). Были отобраны три группы генов, экспрессия которых оказалась повышенной по результатам РНК секвенирования, пониженной, или не изменилась. Эти группы включали ген основного белка миелина (MPZ), периаксин (Prx), ген альфа-рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPARA), ген рецептора, сопряжённого с G-белком (Gpr179) и

карбогидрат киназы (FGGY). Результаты ОТ-ПЦР подтвердили увеличение экспрессии у L-FUS[1-359] мышей гена основного белка миелина (MPZ), кодирующего трансмембранный гликопротеин, составляющий 50% структуры периферической миелиновой оболочки и гена периаксина (Prx), кодирующего белок, две изоформы которого в комплексе с другими белками участвуют в образовании миелиновой оболочки (рис. 9А).

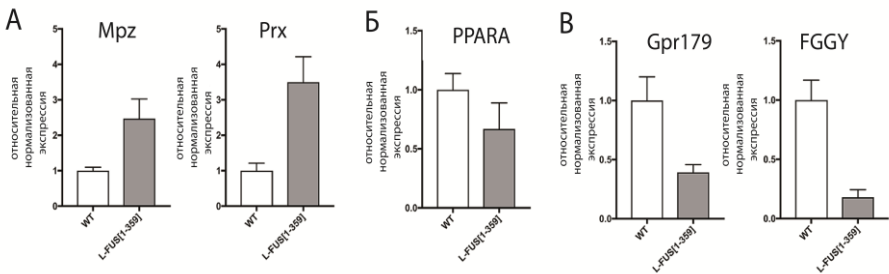


Рисунок 9. Относительные уровни экспрессии мРНК генов *MPZ*, *Prx*, *PPARA*, *Gpr179*, *FGGY* в спинном мозге мышей L-FUS[1-359] и контролей дикого типа.

ОТ-ПЦР в реальном времени транскриптов, для которых при секвенировании РНК были выявлены повышенный (А), неизменённый (Б) и сниженный (В) уровни экспрессии.

Экспрессия *MPZ* по результатам анализа транскриптомов увеличивалась почти в 6 раз, а *Prx* в 4 раза. Экспрессия гена (*PPARA*), который кодирует альфа рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом, являющиеся ключевыми регуляторами метаболизма глюкозы и липидов, контролируют процессы окисления жирных кислот, а также пролиферации и дифференцировки

клеток, не была изменена ни по результатам ОТ-ПЦР, ни по результатам сравнительного транскриптомного анализа в спинном мозге у L-FUS[1-359] и контрольных животных дикого типа (рис. 9Б). Двукратное снижение экспрессии после РНК секвенирования было выявлено для гена GRP179, кодирующего рецептор, сопряжённый с G-белком. Это снижение было подтверждено данными ОТ-ПЦР (рис. 9В). Снижение экспрессии в 7 раз было выявлено для гена карбогидраткиназы (FGGY) и также подтверждено методом ОТ-ПЦР (рис. 9В). FGGY участвует в энергетическом метаболизме клетки и процессе гликолиза. Интересно, что мутации в этом гене ассоциированы со спорадическими случаями БАС в некоторых популяциях.

Идентификация маркерных белков из каскадов, которые составляют защитные механизмы, участвующие в подавлении прогрессии FUS-протеинопатии в двигательных нейронах, имеет важное научно-практическое значение для выявления молекулярных мишеней при разработке патогенетической терапии FUS-протеинопатий. Возможность активации собственных защитных механизмов через регуляцию соответствующих молекулярных каскадов позволит разработать новую стратегию лечения БАС, базирующуюся на воздействии на ключевое звено патогенеза заболевания путем замедления или даже полного подавления прогрессии FUS-протеинопатии.

## **ВЫВОДЫ**

1. На основе оригинальной линии трансгенных мышей tg\_hFUS[1-359] с эктопической экспрессией укороченной

формы белка FUS человека получена новая линия L-FUS[1-359], характеризующаяся сниженным уровнем экспрессии трансгенной кассеты, медленной прогрессией патологического процесса и инвертированным фенотипом.

