

УДК 616-092

Нарушение когнитивной функции у трансгенных мышей со сниженным уровнем экспрессии патогенной формы белка FUS человека

Лысикова Е.А.¹, Чапров К.Д.¹, Иванова Т.А.¹, Устюгов А.А.¹, Овчинников Р.К.¹, Кухарский М.С.¹, Коршунов Е.А.², Дейкин А.В.^{2,3}, Бачурин С.О.¹, Нинкина Н.Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук. 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии гена» Российской академии наук. 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Актуальность. Патологическая агрегация ДНК/РНК-связывающего белка FUS ассоциирована с развитием бокового амиотрофического склероза (БАС) и фронтотемпоральной лобарной дегенерации (ФТЛД). Трансгенные мыши оригинальной линии FUS[1-359] с нейроспецифической экспрессией аберрантной формы белка FUS человека характеризуются прогрессирующей дегенерацией двигательных нейронов и низкой продолжительностью жизни, что соответствует фенотипу БАС. После четырех генераций обратного скрещивания была выделена сублиния мышей L_FUS[1-359] с увеличенной продолжительностью жизни и отсутствием моторных нарушений.

Цель. Целью исследования являлась характеристика сублинии животных L_FUS[1-359] как модели ФТЛД.

Материалы и методы. Методом ПЦР в реальном времени сравнивалось количество копий трансгенной кассеты и уровни ее экспрессии у животных оригинальной линии и сублинии L-FUS[1-359]. Когнитивные функции животных оценивали в батарее поведенческих тестов.

Результаты. Выявлено, что у животных оригинальной и трансгенной сублиний в геноме присутствует одинаковое число копий трансгенной кассеты, однако уровень ее экспрессии снижен в 10 раз у мышей L_FUS[1-359]. У L_FUS[1-359] мышей, достигших возраста 7 месяцев, были выявлены статистически достоверные отклонения в ряде поведенческих параметров, которые указывают на изменение эмоционального состояния животных.

Заключение. Полученные данные могут свидетельствовать о развитии у данной сублинии медленно прогрессирующей FUS-протеинопатии с фенотипом ФТЛД.

Ключевые слова: протеинопатия; FUS; трансгенные животные; боковой амиотрофический склероз; фронтотемпоральная дегенерация.

Для цитирования: Лысикова Е.А., Чапров К.Д., Иванова Т.А., Устюгов А.А., Овчинников Р.К., Кухарский М.С., Коршунов Е.А., Дейкин А.В., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Нарушение когнитивной функции у трансгенных мышей со сниженным уровнем экспрессии патогенной формы белка FUS человека. *Патогенез*. 2019; 17(1): 41-49

DOI: 10.25557/2310-0435.2019.01.41-49

Для корреспонденции: Лысикова Екатерина Андреевна, e-mail: lysikova_katerina@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания (тема 48.8: «Поиск и исследование механизмов действия нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций» № 0090-2017-0019). Использованы трансгенные животные из коллекции ИФАВ РАН, поддерживаемой программой развития биоресурсных коллекций ФАНО № 0090-2017-0016. Эксперименты по исследованию копийности трансгенной кассеты и уровня ее экспрессии частично финансировано грантом РФФИ 18-15-00357. Часть работы была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН, при поддержке гранта РФФИ 16-04-01805.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 31.08.2018

Transgenic mice with decreased level of the pathogenic form of human FUS protein display cognitive impairment

Lysikova E.A.¹, Chaprov K.D.¹, Ivanova T.A.¹, Ustyugov A.A.¹, Ovchinnikov R.K.¹, Kucharsky M.S.¹, Korshunov E.A.², Deikin A.V.^{2,3}, Bachurin S.O.¹, Ninkina N.N.¹

¹ Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences, Severniy Proezd 1, Chernogolovka of Moscow Region 142432, Russian Federation

² Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Vavilova Str. 34/5, Moscow 119334, Russian Federation

³ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Background. Pathological aggregation of the DNA/RNA-binding FUS protein is associated with development of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontal-temporal lobar degeneration (FTLD). The original strain of transgenic mice, FUS[1-359] with neurospecific expression of the truncated form of human FUS protein is characterized by progressive neurodegeneration of motor neurons and early lethality, which matches the ALS phenotype. After four generations of backcrossing, a substrain of L_FUS [1-359] mice was isolated, which had increased lifespan and no phenotypic motor disorders.

Aim. The aim of the study was to characterize the L_FUS[1-359] substrain as a FTLD model.

Materials and methods. The number of copies and expression levels of the transgenic cassette were compared in the original strain and the transgenic substrain using quantitative RT-PCR. Cognitive function of animals was evaluated using a battery of behavioral tests.

Results. *Animals of the original strain and the transgenic substrain had an equal number of copies of the same transgenic cassette but the level of human FUS expression was 10 times lower in the nervous system of L_FUS[1-359] mice than in the original strain. Results of behavioral tests for the cognitive function showed that L_FUS [1-359] mice developed statistically significant deviations by the age of 7 months, which indicated a change in the emotional condition.*

Conclusion. *The results of the study suggested that L_FUS [1-359] mice may represent a model of slowly progressing FUS-proteinopathy with the FTLD phenotype.*

Keywords: *proteinopathy; FUS; transgenic animals; amyotrophic lateral sclerosis; frontal-temporal lobar degeneration.*

For citation: Lysikova E.A., Chaprov K.D., Ivanova T.A., Ustyugov A.A., Ovchinnikov R.K., Kucharsky M.S., Korshunov E.A., Deikin A.V., Bachurin S.O., Ninkina N.N. [Transgenic mice with decreased level of the pathogenic form of human FUS protein display cognitive impairment]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2019; 17(1): 41-49 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2019.01.41-49

For correspondence: Lysikova Ekaterina Andreevna, **e-mail:** lysikova_katerina@mail.ru

Funding. Study was supported by Russian State assignment (Topic 48.8 «Search and investigation of the mechanisms of neuroprotectors and cognitive functions stimulators» № 0090-2017- 0019). Transgenic animals used in the study were provided by Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences «Transgen» collection, developed within project No. 0090-2017-0016. The study of the number of transgenic cassette copies and level of its expression was partially supported by the Russian Science Foundation (project No 18-15-00357). Part of the work was performed using the equipment of Center for collective use of IBG RAS, supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 16-04-01805).

