

На правах рукописи

Овчинников Руслан Константинович

Создание и характеристика новой трансгенной модели бокового амиотрофического склероза, основанной на нейроспецифической экспрессии патогенной формы белка FUS

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научный руководитель:

Нинкина Наталья Николаевна

Доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов ИФАВ РАН.

Официальные оппоненты:

Меркулов Юрий Александрович

Доктор медицинских наук, врач-невролог Неврологического центра им. проф. Б.М. Гехта НУЗ ЦКБ №2 им. Н.А. Семашко ОАО «РЖД»

Захарова Мария Николаевна

Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего отделением, ФГБНУ «Научный центр неврологии»

Ведущее учреждение: Российский университет дружбы народов

Защита состоится «4» декабря 2015 года в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.003.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская,8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИ ОПП»
Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИ ОПП» www.niioff.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Л.Н. Скуратовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Боковой амиотрофический склероз (БАС) является третьим по частоте встречаемости нейродегенеративным заболеванием в мире с частотой возникновения 1,5-2,5 на 100 000 в год. Непосредственные молекулярные механизмы, лежащие в основе патологических процессов, ведущих к селективной гибели двигательных нейронов, остаются недостаточно изученными. Это является главной причиной отсутствия прогресса в разработке эффективных методов лечения бокового амиотрофического склероза, тяжелого летального заболевания нервной системы. Актуальной задачей до настоящего времени остается создание адекватных животных моделей, в которых возможно воспроизведение основных характеристик патогенеза БАС и выявление ключевых молекулярных мишеней для разработки патогенетической терапии данного заболевания. Полученные в различных лабораториях данные о возможном участии ДНК/РНК-связывающего белка FUS в патогенезе БАС послужили основой для создания гипотезы о его важной роли в патологических механизмах избирательного повреждения двигательных нейронов. Эта гипотеза требовала прямых экспериментальных доказательств. Моделирование FUSопатии, которая приводит к развитию у трансгенных животных фенотипа, воспроизводящего основные патогенетические признаки БАС, является наиболее убедительным методом доказательства ключевой роли белка FUS в инициации и прогрессии патологического процесса, характерного для данного заболевания. Именно эта актуальная задача и была выбрана для диссертационного исследования.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью данной работы являлось получение экспериментальных доказательств того, что направленное нарушение структуры и функции белка FUS, приводящее к

развитию FUSопатии, может быть достаточным для воспроизведения патогенетической цепи событий, приводящей к селективной гибели двигательных нейронов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить линию трансгенных мышей с нейроспецифической эктопической экспрессией аберрантной формы белка FUS человека;
2. Охарактеризовать прогрессию FUSопатии, вызванную эктопической экспрессией аберрантной формы FUS человека;
3. Провести анализ динамики нейродегенеративного процесса в спинном мозге трансгенных мышей;
4. Описать клинические проявления и особенности течения модельного заболевания, вызванного прогрессией FUSопатии у трансгенных мышей.

Научная новизна работы. Недавно проведенные широкомасштабные медико-генетические исследования позволили выявить мутации в ДНК/РНК-связывающих белках FUS и TDP-43, которые ассоциированы с рядом наследственных форм БАС. Изучение патологии метаболизма РНК, в регуляцию которого вовлечены белки FUS и TDP-43, является в настоящий момент центральным предметом многочисленных исследований молекулярных механизмов специфического поражения двигательных нейронов, однако прямые доказательства их причинной роли отсутствовали. В данной диссертационной работе впервые получены прямые доказательства центральной роли FUSопатии в развитии нейродегенеративного процесса, характеризующегося специфической потерей двигательных нейронов. Создана первая модельная линия трансгенных мышей, в которых эктопическая экспрессия укороченной формы белка FUS человека 1-359 позволила воспроизвести классическую FUSопатию. Впервые экспериментально доказано, что прогрессия FUSопатии у Thy-1/FUS 1-359 мышей вызывает развитие нейродегенеративного процесса с селективной потерей двигательных

нейронов, то есть путем экспрессии аберрантной формы белка FUS, без участия каких-либо других патогенных факторов, удалось воспроизвести в лабораторных мышах основные патогенетические признаки БАС. Получены новые данные, позволяющие рассматривать образование аберрантной укороченной формы белка FUS в качестве оригинальной молекулярной мишени для разработки патофизиологической терапии определенных форм БАС.

Теоретическая и практическая значимость. Воспроизведение основных характеристик БАС в трансгенных модельных животных позволяет расширить возможности изучения патогенеза заболевания и оптимизировать разработку методов его коррекции. Данное диссертационное исследование, результатом которого явилась разработка и характеристика животной трансгенной модели БАС, существенно расширило современные представления о патогенезе и особенностях прогрессии тех форм БАС, где на первый план выступает нарушение структуры и функции белка FUS. Теоретическая значимость полученных результатов заключается в первую очередь в доказательстве положения, что нарушение функции одного лишь белка FUS, приводящее к развитию FUSопатии, достаточно для инициации и воспроизведения всей патогенетической цепи, заканчивающейся селективной гибелью двигательных нейронов. Практическую ценность представляет получение линии трансгенных мышей Thy-1/FUS 1-359, которая может быть использована для разработки и тестирования новых соединений, действие которых направлено на коррекцию нарушенной функции белка FUS.

Положения, выносимые на защиту.

1. Получены прямые доказательства центральной роли FUSопатии в развитии нейродегенеративного процесса, характеризующегося специфической потерей двигательных нейронов.

2. Создана модельная линия трансгенных мышей, у которых путем нейроспецифической экспрессии укороченной формы белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации и нарушенным сайтом РНК-связывания индуцирована классическая FUSопатия.

3. У созданной линии трансгенных мышей Thy-1/FUS 1-359 описано модельное заболевание, воспроизводящее основные клинические и патогистологические характеристики БАС.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены: на V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, Россия, 2012), на XIX межгородской конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии – 2013» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), на 17-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых, (Пущино, Россия, 2013), на I Национальной конференции с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике» (Москва, Россия, 2014), на Международной молодежной научной конференции "Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии" (Томск, Россия, 2014), на 3 европейской конференции по медицинским и биологическим наукам (Вена, Австрия, 2014), на 14 конгрессе по неврологии Азии и Океании (АОСН 2014) (Макао, Китай, 2014).

Публикации и личный вклад автора. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 статей и 7 публикаций в сборниках докладов научных конференций. Личный вклад автора заключается в участии в разработке научного плана исследования, непосредственном получении основных экспериментальных результатов и их интерпретации. Автор принимал непосредственное участие на всех этапах работ, сделанных в соавторстве с другими исследователями и участвовал в написании научных публикаций, в которые вошли данные его диссертации.