2. Исследовано содержание и компартиментализация патогенной формы белка FUS человека в различных отделах нервной системы L-FUS[1-359] мышей и показано, что и в спинном мозге, и в коре головного мозга патогенная форма FUS присутствует в меньшем количестве, чем у животных оригинальной линии, и диффузно накапливается в цитоплазме, не образуя включений.

3. Определена хромосомная локализация трансгенной кассеты в геноме L-FUS[1-359] и tg\_hFUS[1-359] мышей и установлено, что инвертирование фенотипа связано с изменением хромосомной локализации трансгенной кассеты при не измененной ее копииности.

4. Выполнен анализ локомоторной функции L-FUS[1-359] мышей, который показал, что наблюдаемый уровень патогенной формы FUS белка в спинном мозге не достаточен для инициации FUS-протеинопатии и развития нейродегенеративного процесса в нейронах спинного мозга.

5. Проведен сравнительный анализ транскриптомов тканей спинного мозга L-FUS[1-359] и контрольных животных дикого типа, в результате которого идентифицированы группы генов и кодируемые ими белки, возможно участвующие в собственных внутриклеточных защитных механизмах подавления FUS-протеинопатии.

6. Охарактеризована когнитивная функция L-FUS[1-359] мышей и выявлены нарушения в виде увеличенной

импульсивности, сниженной тревожности, а также нарушения формирования долговременной памяти и уменьшение социального интереса, которые соответствуют ключевым характеристикам фенотипа ФТД.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Roman A.Yu., Limorenko G., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., **Lysikova E.A.**, Buchman V.L., Ninkina N. Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated Snca gene and Rosa26-stop-lacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6// Transgenic Res. – 2017. – Vol.26(2) . – P.301-307.
2. **Лысикова Е.А.**, Чапров К.Д., Иванова Т.А., Устюгов А.А., Овчинников Р.К., Кухарский М.С., Коршунов Е.А., Дейкин А.В., член-корр.РАН Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Нарушение когнитивной функции у трансгенных мышей со сниженным уровнем экспрессии патогенной формы белка FUS человека// Патогенез. . – 2019. – Т.17. – № 1. – С. 41-49.
3. **Lysikova E.A.**, Kukharsky M.S., Chaprov K.D., Ustyugov A.A., Vasilieva N.A., Deykin A.V., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. Behavioural impairments in mice of a novel FUS transgenic line recapitulate features of frontotemporal lobar degeneration// Genes, Brain and Behavior. – 2019. – Vol. 18(8) . – P. e12607.

### Тезисы докладов

1. Ovchinnikov R., Efimova A., Roman A., **Lysikova E.**, Kukharsky M. Adult hippocampal neurogenesis is affected in the mouse model of FUSopathy. Abstract from the 10<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience. Copenhagen, Denmark, 2-6 July 2016. Abstract number: C002.
2. **Лысикова Е.А.** Разработка новой трансгенной модели фронто-темпоральной дегенерации. В кн.: XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017», тезисы докладов. Москва, Россия. 10-14 апреля 2017 – Секция «Биология». – МАКС Пресс Москва, 2017.
3. **Лысикова Е.А.** Моделирование фронто-темпоральной дегенерации на линии мышей с экспрессией укороченной формы