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

Received: 31.08.2018

Введение

Улучшение качества жизни людей за последние десятилетия привело к увеличению продолжительности жизни и диагностированию все большего количества нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), характерных для пациентов пожилого возраста [1]. Среди наиболее распространенных и социально значимых НДЗ существенную часть составляют патологии, вызываемые нарушением функционирования и метаболизма определенных белков, что сопряжено с их агрегацией и формированием характерных патогистологических включений. Тип патологии, обозначаемый общим термином «протеинопатия» [2], является важной составляющей патогенеза таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменция с рассеянными тельцами Леви, хорейя Гентингтона, боковой амиотрофический склероз (БАС), фронтотемпоральная лобарная нейродегенерация (ФТЛД) и др. [3]. Различные НДЗ прогрессируют с разной скоростью. Одной из самых быстро прогрессирующих протеинопатий является БАС, для которого средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет около 3 лет [4]. 90% случаев заболевания составляют спорадические формы, остальные 10% наследуются в основном по аутосомно-доминантному типу [5]. Среди генов, ассоциированных с наследственными и спорадическими формами БАС, описаны гены SOD1 (супероксиддисмутазы1), C9ORF72 с мультипликацией нуклеотидного повтора на 9-й хромосоме, ДНК/РНК-связывающие белки TDP-43 (Transactivation-responsive DNA-binding Protein-43) и FUS (fused in sarcoma), и ряд других менее изученных мутаций [6]. 5% всех наследственных случаев БАС связаны с мутацией в гене FUS с характерными FUS-реактивными включениями, обнаруживаемыми при патогистологическом анализе в цитоплазме нейронов [7]. Интересной особенностью патологии

РНК-связывающих белков TDP43 и FUS является их способность дифференциально вовлекаться в нейродегенеративный процесс, локализованный в двух различных анатомических структурах. Так, FUS- и TDP-протеинопатия может быть локализована в двигательных нейронах спинного мозга и двигательной коре головного мозга, что характерно для БАС. В других случаях FUS- и TDP-протеинопатия может быть ограничена лишь фронтальными и височными долями коры головного мозга, что характерно для НДЗ с абсолютно иным фенотипом – ФТЛД [8]. В отличие от БАС, при ФТЛД дегенерация лобных и височных долей головного мозга вызывает, в первую очередь, нарушения поведения и речи [8]. ФТЛД в ряду других деменций имеет относительно ранний дебют клинической манифестации заболевания, поражая пациентов преимущественно в возрасте до 65 лет [8, 9]. Описаны и редкие сочетанные формы, когда у пациентов одновременно наблюдаются симптомы как БАС, так и ФТЛД [10, 11]. Основные БАС- и ФТЛД-ассоциированные мутации в гене FUS локализованы в экзоне, кодирующем сигнал ядерной локализации, в результате чего белок меняет компартиментализацию и накапливается в цитоплазме, где он агрегирует [7]. Цитотоксический эффект нарушения компартиментализации обусловлен патологией метаболизма FUS и изменением регуляции процессинга РНК, транскрипции, сплайсинга и образования функциональных стресс-гранул, поскольку именно эти процессы в норме регулируются белком FUS.

Механизмы, которые обеспечивают локализацию патологического процесса либо в двигательных нейронах, либо во фронтотемпоральной коре, остаются неизвестными. Однако установлено, что у белков FUS и TDP43 мутации, приводящие к патогенным состояниям, локализованы, в основном, в сигнале ядерного связывания на N-конце молекулы, а укороченная форма белка TDP43 25 кДа выявлена

у больных в составе патогистологических включений. В экспериментальных моделях показано, что укороченные формы FUS и TDP43 способны инициировать и поддерживать протеинопатию. Описанная в статье Кухарского с соавт. модельная TDP43-протеинопатия в клеточной культуре нейробластомы человека характеризуется образованием TDP43-реактивных структур, имитирующих патогистологические включения, выявляемые в аутопсийном материале больных с рядом форм ФТЛД [12].

Описаний моделей ФТЛД на основе FUS-протеинопатии в литературе мы не обнаружили. В данной работе мы сообщаем о создании линии трансгенных мышей L-FUS[1-359] с прогрессирующей FUS-протеинопатией без клинической симптоматики БАС, но с прогрессирующим нарушением когнитивных функций, что может быть свидетельством манифестации фенотипа ФТЛД у данной линии мышей.

Материалы и методы исследования

В работе использовали линию генетически модифицированных мышей FUS[1-359], в нервной системе которых экспрессируется трансгенная последовательность, кодирующая аберрантную форму белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации под нейронспецифичным промотором Thy-1 [13, 14].

Колонии мышей содержали в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 часов темного и 12 часов светлого времени) при постоянной температуре 22°C. Все работы с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 1.04.2016 № 199н.