Структура и объём работы. Диссертация содержит: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель, включающий работы на русском (20) и иностранных языках (260). Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста и содержит 3 таблицы и 30 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Линии мышей. Для получения трансгенной линии Thy-1/FUS 1-359 использовали гибридов первого поколения на генетическом фоне CBA×C57Bl6. В экспериментах по исследованию фенотипа полученных мышей использовали потомство второго поколения от возвратного скрещивания с аутбредной линией CD1.

Манипуляции с ранними эмбрионами и хирургические процедуры. Ранние эмбрионы на стадии пронуклеуса высвобождали из яйцеводов гормонально стимулированных и синхронизированных самок-доноров и использовали для микроинъекций в их пронуклеус раствора ДНК линеаризованной плазмидной ДНК в концентрации 5 нг/мкл, содержащей трансгенную кассету. Реимплантацию выживших эмбрионов проводили ложнобеременным самкам-реципиентам. Хирургические манипуляции проводили под общей анестезией после внутрибрюшинно введения раствора авертина в дозе 0,3 мг на 1 г веса.

Биохимические и молекулярно-биологические методы. Плазмидную ДНК выделяли с помощью наборов QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen). Детекцию трансгенной кассеты в геноме мышей проводили методом конвенционной ПЦР ДНК из биопсий уха животных, праймеры: Thy1_rev 5'–AGAAGCAAGACCTCTGCAGAG–3' и hFus_for 5'–TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT–3'. Фрагменты анализировали электрофорезом в 2% агарозном TAE геле. Белковый анализ проводили в денатурирующем гель-электрофорезе по Лэммли с последующим

переносом на поливинилденфторидную мембрану Hybond-P (Amersham) методом полусухого электроблоттинга и иммунодетекцией с соответствующими антителами в 4% растворе обезжиренного сухого молока на Трис-Твин буфере. Использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и проводили детекцию с помощью реагентов ECL Plus (Amersham) с последующей оценкой интенсивности хемилюминесценции на рентгеновской пленке. Для денситометрического анализа рентгенограмм использовали BioSpectrum AC Chemi HR410 и программное обеспечение Vision Works LS (UVP, Великобритания).

Патогистологический анализ. Для приготовления гистологических срезов животным перед забором тканей проводили транскардиальную перфузию 4%-ным раствором парафармальдегида под терминальной анестезией. После фиксации, отмывки и дегидратации тканей в серии спиртов повышающейся концентрации и хлороформа образцы заключали в парафиновые блоки в системе Leica EG1160 (Leica Biosystems). Срезы толщиной 8 мкм получали на ротационном микротоме Leica RM2265 и монтировали на предметные стекла. Перед окрашиванием срезы депарафинизировали в ксилоле и проводили их регидратацию в серии спиртов понижающейся концентрации. Для визуализации мотонейронов применяли окраску по Нисслю в растворе Cresyl violet (Santa Cruz), проводили дегидратацию, очищали ксилолом и заключали в синтетическую среду BioMount (BioOptica). Стереологический подсчет нейронов выполняли на пяти лентах, состоящих из серийных срезов, которые располагали рядами. Мотонейроны подсчитывали отдельно для каждого рога спинного мозга с третьего по пятый поясничные сегменты (L3–L5) в паре срезов, разделенных расстоянием 0,800 мм: всего 10 пар. Для коррекции ошибки, обусловленной тем, что размер нейрона превышает толщину микротомного среза, отдельно считали ядра и вводили поправку Аберкромби. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили

после демаскировки антигенов кипячением в цитратном буфере, содержащем 2.94 % цитрат натрия трехосновный дигидрат, 0,05 % Твин20 (pH 6,0). Неспецифическое связывание блокировали инкубацией с 10% сыворотками лошади или козы в ФСБ. Реакции с первичными и вторичными антителами, а также все отмывки проводили в 1% этих же сывороток в растворе ФСБ. Использовали флюоресцентно меченые вторичные антитела Alexa Fluor® 488, 1:2000 (Life Technologies), для окраски ядер применяли DAPI, (Sigma). Препараты монтировали с использованием среды ImmuMount (Life Technologies) или DPX (BDH). В случае использования HRP-конъюгированных вторичных антител сначала проводили погашение активности эндогенных пероксидаз инкубацией в 3% H₂O₂ в метаноле.

Антитела. Первичные антитела: против FUS (mouse monoclonal, BD Biosciences, NJ, USA, #611385, IHC: 1:500; rabbit polyclonal, Pro- teintech, IL, USA, #11570-1-AP, IHC: 1:500; rabbit polyclonal, Bethyl Laboratories, TX, USA, #A300- 302A, WB: 1:1000); GFAP (rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich, #G-9269, IHC: 1:500); убиквитина (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnologies, #sc-8017, IHC: 1:100); нейрофиламента N (mouse monoclonal, Millipore, MA, USA, #MAB377, IHC: 1:1000); нейрофиламента L и нейрофиламента M (Sigma Aldridge, США, 1:1000), анти-Iba1 (Abcam, США, 1:1000) для детекции микроглии; актина (β-actin (mouse monoclonal, Sigma- Aldrich, #A5441, WB: 1:3000). Вторичные антитела: биотинилированные козы или лошадиные антитела против IgG мыши или кролика (Vector Laboratories, 1:1000) или Alexa Fluor-conju- gated antibodies (Invitrogen, 1:1000).

Инструментальные методы анализа двигательной функции. Тестирование походки проводили в узкой камере длиной 50 см, дно которой выстилали линованой бумагой. На передние и задние конечности наносили синие и красные соответственно нетоксичные чернила. Для анализа координации эффективности использования конечностей применяли модифицированный

аппарат с вращающейся 10 об/мин платформой размером 80×45×5 мм. Оценку мышечной силы передних конечностей у мышей выполняли на грипометре (Grip Strength Test). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.) и GraphPad Prism 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании механизмов протеинопатий, ассоциированных с БАС, был описан новый тип молекулярно-клеточной патологии, обусловленный нарушением функции ДНК/РНК-связывающего белка FUS и его неспособностью формировать физиологически активные и легко диссоциирующие комплексы с РНК. Вместо этого наблюдалось образование стабильных внутриклеточных включений, не содержащих РНК, в составе которых был депонирован агрегированный белок FUS с измененной конформацией. При этом менялась компартментализация FUS и накопление его в цитоплазме, что указывало на возможную роль этого белка FUS в патогенезе нейродегенерации двигательных нейронов. Важным аргументом в пользу того, что ключевым событием в патогенезе БАС могут являться нарушения функции FUS, служили данные генетического анализа пациентов с наследственными формами с мутациями в этом гене. Однако прямые доказательства причинной роли белка FUS в механизмах специфической дегенерации двигательных нейронов отсутствовали. Более того, анализ созданных в различных лабораториях FUS трансгенных животных показал, что не всякий тип нарушения функции FUS приводит к развитию нейродегенеративного процесса. Выработка экспериментального подхода в данном диссертационном исследовании базировалась на выдвинутой нами гипотезе, согласно которой специфическое изменение структуры белковой молекулы FUS по типу патогенной формы сходного белка TDP-43, обнаруживаемой в составе патогенетических включений в

аутопсийном материале больных с БАС, позволит воспроизвести FUSопатию в трансгенных мышцах, которая должна привести к развитию нейродегенеративного процесса в двигательных нейронах. Нами была отобрана модифицированная форма белка FUS 1-359, у которой отсутствовал сигнал ядерной локализации и были повреждены РНК распознающий и РНК связывающий домены, что вело к нарушению его взаимодействия с РНК и перераспределению белка в клетке с накоплением в цитоплазме (Рис. 1). Следует отметить, что в последовательностях гена, кодирующих эти участки белка FUS, было обнаружено наибольшее число мутаций, ассоциированных с наследственными формами БАС.