- белка FUS человека. В кн.: 21-я Международная пушинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. Пушино, Россия. 17-21 апреля 2017. С.:199.
4. **Е. Lysikova**, A. Gorlova, N. Babushkina, J. de Munter, S. de Munter, K.P. Lesch, E. Wolters, D. C. Anthony, T. Strekalova. Behavioral deviations preceding the onset of syndrome features of amyotrophic lateral sclerosis: a study on mice with FUS gene mutation. Abstract from the 19<sup>th</sup> EURON PhD student meeting. Maastricht, Netherlands, 25-26 October 2017. P.: 41.
  5. **Лысикова Е.А.**, Чапров К.Д. Анализ прогрессии нарушения моторной функции на пресимптоматической стадии у трансгенных FUS[1-359] мышей, моделирующих боковой амиотрофический склероз. В кн.: «Актуальные проблемы биомедицины-2018: Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием»: сборник тезисов. Санкт-Петербург, Россия. 12-13 апреля 2018. С.: 150.
  6. Trofimov A., de Munter J., **Lysikova E.**, Veniaminova E., Gorlova A., Wolters E., Klimenko V.M., Lesch K-P, Strekalova T. Behavioral alterations and response to systemic inflammation in mice with the FUS gene mutation, a new model of amyotrophic lateral sclerosis. Abstract from the 25<sup>th</sup> International "STRESS AND BEHAVIOR" Neuroscience and Biopsychiatry Conference. Saint-Petersburg, Russia, 16-19 May 2018. Book of abstracts «STRESS, BRAIN AND BEHAVIOR», Vol8: P.:49-50.
  7. **Lysikova E.A.** Partial silencing of the transgene in FUS[1-359] mice ameliorates pathology and elicit age-related behavioral changes. Abstract from the 11<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience. Berlin, Germany.7-11 July 2018. Abstract number: 1727.
  8. **Лысикова Е.А.** Трансгенная модель ФТЛД с нейроспецифической экспрессией укороченной формы белка FUS человека. В кн.: VIII конференция молодых ученых ИФАВ РАН: сборник тезисов. Черноголовка, Россия. 14 декабря 2018. С.: 8.
  9. **Лысикова Е.А.**, Чапров К.Д., Тетерина Е.В. Исследование нарушений когнитивной функции у трансгенных мышей, моделирующих FUS-протеинопатию с экспрессией укороченной формы белка FUS человека. В кн.: XXXI Зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической



- биологии и биотехнологии": сборник тезисов. Москва, Россия. 11-14 февраля 2019. С.:19.
10. **Лысикова Е.А.**, Тетерина Е.В., Чапров К.Д. Новая сублиния трансгенных мышей с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией. В кн.: Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии: сборник тезисов. Гатчина, Россия. 25 февраля-2 марта 2019. С.: 170.
  11. **Лысикова Е.А.** Трансгенная линия мышей с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией как модель фронто-темпоральной дегенерации. В кн.: Актуальные проблемы биомедицины-2019: Материалы XXV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием: сборник тезисов. Санкт-Петербург, Россия. 28-29 марта 2019. С.: 131.
  12. **Lysikova E.A.**, Ninkina N, Buchman V.L. Behavioural impairments in transgenic mice expressing C-terminally truncated human FUS. Abstract from the ENCALs meeting. Tours, France. 15-17 May 2019. P.: 48.

### **A new model of frontotemporal dementia in transgenic mice with the slow progression of FUS proteinopathy**

Malfunction of DNA/RNA-binding protein FUS and its pathological aggregation causes certain forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia (FTD). Previously we have described transgenic mouse line expressing high level of a C-terminally truncated human FUS protein (FUS 1-359), which caused FUSopathy with ALS phenotype. In order to identify how the nervous system responds to low levels of pathogenic variants of FUS we produced and characterised a mouse line, L-FUS[1-359], with a low level of neuronal expression of C-terminally truncated FUS. Immunohistochemistry with antibody specific for N-terminal fragment of human FUS revealed diffuse pattern of staining in the cytoplasm of neurons of L-FUS[1-359] mice but most profound accumulation of the truncated human FUS was observed in neurons of frontal cortex. This might explain behavioural changes observed in these mice. In a set of tests 5-month old mice displayed certain behavioural abnormalities, including increased impulsivity, decreased anxiety and compromised social interaction, that recapitulate behaviour characteristics typically seen in FTD patients.