Генотипирование животных осуществляли методом ПЦР в реальном времени. Геномную ДНК выделяли из биопсий уха с помощью наборов «Wizard genomic DNA» (Promega). ПЦР в реальном времени проводили в анализаторе «CFX-96» (Biorad), в качестве матрицы использовали 0,1 мкг геномной ДНК. Для детектирования трансгенной кассеты использовали праймеры к последовательности гена FUS человека: прямой 5'TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT3' и обратный 5'TAATCATGGGCTGTCCCGTT3'. В качестве внутреннего контроля использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы мыши – GAPDH, амплификацию которого проводили с помощью праймеров: прямой 5'CACTGAGCATCTCCCTCA-CA3' и обратный 5'GTGGGTGCAGCGAАCTTTAT3'.

Анализ экспрессии трансгенной кассеты выполняли методом RT-PCR в реальном времени. РНК выделяли с использованием наборов «RNAeasy Mini Plus» (Quiagen, США). Для синтеза комплементарной цепи ДНК использовали 500 нг РНК в реакции и проводили обратную транскрипцию с помощью наборов MMLV (Евроген, Россия). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для последующей амплификации с помощью ПЦР в реальном времени.

В поведенческих тестах использовали самцов L-FUS[1-359] и животных дикого типа в возрасте 3

и 7 месяцев. Тест «Строительство гнезда» проводили в комнатах постоянного содержания мышей, тесты «Открытое поле» и «О-лабиринт» выполняли в специально оборудованных аппаратных помещениях. Для проведения теста «Строительство гнезда» в новую клетку к животному вечером помещали строительный материал, представляющий собой квадрат ваты размером 5 × 5 см и толщиной 1 см. Оставляли строительный материал в клетке на ночь, утром проводили оценку гнезда по 5-бальной шкале, где 0 – нет взаимодействия с материалом, 5 – построенное гнездо со стенами и крышей [15]. Анализ передвижений животных с помощью теста «Открытое поле» проводили в автоматизированной фотосенсорной установке «TruScan» (Coulbourn, США) при освещении 25 Лк. Основание установки размером 30 × 30 см условно разделено на 64 квадрата и имеет 16 отверстий диаметром 20 мм. Регистрировали параметры двигательной активности (общее время движения в с; общее пройденное расстояние в см; средняя скорость всех передвижений в см / с), тревожности (время покоя в с; расстояние пробежек в центре в см; время в центре в с; число пересечений центра), исследовательской реакции (число стоек; число заглядываний в норки) [16].

Для проведения теста «О-образный лабиринт» использовали установку фирмы «OpenScience» (Россия) [17]. Тестирование проводили при освещении 25 Лк. Животных помещали в центр огороженного сектора и в течение 5 мин регистрировали следующие параметры: латентное время выхода в открытый сектор, с; количество выглядываний в открытый сектор; количество выходов в открытый сектор; общее время нахождения в открытом секторе, с.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «GraphPad Prism Software 7.0». (GraphPad Software Inc, США). Нормальность выборки определяли с помощью критерия Д'агостино-Пирсона. Для дальнейшего анализа использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При $p < 0,05$ принимали гипотезу о статистической значимости различий по исследуемому признаку.

Результаты исследования

Оригинальная линия мышей FUS[1-359] изначально велась на генетическом фоне C57Bl6J [13]. Для перевода на новый генетический фон гемизиготных по трансгенной кассете самцов FUS[1-359] скрещивали с самками дикого типа аутбредной линии CD1. Начиная с поколения F3 регистрировали основные показатели прогрессии модельного заболевания у потомков с целью выявления возможного изменения фенотипа вследствие изменения генетического фона трансгенных животных. Регистрировали возраст дебюта симптоматической стадии, ее продолжительность и продолжительность жизни трансгенных животных. Практически у всех мышей, полученных в серии обратных скрещиваний, сохранялись основные характеристики фенотипа исходной линии, указывающие на прогрессирующий нейродегенератив-

ный процесс с преимущественным поражением двигательных нейронов и переходом в первой половине жизни пресимптоматической стадии модельного заболевания в симптоматическую. Модельное заболевание, также как и у мышей оригинальной линии на генетическом фоне C57Bl6J, характеризовалось стремительным течением симптоматической стадии и ранней 100%-ной летальностью трансгенных животных. Однако в 4-м поколении был выявлен гемизиготный по трансгенной кассете самец (F4-L), у которого с возрастом не развивалась двигательная патология и отсутствовали признаки модельного заболевания животных линии FUS[1-359]. Более того, в следующем поколении среди семи потомков данного самца не было зарегистрировано особей с фенотипом оригинальной линии FUS[1-359]. Генотипирование потомков методом конвенционной ПЦР с использованием специфичных для данной трансгенной кассеты праймеров показало, что 4 особи (F5.1-L, F5.2-L, F5.4-L и F5.6-L) несли трансгенную кассету FUS[1-359], поскольку на матрице геномной ДНК, полученной из биопсий тканей данных животных,

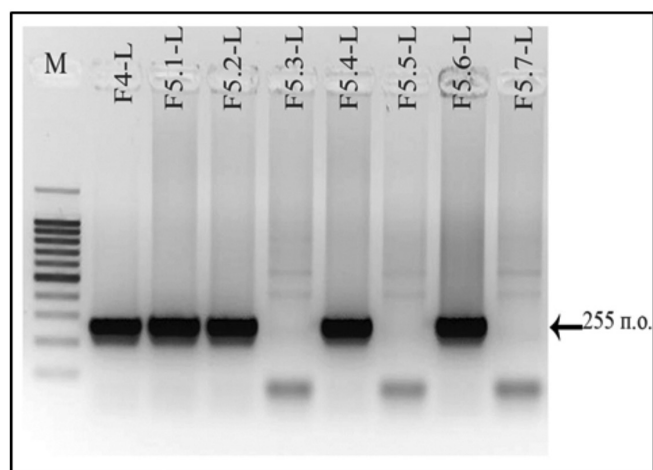


Рис. 1. Выявление трансгенной кассеты в геноме мышей, утративших фенотип оригинальной линии FUS[1-359]: генотипирование потомков общего фандера (F4-L) с измененным фенотипом: F5.1-L, F5.2-L, F5.3-L, F5.4-L, F5.5-L, F5.6-L, F5.7-L методом конвенционного ПЦР. Положение фрагмента ожидаемого размера 255 п.о. указан стрелкой.