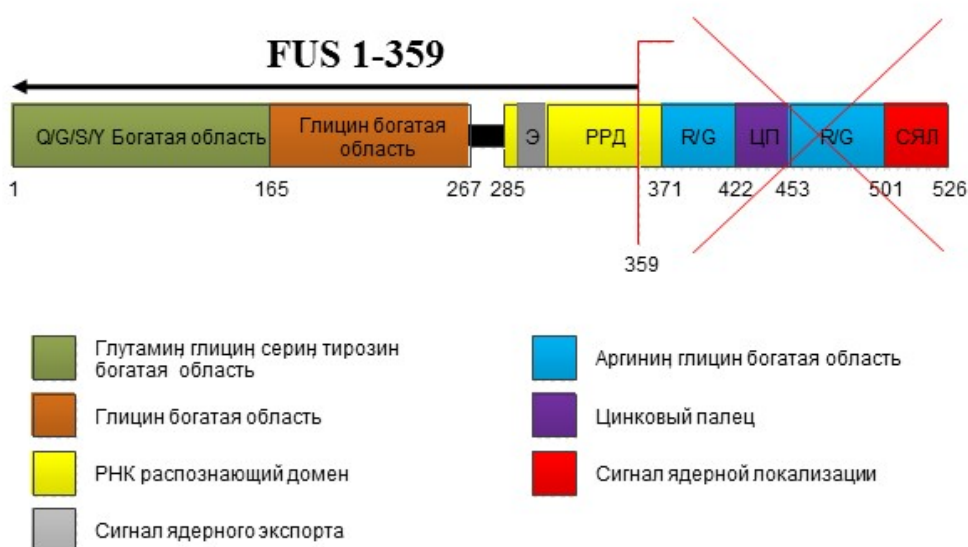


Рисунок 1 – Доменная структура белка FUS человека: зачеркнут участок, который был удален при конструировании трансгенной кассеты.

Трансгенная кассета была сконструирована на основе вектора 323_PTSC-21K человека. Использование промотора Thy-1 обеспечило преимущественно нейроспецифическую экспрессию трансгенной кассеты. Трансгенная кассета была микроинъецирована в пронуклеус ранних эмбрионов мыши и получено поколение животных с модифицированным геномом в двух независимых линиях (№6 и №19), в которых введенная

модификация передавалась по наследству (Рис. 2). В данной работе была использована линия, полученная от фаундера №19.

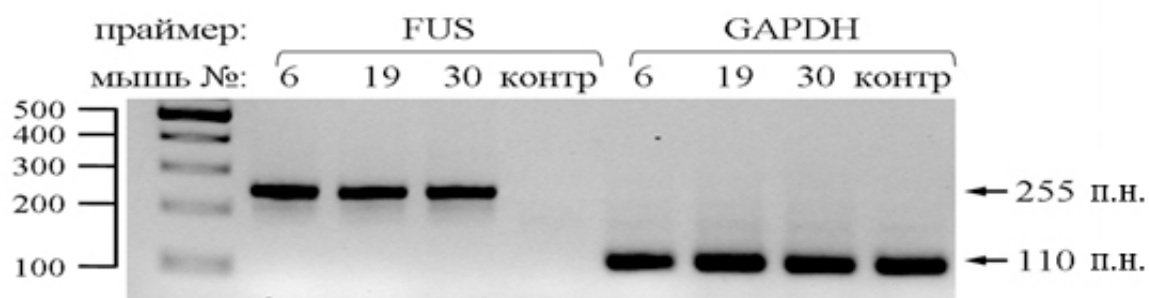


Рисунок 2 – Детекция трансгенной кассеты в геноме мыши методом ПЦР. ДНК от фаундеров №6 и №19 и потомков первого поколения из одного помета от фаундера №19, содержащего (особь №30) и не содержащего (контр) трансгенную кассету.

Анализ белка из тканей спинного мозга, ствола и коры головного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей подтвердил присутствие укороченной aberrантной формы белка FUS человека, которая кодировалась трансгенной кассетой (Рис. 3).

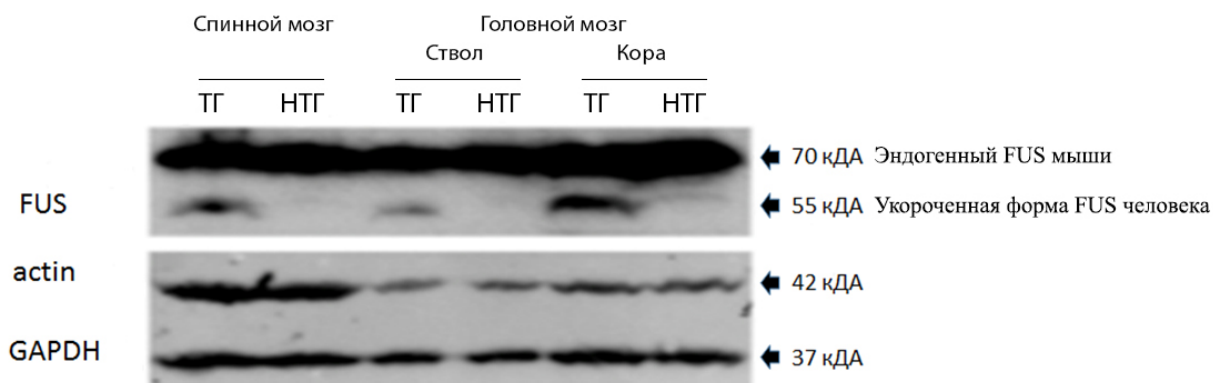


Рисунок 3 – Содержание укороченной формы белка FUS человека в тканях нервной системы Thy-1/FUS 1-359 мышей.