амплифицировался характерный фрагмент размером 255 т.п.о. (**рис. 1**).

Самцы F5.1-L и F5.4-L были использованы в следующем цикле обратного скрещивания с CD1 самками дикого типа. Всего было проведено по 3 скрещивания и получено 28 потомков F5.1-L и 41 потомок F5.4-L, анализ генотипов которых показал, что трансгенную кассету FUS[1-359] несли по 17 животных от обоих обратных скрещиваний (**табл. 1**).

Таким образом, было получено всего 34 трансгенных животных с инвертированным фенотипом, проживших более 18 месяцев без признаков двигательной дисфункции. Обратное скрещивание этих животных проводилось отдельно и параллельно с основной трансгенной линией. К седьмому поколению была получена сублиния трансгенных L-FUS[1-359] мышей с увеличенной продолжительностью жизни и отсутствием выраженной двигательной патологии. Проведенный сравнительный анализ количества копий трансгенной кассеты у животных сублинии L-FUS[1-359] и исходной оригинальной линии, которую мы обозначили S-FUS[1-359], показал, что их количество одинаково в обеих сублиниях. Таким образом, изменение фенотипа не является результатом выброса части трансгенной вставки из генома L-FUS[1-359] мышей в поколениях.

Для того, чтобы установить, изменился ли уровень экспрессии трансгенной кассеты у животных сублинии L-FUS[1-359] по сравнению с ее уровнем у животных оригинальной линии S-FUS[1-359], была выделена тотальная РНК из поясничного отдела спинного мозга самцов обеих сублиний возрастом 56 дней, после чего на матрице РНК была синтезирована комплементарная ДНК, которую использовали для амплификации в реакции ПЦР в реальном времени (**рис. 2**). Сравнительный анализ уровней экспрессии трансгенной кассеты в поясничном отделе спинного мозга L-FUS[1-359] и S-FUS[1-359] мышей выявил его снижение в новой сублинии почти в 10 раз. При этом уровень экспрессии трансгенной кассеты у L-FUS[1-359] мышей оставался достаточно высоким.

Для выявления возможных проявлений когнитивных отклонений у мышей сублинии L-FUS[1-359] животные были исследованы в батарее поведенческих тестов. Выявлено, что способность построить

Таблица 1.

Распределение генотипов в потомстве трансгенных самцов F5.1-L и F5.4-L после скрещивания с самками дикого типа.

♀ №	Потомство ♂ F5-1L		Потомство ♂ F5-4L	
	содержит трансгенную кассету	не содержит трансгенную кассету	содержит трансгенную кассету	не содержит трансгенную кассету
1	5	4	6	7
2	6	3	4	9
3	6	4	7	8
Количество потомков	17	11	17	24
Количество трансгенных животных 34			Количество животных дикого типа 35	

гнездо, оцениваемая по 5-бальной системе валидации качества построенного гнезда, не был изменен у L-FUS[1-359] мышей ни в группе молодых мышей в возрасте 3 месяцев, ни в группе возраста 7 месяцев.

Результаты исследования локомоторной и когнитивной функций у трансгенных животных и контрольной группы дикого типа в тесте «Открытое поле» представлены в табл. 2. Видно, что в возрасте 3 месяцев уровень двигательной активности у трансгенных животных не был уменьшен по сравнению с животными дикого типа, что указывает на отсутствие у них двигательной патологии. По показателям количества стоек и по числу заглядываний в норки L-FUS[1-359] мыши не отличались от контрольных животных дикого типа. Однако в возрасте 7 месяцев у L-FUS[1-359] животных были выявлены изменения ряда показателей поведенческого тестирования. Так, общее время движения и пройденное расстояние в камере «Открытое поле» были статистически значимо увеличены по сравнению с этими параметрами у контрольных мышей дикого типа. При этом значение времени в покое, соответственно, было снижено, что свидетельствует о повышении их общей двигательной активности L-FUS[1-359]. При этом время и расстояние, проведенные в центре камеры, являющиеся показателями тревожности у животных, находились у L-FUS[1-359] мышей на уровне животных дикого типа.

Изменения тревожного поведения у L-FUS[1-359]

мышей исследовали в приподнятом «О-лабиринте», в котором присутствуют открытые и закрытые секторы, моделирующие опасные и безопасные зоны (табл. 3). При измененном тревожном поведении животные с повышенной тревожностью обычно проводят меньше времени в открытых участках лабиринта и больше времени в закрытых «безопасных» отделах. У молодых (3-месячных) L-FUS[1-359] мышей тревожное поведение не было изменено ни по показате-

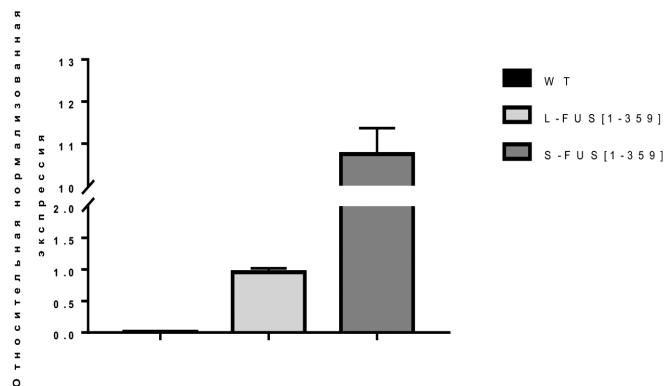


Рис. 2. Сравнение уровней экспрессии трансгенной кассеты в тканях поясничного отдела спинного мозга мышей сублиний L-FUS[1-359] и S-FUS[1-359] методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Таблица 2.

Поведенческий анализ L-FUS[1-359] мышей в камере «Открытое поле».

Показатель	Опыт L_FUS[1-359]	Контроль WT	p
3 месяца			
общее время движения, сек	276,5 (269,8; 284,8)	271,5 (267,5; 278,5)	0,209
общее пройденное расстояние, см	1308 (1028; 1477)	1095 (899,1; 1466)	0,481
средняя скорость, см/сек	4,32 (3,37; 4,885)	3,6 (2,945; 4,845)	0,481
время покоя, сек	23,5 (15,25; 30,25)	28,5 (21,5; 32,5)	0,209
общее расстояние в центре, см	209,3 (136,5; 261,5)	256,1 (209,8; 297,1)	0,166
общее время в центре, сек	78 (63,75; 104,3)	107 (83; 121)	0,109
число пересечений центра	32 (24; 36,25)	31 (21,25; 36,25)	0,984
число стоек	56,5 (32,75; 63,25)	44 (33,5; 58)	0,403
число заглядываний в норки	8,5 (5,25; 10,75)	8,5 (5,75; 11,25)	0,867
7 месяцев			
общее время движения, сек	278 (271,5; 282,5)	255 (228,3; 270,8)	0,008
общее пройденное расстояние, см	1363 (1028; 1555)	1011 (730,7; 1207)	0,013
средняя скорость, см/сек	4,5 (3,4; 5,15)	3,35 (2,4; 4)	0,013
время покоя, сек	22 (17,5; 28,5)	45 (29,25; 71,75)	0,007
общее расстояние в центре, см	319,4 (253,1; 384,1)	245 (177,3; 441,1)	0,674
общее время в центре, см	133 (99,5; 154,3)	126,5 (96, 75; 159)	0,871
число пересечений центра	35 (30,75; 37,5)	29 (20,5; 34)	0,047
число стоек	47 (38,5; 53,25)	35,5 (23,75; 49,25)	0,096
число заглядываний в норки	8,5 (6; 11,75)	8,5 (5,25; 14)	0,935

Примечание: n = 10 для каждого генотипа и возрастной группы; статистическая обработка – по критерию Манна-Уитни.

лям количества выглядываний и выходов в открытый сектор, ни по показателям латентного времени до выхода в открытый сектор, ни по времени, проведенном в открытом секторе. Однако в возрасте 7 месяцев у L-FUS[1-359] мышей выявлялась тенденция к увеличению латентного времени выхода в открытый сектор, что может быть признаком тревожности.

Обсуждение результатов

Нарушение метаболизма ДНК/РНК-связывающего белка FUS, сопровождающееся изменением его локализации в клетке и формированием патогенных агрегатов, обнаружено при двух нейродегенеративных заболеваниях – боковом амиотрофическом склерозе и фронтотемпоральной лобарной дегенерации [7]. Молекулярный механизм FUS-протеинопатии для двух этих заболеваний абсолютно идентичен, однако различна локализация нейродегенеративного процесса: в случае БАС он поражает двигательные нейроны, а при ФТЛД – нейроны фронтальных и височных долей коры головного мозга. Вторым существенным отличием в патогенезе двух этих заболеваний является разная скорость прогрессии нейродегенеративного процесса при БАС и при FUS-протеинопатии. В то время, как БАС является одним из наиболее стремительно протекающих нейродегенеративных заболеваний, ФТЛД в большинстве случаев протекает гораздо медленнее. Чем объясняется различная скорость прогрессии FUS-протеинопатии при этих двух заболеваниях, остается неясным. В модельных системах также не удается переключить патогенетический субтип FUS-протеинопатии с быстро прогрессирующего на медленно текущий. К настоящему времени выявлены химические соединения, которые способны замедлять прогрессию FUS-протеинопатии в трансгенных модельных животных, но они не способны изменять локализацию патологического процесса. Молекулярный механизм их действия не изучен [18, 19]. Исследования вариантов

FUS-протеинопатии существенно осложняются тем, что хотя и создан ряд моделей БАС, но практически отсутствуют животные модели с фенотипом ФТЛД [20].