Существенным преимуществом полученной модели являлось развитие патологического фенотипа при исключительно низком содержании трансгенного белка человека, которое было достаточным для инициации и развития нейродегенеративного процесса. Часть мышей была

переведена на другой генетический фон путем обратного скрещивания с аутбредной линией лабораторных мышей CD1. Животные линии Thy-1/FUS 1-359, как на оригинальном гибридном генетическом фоне C57BL/6xCBA, так и во втором поколении после возвратных скрещиваний с CD1, рождались без внешних признаков патологии: они нормально развивались, были фертильны и оставляли жизнеспособное потомство. С возрастом у них проявлялись признаки развития нейродегенеративного процесса, выраженность и динамика которых не зависела от генетического фона линии Thy-1/FUS 1-359. Первые признаки, наиболее часто выражавшиеся в прогрессирующих односторонних парезах задних и передних конечностей, отмечались у взрослых половозрелых животных, начиная с возраста 10-12 недель (Рис. 4).



Рисунок 4 – Фенотипические проявления нейродегенеративного процесса у трансгенных Thy-1/FUS 1-359 мышей.

Неврологическая симптоматика развивалась стремительно на фоне хорошего общего здоровья мышей, модельное заболевание характеризовалось быстрой прогрессией и часто даже инструментальными методами не удавалось выявить у животных отклонения, предшествующие

переходу из пресимптоматической в симптоматическую стадию (Рис. 5). Не позднее, чем через две недели после выявления первых симптомов заболевание переходило в терминальную стадию с тетраплегией и к возрасту 25 недель все трансгенные животные погибали.

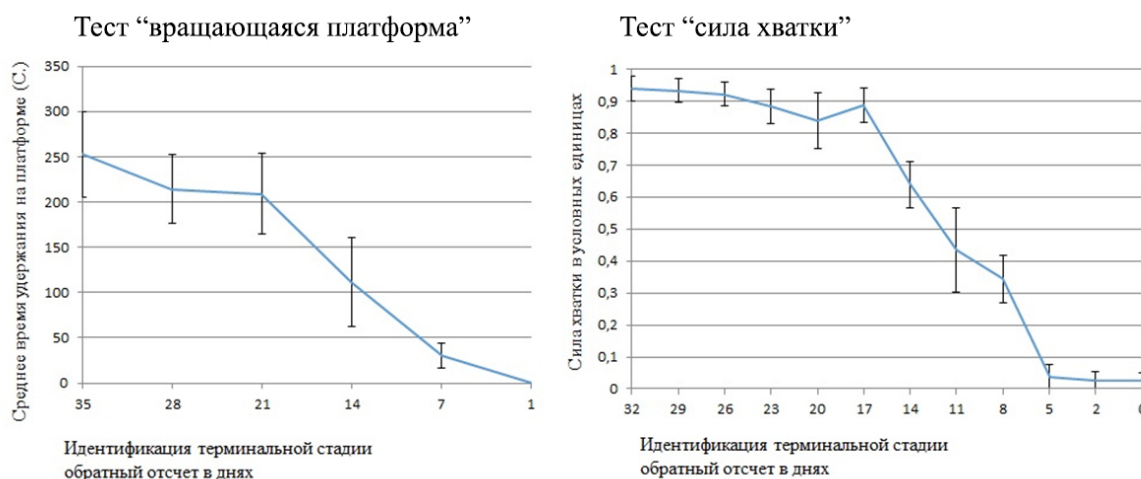


Рисунок 5 – Инструментальный анализ двигательной функции у Thy-1/FUS 1-359 мышей на симптоматической и терминальной стадиях модельного заболевания.

Важным элементом доказательства нашей гипотезы о ключевой роли FUSопатии в развитии специфического нейродегенеративного процесса с преимущественным поражением двигательных нейронов явился патогистологический анализ FUS-реактивных включений в спинном мозге Thy-1/FUS 1-359 мышей, выявивший присутствие в составе включений эндогенного полноразмерного белка FUS мыши (Рис. 6). Таким образом было показано, что аберантная форма FUS (1-359) человека способна индуцировать агрегацию эндогенного FUS мыши и увлекать его в состав патогистологических депозитов, т.е. инициировать протеинопатию. Исключение белка в результате индуцированной агрегации из нормального метаболизма и его последующая функциональная недостаточность приводит к необратимым патологическим изменениям.

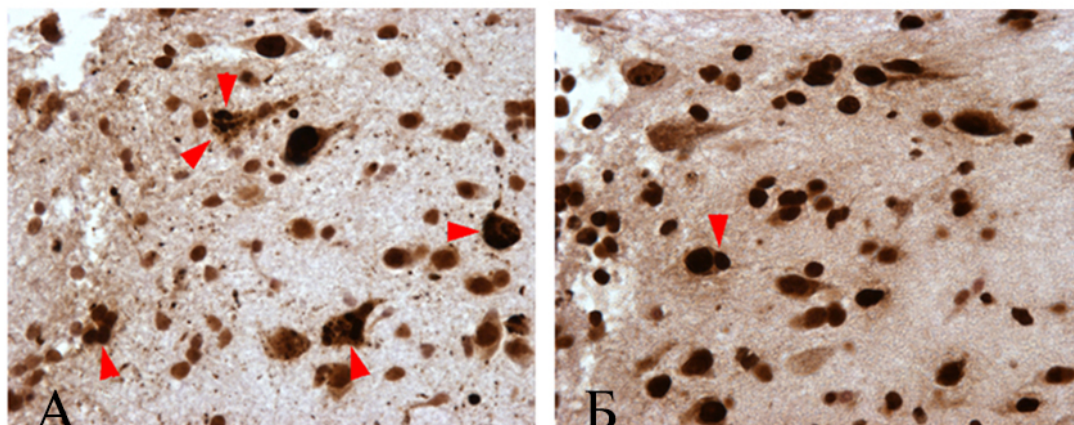


Рисунок 6 – Иммуногистохимическое окрашивание FUS-реактивных включений в нейронах передних рогов спинного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей антителами против N-концевой части белка FUS человека (А) и С-концевой части белка FUS мыши (Б). Увеличение 200х.

У Thy-1/FUS 1-359 мышей были выявлены отдельные убиквитин-положительные агрегаты FUS, однако существенная часть включений не окрашивалась антителами против убиквитина, что характерно для FUSопатии и отличает ее от TDP-43 протеинопатии (Рис. 7).

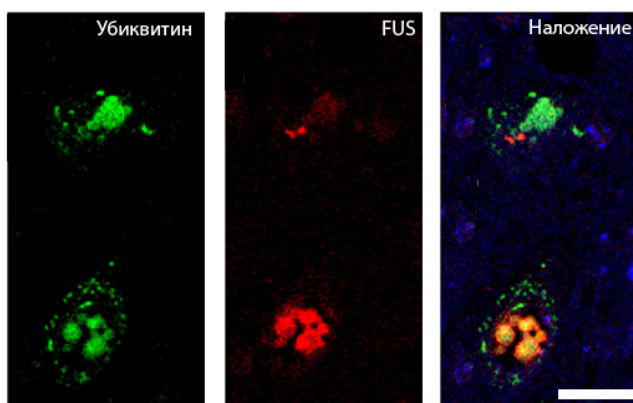


Рисунок 7 – Анализ статуса убиквитинирования FUS-реактивных включений в нейронах Thy-1/FUS 1-359 мышей.