В данной работе сообщается об изменении фенотипа у мышей трансгенной линии FUS[1-359] в процессе их перевода с генетического фона C57Bl6J на CD1. У мышей оригинальной линии FUS[1-359] с возрастом развивается FUS-протеинопатия с локализацией патологического процесса в двигательных нейронах и воспроизводится клиническая картина БАС. В геном этих мышей встроена трансгенная кассета под тканеспецифическим промотором Thy1, который обеспечивает экспрессию в нейронах трансгенных мышей вектора с кДНК гена FUS человека с удаленным участком, кодирующим аминокислоты с 359 по 526 [13]. Отсутствие в экзогенном белке домена ядерной локализации ведет к перераспределению белка FUS из ядра в цитоплазму, как это выявлено при патогистологическом анализе у больных с БАС и ФТЛД. В оригинальной модели FUS[1-359] были подробно изучены и описаны все составляющие патогенеза БАС, однако ни признаки ФТЛД, ни сам факт возможной локализации нейродегенеративного процесса в лобных и височных долях FUS[1-359] мышей не были исследованы. Тем не менее, после 4 поколений скрещиваний из линии FUS[1-359] выделилась сублиния трансгенных животных, у которых в геноме присутствовала трансгенная кассета, но отсутствовал фенотип БАС. Животных разделили на две сублинии в соответствии с продолжительностью их жизни, обозначив как S сублинию с трансгенной кассетой, ассоциированной с фенотипом БАС и короткой продолжительностью жизни, и как L сублинию с увеличенной продолжительностью жизни и возможным фенотипом ФТЛД. Поскольку анализ геномной ДНК показал, что число копий трансгенной кассеты было одинаково в геномах обеих сублиний мышей, то

Таблица 3.

Анализ поведения L-FUS[1-359] мышей в тесте приподнятый «О-лабиринт».

Показатель	Опыт L_FUS[1-359]	Контроль WT	Значение P
3 месяца			
время в открытом секторе, сек	29,34 (9,448; 43)	9,225 (2,115; 57,89)	0,577
число выходов в открытый сектор	5,5 (2; 7,25)	2 (0,75; 10,75)	0,378
число выглядываний в открытый сектор	23 (20; 28)	25 (23,25; 29,5)	0,361
латентное время выхода в открытый сектор, сек	10,07 (5,55; 50,75)	7,155 (3,893; 50,3)	0,795
7 месяцев			
время в открытом секторе, сек	28,11 (9,063; 70,13)	25,91 (2,108; 93,76)	0,778
число выходов в открытый сектор	2,5 (1,75; 17,25)	3,5 (0,75; 15,25)	0,751
число выглядываний в открытый сектор	23,5 (16; 31,25)	21 (13,75; 24,25)	0,288
латентное время выхода в открытый сектор, сек	33,34 (6,158; 77,32)	8,965 (1,5; 21,74)	0,138

Примечание: n = 10 для каждого генотипа и возрастной группы; статистическая обработка – по критерию Манна-Уитни.

Список литературы

можно было сделать заключение, что изменение фенотипа у L-FUS[1-359] животных не является результатом выброса части копий трансгенной кассеты. При этом уровень экспрессии экзогенного FUS человека, исследованный методом ОТ-ПЦР в реальном времени, был в 10 раз снижен в спинном мозге мышей линии L-FUS[1-359] по сравнению с животными исходной линии S-FUS[1-359]. Возможно, при таком уровне экспрессии снижение содержания эктопического белка в цитоплазме нейронов делает недостаточной его концентрацию для образования FUS-реактивных включений в двигательных нейронах и развития фенотипа БАС. С другой стороны, увеличение продолжительности жизни трансгенных животных в сублинии L-FUS[1-359] дает достаточно времени для достижения нейродегенеративным процессом стадии, на которой происходит поражение нейронов фронтальных и темпоральных отделов коры головного мозга мышей.

Анализ поведения не выявил особенностей животных сублинии L-FUS[1-359] в возрасте 3 месяцев, что говорит о недостаточной степени поражения нейронов коры головного и компенсированной стадии FUS-протеинопатии у молодых мышей. С возрастом у этих животных появляются поведенческие признаки прогрессии нейродегенеративного процесса, обусловленного FUS-протеинопатией – переходу модельного заболевания в симптоматическую стадию, что было выявлено в тесте «Открытого поля» по двигательной и исследовательской, и может быть обусловлено изменением эмоционального статуса трансгенных L-FUS[1-359] мышей. Однако для более детального изучения природы выявленных изменений в поведении необходимы дальнейшие исследования.

Сублиния S-FUS[1-359] характеризуется тяжелым поражением двигательных нейронов и выраженными ранними нарушениями двигательной функции. Проведение поведенческих тестов на животных данной сублинии не представляется возможным. До возраста 7 месяцев животные сублинии S-FUS[1-359] не доживают. А в возрасте 3 месяцев, как следует из полученных нами результатов тестирования, у животных еще не наблюдается когнитивных нарушений, характерных для деменций.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные позволяют полагать, что при медленно прогрессирующей FUS-протеинопатии у L-FUS[1-359] мышей может иметь место переключение локализации нейродегенеративного процесса на кору головного мозга и с возрастом развиваться фенотип ФТЛД. Результаты проведенного анализа трансгенных мышей сублинии L-FUS[1-359] дают достаточно оснований для проведения более детального исследования их когнитивных функций и эмоционального состояния, что потребует дополнительных методов тестирования на репрезентативных когортах в различном возрасте, включая стареющих животных.