Двойное иммуногистохимическое окрашивание. Шкала 50 мкм.

По-видимому, нарушение эффективности работы убиквитин-протеасомной системы не является основным патогенетическим фактором в данном типе FUSопатии, при этом может вносить определенный вклад в прогрессию нейродегенеративного процесса. Важным свойством белковых агрегатов, образующихся при протеинопатиях, является их повышенная устойчивость к действию протеолитических ферментов. Действительно,

формируемые в нейронах передних рогов спинного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей FUS-реактивные включения оказались устойчивы к протеиназе К (Рис. 8). Таким образом, в созданной нами мышинной трансгенной модели с нейроспецифической экспрессией aberrантной формы белка FUS человека впервые удалось воспроизвести ключевые признаки FUS-протеинопатии.

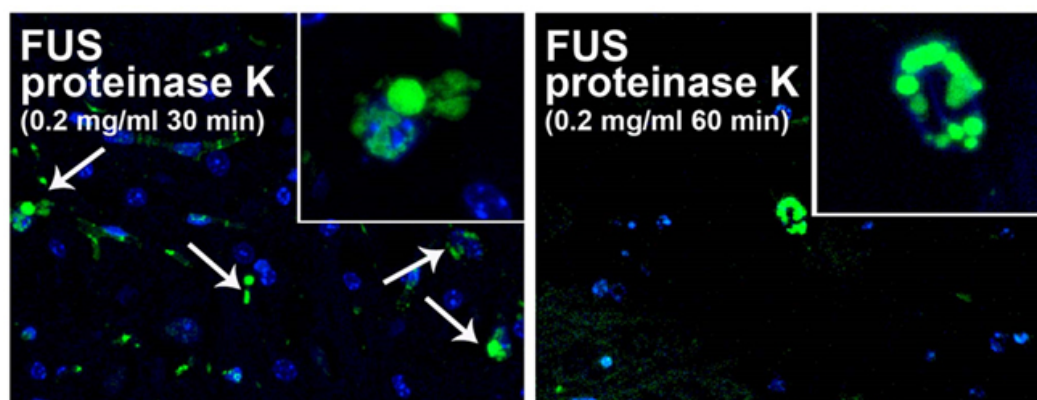


Рисунок 8 – Устойчивость FUS-реактивных включений к обработке протеиназой К. Иммуногистохимическое окрашивание антителами против FUS человека (зеленый); ядра клеток визуализированы DAPI (синий).

Для доказательства прямой связи прогрессии FUSопатии с развитием дегенеративного процесса в двигательных нейронах и их гибелью был проведен сравнительный морфометрический анализ нижних двигательных нейронов у модельных животных на разных стадиях FUSопатии. Подсчет здоровых альфа-мотонейронов проводили во всем объеме участка переднего рога спинного мозга между сегментами L3 и L5 поясничного отдела, длина участка составляла около 800 микрон. Пример локализации анатомической зоны и метода идентификации альфа-мотонейронов на гистологических срезах приведен на Рис. 9, а на Рис. 10 представлены результаты их морфометрического анализа у Thy-1/FUS 1-359 мышей при прогрессии FUSопатии. Во всех исследованных образцах уже на поздней пресимптоматической стадии отмечалась статистически достоверное ($p < 0,05$) уменьшение числа двигательных нейронов, их количество уменьшалось почти на 40% по сравнению с нетрансгенными контрольными

животными, а на терминальной же стадии гибнет более 90% двигательных нейронов.

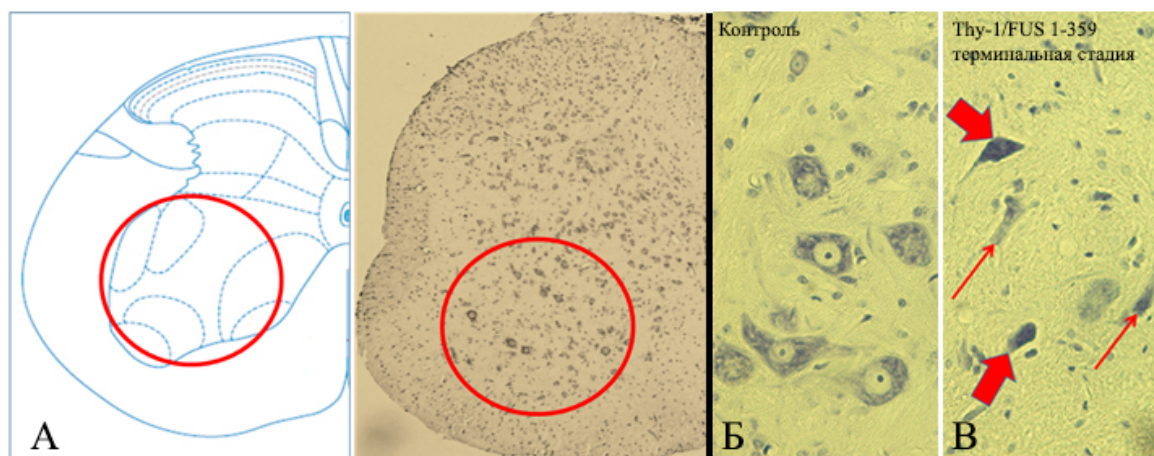


Рисунок 9 – Анализ дегенеративных изменений альфа-мотонейронов в передних рогах спинного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей.

А – локализация пятого поясничного сегмента L5: The Spinal Cord Watson, Paxinos & Kayalioglu; красным кругом обозначена область, внутри которой проводили подсчет α -мотонейронов. Увеличение X50.

Препарат из тканей контрольного (Б) и трансгенного (В) животного на терминальной стадии заболевания. Окраска по Нисслю, стрелками указаны поврежденные нейроны (тонкая стрелка) и нейроны, подвергшиеся хроматолизису (толстая стрелка). Увеличение X400.

Подобную картину наблюдают при патогистологическом анализе препаратов спинного мозга больных с БАС.

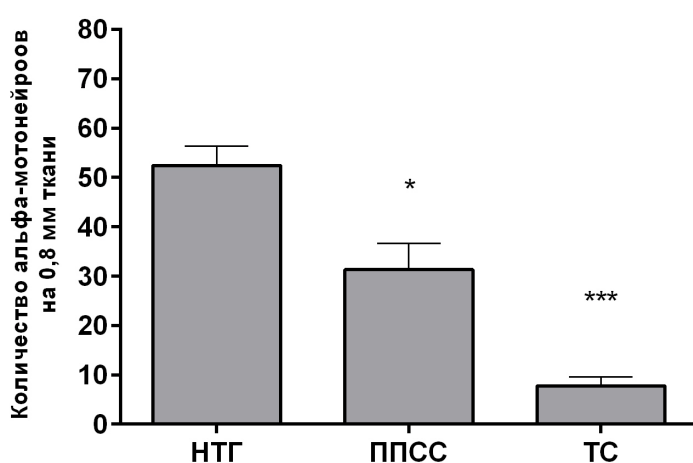


Рисунок 10 – Морфометрический анализ альфа-мотонейронов у Thy-1/FUS 1-359 мышей.

Число сохранившихся α -мотонейронов во всей области на участке длиной 800 микрон между сегментами C3 и C5 в группах нетрансгенных (НТГ, n=6); поздней пресимптоматической стадии (ППСС, n=5) и терминальной стадии (ТС, n=5). Однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета, ANOVA Dunnett's test; * - $p<0,05$; *** - $p<0,001$.

При патогистологических исследованиях аутопсийного материала больных с БАС часто удается выявить разобщение синаптического окончания аксона мотонейрона и концевой пластинки нервно-мышечного синапса у больных. Нами так же было проведено исследование состояния нейромышечного синапса у Thy-1/FUS 1-359 мышей и продемонстрирована потеря нейромышечного контакта у животных, находящихся на терминальной стадии модельного заболевания.

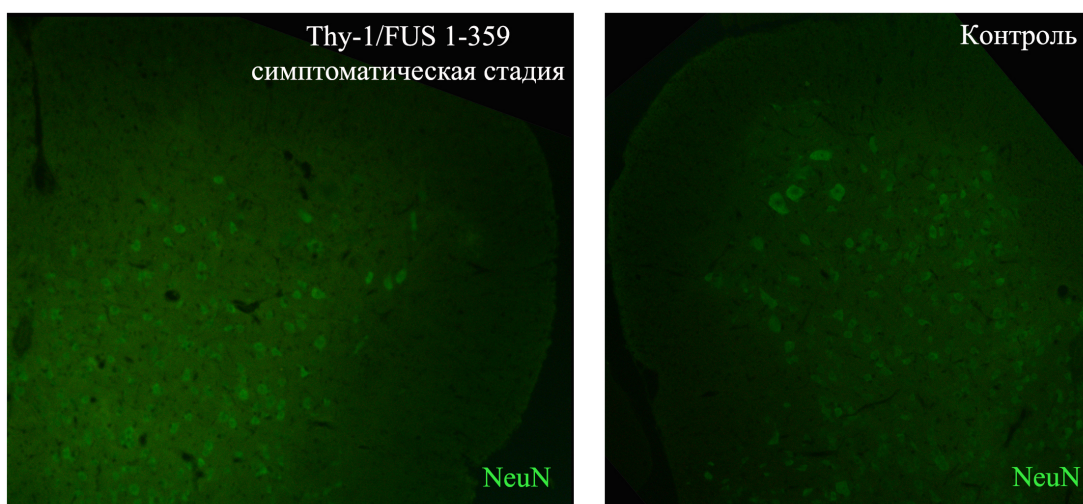


Рисунок 11 – Иммуногистохимическое окрашивание препаратов спинного мозга мышей нейроспецифическими антителами NeuN. Увеличение 200X.

Важно отметить, что при активной потере тел двигательных нейронов изменение общего числа нейрональных клеток в исследованных участках спинного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей было существенно менее выраженным (Рис. 11).

Характерным признаком большинства нейродегенеративных заболеваний является параллельное развитие локальной нейроинфламаторной реакции, которая вносит свой существенный вклад в патогенез заболевания и его развитие. Для анализа микроглиоза нами был использован маркер Iba-1 - актин-связывающий белок, который усиливает передачу возбуждения по мембране и участвует в RAC-опосредованном сигнальном пути и в фагоцитозе. Для анализа астроглиоза был использован классический маркер активированных астроцитов - GFAP. В зоне передних рогов спинного мозга у THY-1/FUS 1-359 мышей на развитой симптоматической стадии заболевания нами был выявлен выраженный реактивный астроглиоз и признаки микроглиоза (Рис. 12). Таким образом, мы показали, что в данной трансгенной модели Thy-1/FUS 1-359 прогрессия FUSопатии сопровождается развитием нейровоспалительной реакции, которая, безусловно вносит свой вклад в патогенез модельного заболевания.

В созданной нами линии трансгенных мышей Thy-1/FUS 1-359 удалось достаточно полно воспроизвести патофизиологическую картину БАС, что позволяет считать данную линию адекватной моделью.

Одной из главных задач, которую предполагается решать с помощью создания животных генетических моделей протеинопатий, является воспроизведение клинической картины моделируемого заболевания и установление взаимосвязи биохимических показателей патологической агрегации и формирования отложений в нейронах с клинической манифестацией нейродегенеративного процесса и манифестацией симптомов моделируемого заболевания.

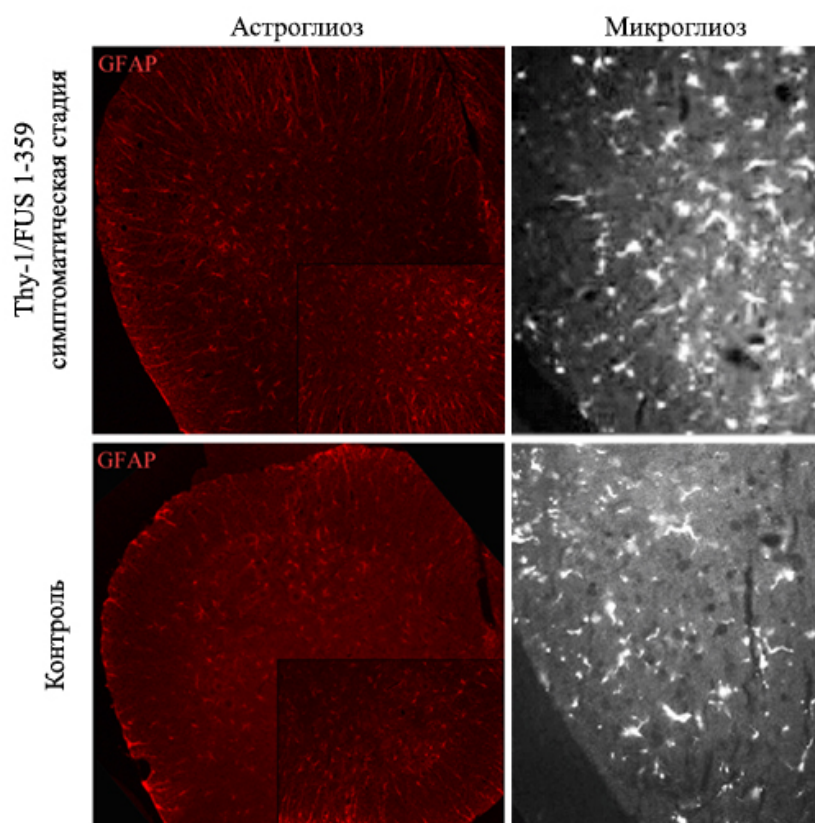


Рисунок 12 Признаки нейровоспалительной реакции в передних рогах спинного мозга Thy-1/FUS 1-359 мышей на поздней пресимптоматической стадии модельного заболевания.

Для подробной характеристики манифестации клинических признаков прогрессии нейродегенеративного процесса осмотр всех животных в контрольных и экспериментальных группах проводился еженедельно. После регистрации первых внешних признаков развития неврологической симптоматики осмотр животного проводился ежедневно. На ранней стадии развития заболевания регистрировалось общее снижение двигательной активности, затем развивались прогрессирующие односторонние парезы передних и задних конечностей. Именно на этой стадии развития клинических признаков удавалось регистрировать изменение объективных показателей, полученных с применением инструментальных методов анализа. В течение в среднем от 2-х до 5-ти дней после дебюта симптомов моторная дисфункция выражается уже в

параплегии верхних или нижних конечностей, у животных на этой стадии возникают трудности с передвижением. Общая же средняя продолжительность симптоматической стадии заболевания у модельных животных составляла около 7 дней (Таблица 1). Таким образом, тесты «вращающаяся платформа» и «сила хватки» (Рис. 5) позволяют детектировать начало проявления паталогического процесса в среднем за 7 дней до манифестации клинических симптомов. Учитывая скоротечность заболевания, а также его относительно ранний дебют (в среднем возраст 102 дня) можно полагать, что разработанные тесты пригодны для характеристики поздней пресимптоматической стадии и могут быть использованы при разработке и тестировании новых болезнь-модифицирующих препаратов.

Таблица 1 – Характеристики модельного заболевания у трансгенных животных линии Thy-1/FUS 1-359

Фенотипические показатели	Значение, дни
Средний возраст начала симптоматики	102±4,64
Средняя длительность симптоматической стадии	6,8±2,33
Общее число обследованных животных 52	

Последние достижения в биотехнологических разработках для медицины, базирующиеся на результатах фундаментальных исследований дифференцировки стволовых клеток в различные типы нейронов, сделали принципиально возможным создание методов репаративной заместительной коррекции утраченных нейронов с использованием стволовых клеток. Однако, при конститутивном нарушении собственных

репаративных процессов в двигательных нейронах эффект от заместительной клеточной терапии окажется непродолжительным. Для повышения эффективности лечения потребуются параллельная коррекция собственного нейрогенеза, как элемент комплексной патогенетической терапии. С целью исследования состояния системы обновления нервной ткани в зонах локализации патологических процессов в спинном мозге мышей линии Thy-1/FUS 1-359 был использован метод мечения делящихся клеток 5-бром-2'-дезоксинуридином (BrdU) (Рис. 13).

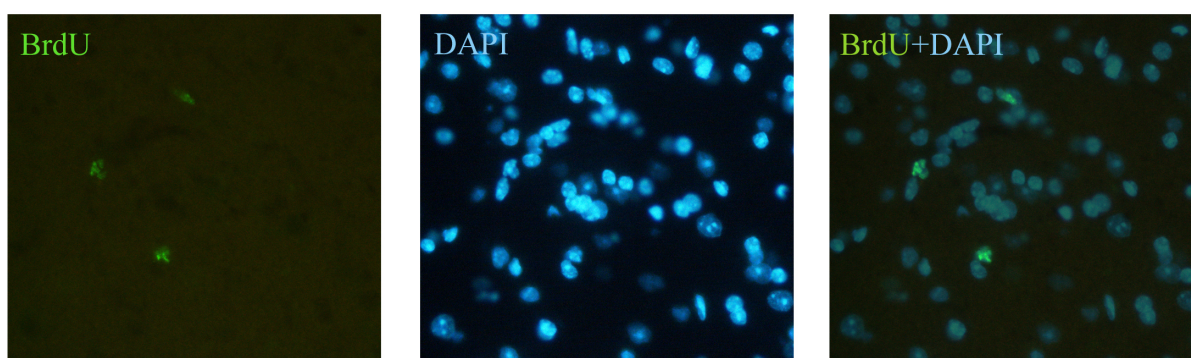


Рисунок 13 – BrdU-позитивные клетки в спинном мозге Thy-1/FUS 1-359 мышей.

Нами было показано, что в спинном мозге трансгенных мышей на досимптоматической стадии развития заболевания содержится значительно меньшее число BrdU-положительных клеток, чем у контрольных нетрансгенных животных из тех же пометов. (Рисунок 14).

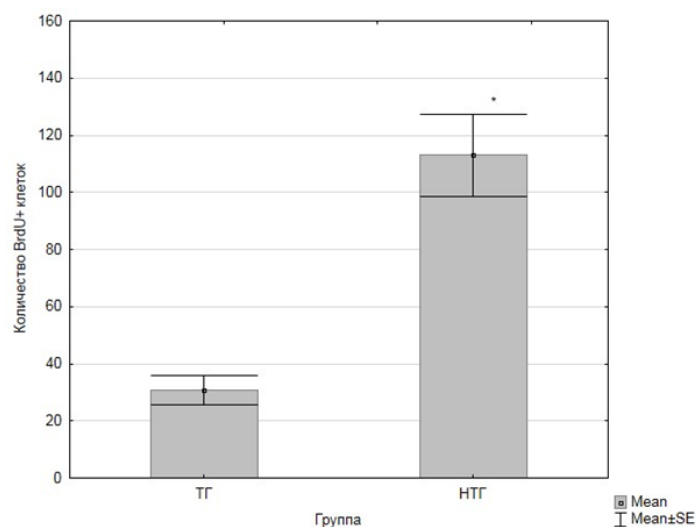


Рисунок 14 – Количество BrdU-положительных клеток в поясничном отделе спинного мозга трансгенных (ТГ) и нетрансгенных (НТГ) мышей линии Thy-1/FUS 1-359. (Тест Стьюдента, Student's t-test; * - $p < 0,05$; $n = \text{НТГ-3, ТГ-3}$).

Эти данные указывают на то, что снижение выживаемости пролиферирующих клеток может являться одним из патогенетических звеньев в развитии протеинопатии, либо быть следствием истощения компенсаторных механизмов нервной системы.

ВЫВОДЫ

1. Создана новая линия трансгенных мышей Thy-1/FUS(1-359) с эктопической экспрессией аберрантной формы белка FUS человека;
2. Показано, что укороченная форма белка FUS с удаленным сигналом ядерной локализации и нарушенным сайтом связывания РНК способна инициировать развитие FUSопатии в нервной системе трансгенных мышей;
3. Проведен патогистологический анализ спинного мозга трансгенных мышей, описана динамика прогрессии FUSопатии и выявлена положительная корреляция между выраженностью FUSопатии и уровнем гибели двигательных нейронов (α -мотонейронов);
4. Проведен фенотипический анализ Thy-1/FUS(1-359) мышей и охарактеризованы основные стадии прогрессирующего модельного нейродегенеративного заболевания, вызванного FUSопатией;
5. На основе данных патогистологического анализа и комбинации клинических признаков нейродегенеративного заболевания сделано заключение о том, что созданная трансгенная модель может быть использована в качестве модели бокового амиотрофического склероза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления форм БАС, ассоциированных с патологией гена FUS, рекомендован забор аутопсийного материала отделов спинного мозга больных и последующего иммуногистохимического анализа патогистологических включений;

2. В случае диагностирования FUS-реактивных включений рекомендовано проведение генетического анализа методом секвенирования кодирующей части гена FUS;
3. При выявлении мутаций у больного рекомендован аналогичный генетический анализ для родственников и разработка набора праймеров для проведения простого персонифицированного анализа с помощью конвенционной ПЦР, пригодной для пренатальной диагностики наследственных форм БАС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Robinson HK, Deykin AV, Bronovitsky EV, **Ovchinnikov RK**, Ustyugov AA, Shelkovnikova TA, Kukharsky MS, Ermolkevich TG, Goldman IL, Sadchikova ER, Kovrazhkina EA, Bachurin SO, Buchman VL, Ninkina NN. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. – 2015. – № 288(35). – P.25266-74.
2. Брoновицкий Е.В., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Фёдоров Е.Н., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., **Овчинников Р.К.**, Роман А.Ю., Хританкова И.В., Кухарский М.С., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Устюгов А.А. Подавление гамма-карболином нейродегенеративного процесса в трансгенной модели бокового амиотрофического склероза. // Доклады Академии Наук. – 2015. – № 1. – С. 609-615.
3. Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., **Овчинников Р.К.**, Брoновицкий Е.В., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Попов А.Н., Фёдоров Е.Н., Лыткина О.А., Кухарский М.С., Тарасова Т.В., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Гольдман И.Л., Садчиков

Е.Р., Бачурин С.О., Скворцова В.И. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова – 2014. – № 8. – С. 63-70.

4. Т.А. Шелковникова, Е.И. Леонова, **Р.К. Овчинников**, Н.Н. Нинкина Агрегация РНК-связывающего белка FUS как патогенетический фактор развития нейродегенеративного процесса // Коллективная монография Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма. В 2-х томах. Под ред. М.В. Угрюмова. – М.: Издательство ООО «Издательство «Научный мир» 2014. Том № 1. С. 558-577.

5. Кухарский М.С., Хританкова И.В., Лыткина О.А., **Овчинников Р.К.**, Устюгов А.А., Шелковникова Т.А., Брновицкий Е.В., Кохан В.С., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. Разработка клеточной модели TDP43-протеинопатии для поиска подходов к патогенетической терапии фронтотемпоральной лобарной дегенерации // Патогенез. – 2013. – № 1. – С. 53-60.

Тезисы

1. **Овчинников Р.К.**, Роман А.Ю., Тарасова Т.В., Кухарский М.С. Нарушение нейрогенеза в зубчатой извилине трансгенных мышей, моделирующих фронтотемпоральную лобарную дегенерацию, 3 европейская конференция по медицинским и биологическим наукам, 28 октября 2014, Вена, Австрия.

2. Кухарский М.С., Шелковникова Т.А., **Овчинников Р. К.**, Тарасова Т.В., Лыткина О.А., Бачурин С. О. Димебон замедляет прогрессию нейродегенеративного процесса у трансгенных мышей, моделирующих тау-патию. Международная молодежная научная конференция "Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии" 20 — 22 октября 2014, Томск

3. **Овчинников Р.К.**, Брновицкий Е.В., Роман А.Ю., Кухарский М.С. FUS-положительные убиквитинированные включения в мотонейронах

двигательных ядер передних рогов спинного мозга у мышей трансгенной линии mutFUS-19. I Национальная конференция с международным участием «От фундаментальной неврологической науки к клинике», 13 марта 2014, Москва.

4. S. Bachurin, **R. Ovchinnikov**, T. Tarasova, M. Kukharsky, A. Ustyugov “Ameloration of Different forms of proteinopathy by the agent Dimebon”, 14th Asian&Oceanian Congress of Neurology (AOCN 2014), 2-5 March 2014, Macao, China.

5. О.А. Лыткина, М.С. Кухарский, Т.В. Тарасова, **Р.К. Овчинников**, Т.А. Шелковникова Выявление аутоантител к склонным к агрегации рекомбинантным белкам в сыворотке крови больных БАС. Биология – наука XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 21-26 апреля 2013, Пущино. С. 278-279.

6. М.С. Кухарский, Т.В. Тарасова, **Р.К. Овчинников**, С.О. Бачурин Ингибирование нейродегенеративного процесса в трансгеномной модели таупатии под действием Димебона. XIX Межгородская конференция молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», 10-11 апреля 2013, Санкт-Петербург. С. 71-72

7. М. С. Кухарский, Т. В. Тарасова, **Р.К. Овчинников**, С.О. Бачурин Димебон ингибирует прогрессию нейродегенеративных процессов в тау-трансгенных мышцах. V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012», 3-8 декабря 2012 года, г. Тверь, С. 242-243

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BrdU – 5-бром-2'-дезоксинуридин

FUS – ДНК/РНК-связывающий белок (англ. fused in sarcoma);

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа;

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок (англ. glial fibrillary acidic protein);

TDP-43 – ДНК/РНК-связывающий белок (англ. TAR DNA binding protein)

БАС – боковой амиотрофический склероз;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

Ovchinnikov Ruslan Konstantinovich

Developing and characteristization of a new transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis with neurospecific expression of pathogenic form of FUS protein

The FUS protein is involved in the pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). This thesis presents data on the development of a new transgenic mouse model of ALS with neuronal expression of the aberrant form of FUS(1-359) that lacks nucleic localisation signal and has disrupted RNA binding site. Here we report the phenotype and results of histological assessment of the brain of transgenic mice expressing this isoform of FUS. We demonstrated positive correlation between the disease progression and selective loss of motoneurons in the spinal cord of transgenic mice. Additionally, FUS-positive cytoplasmic inclusions in the spinal cord and neuroinflammatory response were observed. The development of adequate model systems for studying molecular mechanisms of ALS and recapitulating the most important aspects of the disease pathogenesis is a necessary condition for progress in this direction and optimization of compounds search for developing pathophysiological therapy of ALS.