1. Грудень М.А., Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Елистратова Е.И., Ветрилэ Л.А., Фомина В.Г., Морозова-Роше Л.А., Шерстнев В.В., Севелл Р.Д.Е. Нейроиммунные маркеры когнитивного дефицита при болезни Альцгеймера. *Патогенез*. 2015; 13(3): 18-22.
2. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекулярная биология*. 2012; 46(3): 402-415.
3. Golde T.E., Borchelt D.R., Giasson B.I., Lewis J. Thinking laterally about neurodegenerative proteinopathies. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(5): 1847-1855. DOI: 10.1172/JCI66029
4. Bourke S.C., Tomlinson M., Williams T.L., Bullock R.E., Shaw P.J., Gibson G.J. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2006; 5(2): 140-147. DOI:10.1016/S1474-4422(05)70326-4
5. Vajda A., McLaughlin R.L., Heverin M., Thorpe O., Abrahams S., Al-Chalabi A., Hardiman O. Genetic testing in ALS: A survey of current practices. *Neurology*. 2017; 88(10): 991-999. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003686
6. Bräuer S., Zimyanin V., Hermann A. Prion-like properties of disease-relevant proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2018; 125(4): 591-613. DOI: 10.1007/s00702-018-1851-y
7. Ефимова А.Д., Овчинников Р.К., Роман А.Ю., Мальцев А.В., Григорьев В.В., Ковражкина Е.А., Скворцова В.И. Белок FUS: физиологические функции и роль в развитии бокового амиотрофического склероза. *Молекулярная биология*. 2017; 51(3): 341-351. DOI: 10.7868/S0026898417020094
8. Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., Hodges J.R. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002; 58(11): 1615-1621.
9. Van Langenhove T., van der Zee J., Van Broeckhoven C. The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann. Med.* 2012; 44(8): 817-828. DOI: 10.3109/07853890.2012.665471
10. Ling S.C., Polymenidou M., Cleveland D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. 2013; 79(3): 416-438. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.033
11. Яхно Н.Н., Головкова М.С., Преображенская И.С., Захаров В.В. Синдром БАС-деменция лобного типа. *Неврологический журнал*. 2002; 7(4): 12-17.
12. Кухарский М.С., Хританкова И.В., Лыткина О.А., Овчинников Р.К., Устюгов А.А., Шелковникова Т.А., Броневицкий Е.В., Кохан В.С., Нинкина Н.Н. Разработка клеточной модели TOP43-протеинопатии для поиска подходов к патогенетической терапии фронтотемпоральной лобарной дегенерации. *Патогенез*. 2013; 11(1): 52-59.
13. Shelkovnikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V., Connor-Robson N., Robinson H., Ustyugov A.A., Bachurin S.O., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhnikina E.A., Skvortsova V.I., Ling S.C., Da Cruz S., Parone P.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(35): 25266-26274. DOI: 10.1074/jbc.M113.492017
14. Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Броневицкий Е.В., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Попов А.Н., Федоров Е.Н., Лыткина О.А., Кухарский М.С., Тарасова Т.В., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Гольдман И.Л., Садчикова 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 имени С.С.Корсакова*. 2014; 114(8): 63-70.
15. Deacon R. Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *J. Vis. Exp.* 2012; 59: e2607. DOI: 10.3791/2607
16. Malatynska E., Steinbusch H.W.M., Redkozubova O., Bolkunov A., Kubatiev A., Yeritsyan N.B., Vignisse J., Bachurin S., Strekalova T. Author's personal copy Anhedonic-like traits and lack of

- affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Exp. Gerontol.* 2012; 47(8): 552-564. DOI: 10.1016/j.exger.2012.04.010
17. Редкозубова О.М., Болкунов А.В., Ванькин Г.И., Ревискин А.В., Еритсян Н.Б., Маркова Н.А., Бачурин С.О., Стрекалова Т.В. Поведенческие признаки ангедонии и отсутствие поведения «отчаяния» на модели старческой депрессии у 18-месячных мышей C57BL/6. *Патогенез.* 2013; 11(1): 63-68.
 18. Броновицкий Е.В., Дейкин А.В., Ермошкевич 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; 462(5): 609-612. DOI: 10.7868/S0869565215170259
 19. Мальцев А.В., Дейкин А.В., Овчинников Р.К., Чичева М.М., Ковражкина Е.А., Разинская О.Д., Броновицкий Е.В., Бudevich А.И., Кирикович Ю.К., Бачурин С.О., Устюгов А.А., Скворцова В.И. Отсроченный дебют симптоматической стадии FUS-протеинопатии под действием препарата димебон в эксперименте. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С.Корсакова.* 2017; 117(4): 68-71. DOI: 10.17116/jnevro20171174164-67
 20. Boeynaems S., Bogaert E., Van Damme P., Van Den Bosch L. Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTLN. *Acta Neuropathol.* 2016; 132(2): 159-173. DOI: 10.1007/s00401-016-1586-5

References

1. Gruden M.A., Davydova T.V., Voskresenskaya N.I., Elistratova E.I., Vetrile L.A., Fomina V.G., Morozova-Roche L.A., Sherstnev B.V., Sewell R.D.E. [Neuroimmune markers of cognitive deficit in Alzheimer disease]. *Patogenez [Pathogenesis].* 2015; 13(3): 18-22. (in Russian)
2. Shelkovich TA, Kulikova AA, Tsvetkov FO, Peters O, Bachurin SO, Bukhman VL, Ninkina NN. [Proteinopathies-forms of neurodegenerative disorders with protein aggregation-based pathology]. *Molekularnaya Biologia [Molecular Biology].* 2012; 46(3): 402-415. (in Russian)
3. Golde T.E., Borchelt D.R., Giasson B.I., Lewis J. Thinking laterally about neurodegenerative proteinopathies. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(5): 1847-1855. DOI: 10.1172/JCI66029
4. Bourke S.C., Tomlinson M., Williams T.L., Bullock R.E., Shaw P.J., Gibson G.J. Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2006; 5(2): 140-147. DOI:10.1016/S1474-4422(05)70326-4
5. Vajda A., McLaughlin R.L., Heverin M., Thorpe O., Abrahams S., Al-Chalabi A., Hardiman O. Genetic testing in ALS: A survey of current practices. *Neurology.* 2017; 88(10): 991-999. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003686
6. Bräuer S., Zimyanin V., Hermann A. Prion-like properties of disease-relevant proteins in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neural Transm. (Vienna).* 2018; 125(4): 591-613. DOI: 10.1007/s00702-018-1851-y
7. Efimova A.D., Ovchinnikov R.K., Roman A.Y., Maltsev A.V., Grigoriev V.V., Kovrazhkina E.A., Skvortsova V.I. [The FUS protein: Physiological functions and a role in amyotrophic lateral sclerosis]. *Molekularnaya Biologia [Molecular Biology].* 2017; 51(3): 341-351. DOI: 10.7868/S0026898417020094 (in Russian)
8. Ratnavalli E., Brayne C., Dawson K., Hodges J.R. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology.* 2002; 58(11): 1615-1621.
9. Van Langenhove T., van der Zee J., Van Broeckhoven C. The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann. Med.* 2012; 44(8): 817-828. DOI: 10.3109/07853890.2012.665471
10. Ling S.C., Polymenidou M., Cleveland D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron.* 2013; 79(3): 416-438. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.033
11. Yakhno N.N., Golovkova M.S., Preobrazhenskaya I.S., Zakharov V.V. [ALS syndrome dementia of the frontal type]. *Neurologicheskii zhurnal. [Neurological journal].* 2002; 7(4): 12-17. (in Russian)
12. Kukharsky M.S., Khritankova I.V., Lytkina O.A., Ovchinnikov R.K., Ustyugov A.A., Sheikovnikova T.A., Bronovitsky E.V., Kokhan V.S., Ninkina N.N., Bachurin S.O. [Development of the TDP43-proteinopathy cell model to search approaches to pathogenic therapy of the Frontotemporal Lobar Degeneration]. *Patogenez [Pathogenesis].* 2013; 11(1): 52-59. (in Russian)
13. Shelkovich T.A., Peters O.M., Deykin A.V., Connor-Robson N., Robinson H., Ustyugov A.A., Bachurin S.O., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Skvortsova V.I., Ling S.C., Da Cruz S., Parone P.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(35): 25266-26274. DOI: 10.1074/jbc.M113.492017
14. Deikin A.V., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K., Bronovitsky E.V., Razinskaya O.D., Smirnov A.P., Ermolkevich T.G., Eliakov A.B., Popov A.N., Fedorov E.N., Lytkina O.A., Kukharsky M.S., Tarasova T.V., Shelkovich T.A., Ustyugov A.A., Ninkina N.N., Gol'dman I.L., Sadchikova E.R., Bachurin S.O., Skvortsova V.I. [A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein]. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S.Korsakova [S.S.Korsakov Journal of neurology and psychiatry].* 2014; 114(8): 62-69. (in Russian)
15. Deacon R. Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *J. Vis. Exp.* 2012; 59: e2607. DOI: 10.3791/2607
16. Malatynska E., Steinbusch H.W.M., Redkozubova O., Bolkunov A., Kubatiev A., Yeritsyan N.B., Vignisse J., Bachurin S., Strekalova T. Author's personal copy Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Exp. Gerontol.* 2012; 47(8): 552-564. DOI: 10.1016/j.exger.2012.04.010
17. Redkozubova O.M., Bolkunov A.V., Vankin G.I., Revischin A.V., Yeritsyan N.B., Markova N.A., Bachurin S.O., Strekalova T.V. [Occurrence of hedonic and lack of affective deficit in 18-month-old C57BL/6 mice implications for modeling elderly depression]. *Patogenez [Pathogenesis].* 2013; 11(1): 64-69. (in Russian)
18. Bronovitsky E.V., Ovchinnikov R.K., Roman A.Y., Khritankova I.V., Kukharsky M.S., Buchman V.L., Bachurin S.O., Ustyugov A.A., Deikin A.V., Ermolkevich T.G., Elyakov A.B., Fedorov E.N., Sadchikova E.R., Goldman I.L. [Gamma-carboline inhibits neurodegenerative processes in a transgenic model of amyotrophic lateral sclerosis]. *Doklady biohimii i biofiziki [Reports of Biochemistry and Biophysics].* 2015; 462(1): 189-192. DOI: 10.1134/S1607672915030138 (in Russian)
19. Maltsev A.V., Deykin A.V., Ovchinnikov R.K., Chicheva M.M., Kovrazhkina E.A., Razinskaya O.D., Bronovitsky E.V., Budevich A.I., Kirikovich Y.K., Bachurin S.O., Ustyugov A.A., Skvortsova V.I. [Dimebon delays the onset of symptoms of FUS-proteinopathy in transgenic mice]. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S.Korsakova. [S.S.Korsakov Journal of neurology and psychiatry].* 2017; 117(4): 64-67. DOI: 10.17116/jnevro20171174164-67 (in Russian)
20. Boeynaems S., Bogaert E., Van Damme P., Van Den Bosch L. Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTLN. *Acta Neuropathol.* 2016; 132(2): 159-173. DOI: 10.1007/s00401-016-1586-5

Сведения об авторах

Лыскова Екатерина Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Чапров Кирилл Дмитриевич – аспирант лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Иванова Тамара Александровна – научный сотрудник лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Устюгов Алексей Анатольевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Овчинников Руслан Константинович – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Кухарский Михаил Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Коршунов Евгений Николаевич – младший научный сотрудник центра коллективного пользования Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена»

Дейкин Алексей Васильевич – кандидат биологических наук, заместитель руководителя центра коллективного пользования Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена» Российской академии наук; ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Бачурин Сергей Олегович – доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель лаборатории биомолекулярного скрининга Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук

Нинкина Наталья Николаевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук