

Разработка клеточной модели TDP43-протеинопатии для поиска подходов к патогенетической терапии фронтотемпоральной лобарной дегенерации*

Кухарский М.С.¹, Хританкова И.В.^{1,3}, Лыткина О.А.¹, Овчинников Р.К.¹, Устюгов А.А.¹, Шелковникова Т.А.^{1,2}, Брновицкий Е.В.¹, Кохан В.С.¹, Нинкина Н.Н.^{1,2,3}, Бачурин С.О.¹

¹ — Учреждение Российской академии наук Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, Черноголовка, Северный проезд, 1

² — Cardiff University, BIOSI3, Cardiff, Museum Avenue CF10 1AX, UK

³ — Федеральное государственное бюджетное учреждение

Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Важным патогенетическим фактором развития молекулярной дисфункции при TDP43-протеинопатиях является изменение компартиментализации белка TDP43, потеря им ядерной локализации и накопление в цитоплазме, где он агрегирует. Ингибирование патогенной агрегации белков рассматривается в настоящее время как перспективный подход для разработки методов патогенетической терапии нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатиями. Создание удобных клеточных моделей, наиболее адекватно воспроизводящих молекулярный механизм белковой агрегации, характерный для протеинопатий, позволяет существенно оптимизировать разработку соединений, способных специфически замедлять или подавлять различные стадии протеинопатии. В представленной работе сообщается о создании оригинальной модели TDP43-протеинопатии в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y с образованием характерных TDP43-реактивных структур, имитирующих патогистологические включения, выявляемые в аутопсийном материале больных с рядом форм ФТЛД. Отечественный препарат Димебон, обладающий нейропротекторными свойствами, способен ингибировать формирование TDP43-реактивных включений в данной клеточной модели, и может рассматриваться в качестве потенциального соединения, на основе которого возможна разработка методов патогенетической терапии TDP43-протеинопатий и, в частности, ряда форм ФТЛД.

Ключевые слова: нейродегенерация, деменция, фронтотемпоральная лобарная дегенерация, TDP43

Введение

Фронтотемпоральная лобарная дегенерация (ФТЛД) относится к группе конформационных болезней нервной системы, характеризуется развитием протеинопатии и является третьей по распространенности деменцией после болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Недавние исследования показали, что в патогенезе данного заболевания важное значение имеет ДНК/РНК-связывающий ядерный белок TDP43 (Transactivation-responsive DNA-binding Protein-43) с молекулярной массой 43 кДа [31]. Связываясь с целым рядом других ядерных белков, он образует активные комплексы, необходимые для сплайсинга пре-мРНК и транспорта РНК в цитоплазму [31], стабилизации мРНК [27] и трансляции [7]. В основном, связывание TDP43 с другими белками осуществляется через последовательности, расположенные в его N-концевой области. Нарушение метаболизма и функции TDP43 ведет к развитию TDP43-протеинопатии. В аутопсийном материале пораженных отделов нервной системы больных с ФТЛД часто выявляются TDP43-реактивные убиквитинированные патогистологические включения [5, 19, 22]. Молекулярно-генетический анализ большого числа больных с ФТЛД позволил выявить мутации в гене TDP43, которые ассоциированы с семейными формами

ФТЛД, наследуемыми по аутосомно-доминантному типу. Более того, существенную часть идиопатических форм ФТЛД составляют случаи с нарушенным метаболизмом TDP43 и с мутациями в гене, кодирующем этот белок [23, 26]. В составе убиквитинированных включений TDP43 обнаруживается в гиперфосфорилированном состоянии [5, 10, 14, 22]. Подробный биохимический анализ TDP43-реактивных включений показал, что в патогистологических включениях присутствует в основном укороченная форма белка TDP43 размером 25 кДа, которая образуется в результате отщепления существенной части N-конца молекулы, включающей сигнал ядерной локализации [35]. В настоящее время сложилось устойчивое мнение, что именно эта 25 кДа форма TDP43, образующаяся в результате каспаза-зависимого расщепления, опосредованного програнулином, нативного TDP43 и является основной патогенной формой, инициирующей и поддерживающей протеинопатию.

Важно отметить, что изменение компартиментализации TDP43 обнаружено так же и при нейродегенеративных процессах, не обусловленных протеинопатией. Например, вследствие аксонотомии у экспериментальных мышей происходит перераспределение белка TDP43 внутри клетки и значительная его часть обнаруживается в цито-

* Полноразмерная кДНК TDP43 человека была получена из лаборатории M.Hasegawa (Токио, Япония).

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России, на 2009 – 2013 годы» (соглашение №8829), Российским фондом фундаментальных исследований (12-04-31791\12), программой Президиума Российской академии наук «Фундаментальные науки медицины» и грантом РФФИ 13-04-01633.

плазме, как и при протеинопатиях, однако без образования депозитов [20-21]. К настоящему времени накоплено достаточно данных, указывающих на то, что TDP43 в нейронах вовлечен в процессы формирования ответа на различные виды стресса и постстрессовых репаративных событий. Так, при оксидативном стрессе, вызванном гипоксией, с последующим ишемическим инсультом в мозге пациентов выявлены патологические изменения метаболизма и компарментализации TDP43 без образования патогистологических включений [17]. Детальные биохимические исследования показали, что и при ишемическом повреждении мозга ключевая роль в цепи патогенетических процессов, приводящих к нейродегенерации, принадлежит усеченной 25 кДа форме TDP-43 [16]. Это позволило рассматривать патогенную 25 кДа форму белка TDP43 в качестве потенциальной молекулярной мишени для разработки патогенетической терапии не только классических TDP43-протеинопатий, но и других НДЗ, в молекулярном патогенезе которых выявлены изменения метаболизма TDP43, включая ишемический инсульт.

Материалы и методы исследования

Димебон. 3,6-диметил-9-(2-метил-пиридил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-гамма-карболин дигидрохлорид, производство ОАО «Органика», г.Новокузнецк [36-38].

Клеточные культуры. Адгезивная перевиваемая клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y была получена из Европейской коллекции клеточных культур — ECACC. Клетки засеивали на покрытые коллагеном (Collagen Type IV, Sigma, США) покровные стекла диаметром 10 мм. Дифференцировку SH-SY5Y клеток по нейрональному типу стимулировали добавлением ретиноевой кислоты до конечной концентрации 10 мкМ (all-trans retinoic acid, Sigma, США). Использовали культуры, прошедшие не более двадцати пассажей.

Экспрессионная плазмидная конструкция была получена встраиванием укороченной с 5'-конца кодирующей части кДНК TDP43 человека [Δ3-192] в экспрессионный вектор *pEGFP-C1* по сайтам XhoI-EcoRI. Транзientную трансфекцию культур проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США).

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде с последующей обработкой метанолом. После отмывки в ФСБ и блокировки в 5% козьей сыворотке/ФСБ/0,1% Тритон X100 в течение часа, клетки инкубировали с первичными антителами (разведение 1:1000) против бета-актина (мышинные поликлональные, Sigma, США), растворенными в блокирующем буфере, затем со вторичными антителами против иммуноглобулинов мыши (Alexa, Molecular Probes, Invitrogen, США), в разведении 1:1000. Ядра клеток визуализировали окрашиванием DAPI. Анализ и регистрацию результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 4000 B. Микрофотографии получали при помощи фотокамеры Leica DFS 490 и программного обеспечения Leica Application Suite 2.8.1 (Leica Microsystems, Германия).

Подсчет числа культивируемых клеток SH-SY5Y, содержащих TDP43 включения. Транзientную трансфекцию культур проводили параллельно в одинаковых условиях плазмидой, кодирующей TDP43 [Δ3-192] форму, либо

контрольным вектором *pEGFP-C1*. Для векторной конструкции делали 5 разведений, снижающих концентрацию ДНК в каждом шаге на 25%. Через 4 ч подсчитывали в трех случайных квадратах [100x100 мкм] на одной чашке количество зеленых клеток после трансфекции плазмидой, кодирующей TDP43 [Δ3-192]. Затем подсчитывали аналогичным образом количество зеленых клеток при различных разведениях вектора и выбирали чашку с идентичной эффективностью трансфекции; далее считали количество клеток, содержащих включения, только при выбранном разведении векторной конструкции. Подсчеты проводили через 4, 12, 24 и 48 часов.

Подсчет числа агрегатов. Через 16 ч после добавления Димебона клеточные культуры фиксировали и подсчитывали число флуоресцентных включений, размер которых был не менее пяти микрон. Считали включения на всей площади стекла, для каждого препарата брали среднее значение трех стекол. В каждом эксперименте получали спаренные значения для клеток, обработанных Димебоном (опыт) и без добавления Димебона (контроль). Для анализа данных использовали t-критерий Стьюдента для зависимых выборок. Для графического представления данных число включений в образцах, культивируемых с добавлением Димебона, выражали в процентном отношении к контрольным значениям.

Фракционирование детергент-нерастворимых фракций проводили, как описано ранее [2].

Результаты

Формирование цитоплазматических TDP43-включений в цитоплазме клеток SH-SY5Y Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y трансфекцировали плазмидной ДНК, кодирующей aberrантную форму белка TDP43. Конструкция *pEGFP-C1-TDP43* [Δ3-192] обеспечивала высокий уровень синтеза флуоресцентно-меченого (GFP) укороченного белка TDP43 с инактивированными функционально значимыми доменами. Молекула мутантного белка не содержала сигнала ядерной локализации, первого РНК-связывающего домена, линкерной части и имела укороченный второй РНК-связывающий домен — такой белок накапливался в цитоплазме и агрегировал (рис. 1, Д, 4-я страница обложки). При флуоресцентной микроскопии экзогенный белок выявлялся в составе многочисленных дисперсных цитоплазматических включений, которые транспортировались в перикариальную область, где сливались, формируя крупные включения (рис. 1 на 4-й странице обложки).

Такие крупные включения легко анализировать и подсчитывать, что удобно при проведении тестирования антиагрегационных свойств разрабатываемых соединений. Морфологически цитоплазматические депозиты, формируемые укороченной формой TDP43 [Δ3-192] белка, схожи с патогистологическими TDP43-реактивными включениями, описанными у больных с рядом форм ФТЛД и БАС.

Цитотоксичность aberrантной формы белка TDP43 [Δ3-192]. Подсчет числа культивируемых клеток SH-SY5Y, содержащих TDP43 [Δ3-192] включения, проведенный через различные промежутки времени после трансфекции, показал, что формируемые в цитоплазме структуры высоко токсичны. Уже через 12 ч после транс-

Число живых клеток, содержащих флуоресцентный белок, на площади 10 000 мкм²

Плаزمида	Время			
	4 ч	12 ч	24 ч	48 ч
[Δ3-192] форма	79,8±9,5	51,0±5,8	23,1±6,6	9,8±2,10
pEGFP-C1 вектор	70,4±8,7	89,0±10,8	79,0±12,8	51,8±5,7

фекции наблюдалась гибель клеток, экспрессирующих флуоресцентно-меченую форму TDP43 [Δ3-192]. Трансфекцию клеток SH-SY5Y проводили в одинаковых условиях плазмидой, кодирующей TDP43 [Δ3-192] форму, и параллельно контрольным вектором pEGFP-C1, не содержащим последовательностей TDP43. Через 4 ч после трансфекции проводили первые подсчеты и выбирали образцы с идентичной эффективностью трансфекции и далее анализировали только эти образцы через 12, 24 и 48 часов (таблица).

Количество клеток, получивших флуоресцентный маркерный белок в составе вектора, существенно не менялось в течение 48 часов. Однако уже через 12 часов после трансфекции наблюдалась гибель клеток, экспрессирующих патогенную форму TDP43 (57% относительно контрольных культур), а через 48 часов после трансфекции их число снижалось почти в 10 раз по сравнению с исходным уровнем (19% относительно контрольных культур). Эти данные указывают на то, что, обладая высокой способностью к агрегации, при исключительно цитоплазматической локализации, TDP43 [Δ3-192] является высокотоксичным для эукариотических клеток.

Ингибирующее действие Димебона на прогрессию TDP43-протеинопатии в культуре клеток. Добавление Димебона в культуральную среду к клеткам нейробластомы, экспрессирующим TDP43 [Δ3-192], приводило к статистически достоверному снижению числа цитоплазматических включений (рис. 2). Димебон добавляли после трансфекции в питательную среду до конечной концентрации 10 мкМ; в контрольные образцы добавляли свежую среду без препаратов. Для анализа действия Димебона на формирование цитоплазматических включений в культурах, находящихся в стадии дифференцировки по нейрональному типу, дифференцировку стимулировали добавлением ретиноевой кислоты.

На рис. 2 представлены объединенные результаты пяти экспериментов, показывающие, что добавление Димебона к культивируемым клеткам, экспрессирующим патогенную форму белка TDP43, статистически достоверно ингибирует образование цитоплазматических включений в объединенном пуле трансфицированных клеток на 55% в недифференцированных и на 53% в дифференцированных культурах SH-SY5Y. Эти данные являются прямым указанием на то, что Димебон способен ингибировать прогрессию протеинопатии, вызванную агрегацией патогенной формы белка TDP43.

Анализ детергент-нерастворимых белковых фракций в культуре клеток SH-SY5Y после их трансфекции мутантной формой TDP43 [Δ3-192]. Методом последовательного фракционирования белков в буферах с различным содержанием детергентов была выделена белковая фракция, содержащая агрегаты TDP43, которые не растворимы в присутствии детергентов тритон X-100 и RIPA и могут быть высвобождены только кипячением в 1% SDS. Детек-

цию TDP43 после фракционирования проводили методом иммуноблоттинга. На рис. 3 представлены результаты фракционирования белков из клеток SH-SY5Y после их трансфекции полученным конструком.

Обсуждение результатов

Нами была воспроизведена модельная TDP43-протеинопатия в клеточной культуре нейробластомы человека с формированием характерных цитоплазматических агрегатов путем эктопной экспрессии патогенной формы TDP43 человека. При создании генетической конструкции, кодирующей данную патогенную форму белка TDP43, из кДНК был удален сигнал ядерной локализации, поскольку отличительной чертой TDP43-реактивных включений у больных является их преимущественное присутствие в цитоплазме, при том, что в норме TDP43 белок обнаруживается преимущественно в ядре. Таким образом, патогенная форма белка TDP43 теряла ядерную локализацию, что обеспечивало его накопление в цитоплазме. Кроме этого, в сконструированной патогенной форме удален первый РНК-связывающий домен и нарушена структура второго РНК-связывающего домена, что делает невозможным выполнять aberrантным белком одну из основных его функций — регуляцию нормального метаболизма РНК. Эктопно экспрессируемая укороченная патогенная форма TDP43 [Δ3-192] с нарушенной функцией и компарментализацией накапливается в цитоплазме культивируемых клеток, агрегирует и формирует депозиты, что воспроизводит в клетках нейробластомы человека молекулярно-клеточную патологию, выявляемую при патогистологическом анализе препаратов больных с рядом форм ФТЛД и БАС, характеризующихся присутствием TDP43-реактивных патогистологических включений. Важно отметить, что в образовании этих включений главная роль отводится укороченным aberrантным формам белка TDP43 размером 25 кДа, детектированным различными методами в биологическом материале больных, наряду с нормальным полномерным белком весом 43 кДа, причем именно 25 кДа форма присутствует в агрегированном состоянии [15]. Поэтому созданная нами модельная система оптимизирована для поиска и тестирования соединений, способных ингибировать процесс образования TDP43-реактивных включений, содержащих укороченные патогенные формы. Для разработки методов патогенетической терапии TDP43-протеинопатий необходимы именно такие модельные системы. Агрегаты TDP43 [Δ3-192] формируются быстро, они крупные, такие включения легко анализировать. Данная патогенная форма белка оказалась высокотоксичной, и клетки, получившие плазмидную конструкцию, содержащую в составе экспрессионного вектора последовательность TDP43 [Δ3-192], погибают уже через 12 часов после начала культивирования, в то

время как в контрольных культурах, получивших только векторные плазмиды, не содержащие кодирующих TDP43 последовательностей, клеточной гибели не наблюдалось (таблица).

Ранее было показано, что при агрегации мутантных форм потенциально амилоидогенного белка TDP43 формируются детергент-нерастворимые фибриллярные структуры, которые детектируются как в тканях пораженных отделов нервной системы больных, так и *in vitro* экспериментах [11, 29], а кроме того воспроизведены в различных экспериментальных системах: трансгенных животных [30] и клеточных культурах [33]. При этом, как показывает электронмикроскопический анализ, они не соответствуют характеристикам структур амилоидного типа [3-4]. Более того, формируемые этими фибриллярными структурами патогистологические включения не окрашиваются классическими красителями на амилоид — Конго красным и тиофлавином S. Таким образом, до настоящего времени во всех исследованных модельных TDP43-протеинопатиях и в аутопсийном материале больных с TDP43-протеинопатиями описаны патогистологические включения не амилоидного типа.

В полученной модели высокое содержание растворимых форм TDP43 обнаруживается в цитозольной фракции, что говорит об активном синтезе экзогенного белка. Существенная его часть очень быстро агрегирует до состояния «тяжелых» фибрилл, которые осаждаются центрифугированием при 80 000g, однако не являются конечными продуктами агрегации и переходят в растворимое состояние в присутствии тритона X-100. Важно, что [Δ3-192] форма TDP43 способна формировать детергент-нерастворимые агрегаты, поскольку накопление нерастворимых форм является важным признаком прогрессии протеинопатии.

Одним из подходов при разработке методов патогенетической терапии протеинопатий является стабилизация соотношения детергент-нерастворимых форм агрегирующих белков в клетке, поэтому разработанная нами клеточная модель TDP43-протеинопатии может быть использована для оценки и этого параметра при тестировании новых препаратов.

Одной из главных практических задач является разработка метода валидации ингибирующего эффекта на прогрессию TDP43-протеинопатии нейропротекторных соединений. Ранее было показано, что Димебон снижает прогрессию протеинопатии, вызванную различными потенциально-амилоидогенными белками. В модельных трансгенных мышах, Димебон ингибировал прогрессию гамма-синуклеинопатии, замедляя формирование гамма-синуклеин реактивных патогистологических включений в тканях пораженных отделов нервной системы модельных животных [1, 6]. Также Димебон эффективно ингибировал и прогрессию альфа-синуклеинопатии, как в клеточных модельных системах, так и в трансгенных животных, снижая скорость формирования нерастворимых α-синуклеин-реактивных цитоплазматических включений, в том числе и телец Леви [43]. Схожие данные получены при исследовании действия Димебона на модельные протеинопатии вызванные агрегацией Aβ-пептидов и tau белка [39, 41].

Тот факт, что Димебон способен ингибировать протеинопатию, вызванную абсолютно различающимися

по своим свойствам склонными к агрегации белками, позволяет предположить, что его действие, скорее всего, направлено на общие защитные механизмы и не зависит от типа потенциально-амилоидогенного белка. Исследования влияния Димебона на агрегацию TDP43 продемонстрировали, что Димебон способен ингибировать образование цитоплазматических агрегатов белка TDP43 [33]. При этом гистологический анализ показал, что терапевтическое действие Димебона обусловлено его влиянием на содержание нерастворимых агрегированных форм патогенных пептидов [2, 33], однако молекулярный механизм и непосредственные мишени его действия выявлены не были. Кроме того, используемые для моделирования TDP43-протеинопатии aberrантные белки формировали цитоплазматические включения, которые морфологически отличались от тех, что выявляются при патогистологическом анализе у больных с ФТД и БАС.

Важной научно-практической задачей является исследование действия препаратов на культуры зрелых нейронов, которые считаются более адекватными модельными системами, чем недифференцированные культуры, даже если они обладают многими важными свойствами нейронов. Поэтому в данной работе был изучен ингибирующий протеинопатию эффект Димебона как на недифференцированных культурах, так и в стимулированных к дифференцировке по нейрональному типу клетках. В результате было показано, что Димебон способен ингибировать агрегацию мутантной формы белка TDP43 в дифференцированных культурах не менее эффективно, чем в недифференцированных (рис. 2).

К настоящему времени разными лабораториями получено достаточно много данных, подтверждающих нейропротекторный эффект Димебона и ряда других соединений группы карболинов. При этом вопрос о конкретных молекулярных механизмах действия этих соединений остается открытым. Помимо ингибирования Н1 и Н2-рецепторов [40], Димебон подавляет также активность бути-

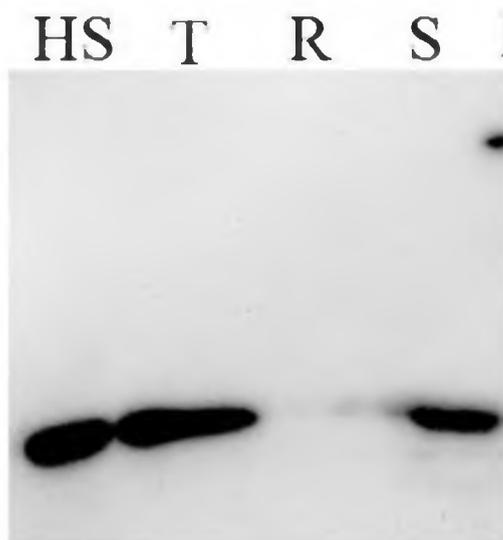


Рис. 3. Анализ содержания TDP43 [Δ3-192] в детергент-нерастворимых фракциях препаратов тотального белка из культуры клеток SH-SY5Y. Иммуноблотинг.

HS — фракция растворимых белков; T/R — фракция белков, растворимых в присутствии Тритон X100 или в детергентах RIPA буфера (R); S — фракция детергент-нерастворимых белков

рилхолинэстеразы, ацетилхолинэстеразы [32], блокирует потенциал-зависимые кальциевые каналы, N-метил-D-аспарататные рецепторы, адренергические и серотонинергические рецепторы [12], регулирует открытие митохондриальной поры, а также способен стабилизировать глутамат-индуцированные кальциевые токи [12, 18] и усиливать нейрогенез в гиппокампе [24]. Однако, ни в одной из этих работ не были выявлены молекулярные мишени Димебона, которые бы позволили проследить непосредственный механизм его нейропротекторного действия и объяснить, как и через какие пути осуществляется блокирование протеинопатии, результатом чего является замедление прогрессии нейродегенеративного процесса.

Ранее нами было показано, что хроническое введение Димебона трансгенным животным с развивающейся протеинопатией приводит к снижению содержания детергент-нерастворимых форм потенциально амилоидогенного белка в клетке и снижению содержания убиквитинированных высокомолекулярных белков в детергент-нерастворимых фракциях [2]. При этом до сих пор не установлено, действует ли Димебон непосредственно на процесс белковой агрегации или же его эффект связан с активацией процессов контролируемой деградации предсформированных белковых фибриллярных структур, в частности, аутофагосомной системы. С другой стороны, было показано, что Димебон способен влиять на клеточный метаболизм путём увеличения потребления глюкозы в мозге стареющих мышей [9] и повышать выживаемость клеточных культур при терминальной дифференцировке по нейрональному типу путём повышения митохондриальной активности [34]. Все эти данные позволяют предполагать, что Димебон может модулировать регуляцию клеточного ответа на внешние стрессы и при этом активировать компоненты внутринейронных систем контролируемой деградации aberrантных белковых форм.

В последнее время получены доказательства того, что Димебон способен активировать компоненты внутриклеточных систем контролируемой деградации белков, в частности, аутофагосомной системы [39, 43]. Аутофагия регулируется различными сигнальными путями: через каскад митоген-активируемых протеинкиназ (МАП), PI3K-Akt-mTOR и др. [42]. В ряде случаев причиной развития протеинопатии с последующей нейродегенерацией является именно утрата клеткой способности удалять из функционального пространства, изменившие конформацию и приобретшие патогенные свойства белки и формируемые ими нерастворимые белковые включения [13].

Ранее нами был исследован эффект Димебона на уровень транскрипции гена *ATG5*, кодирующего белок Atg5, который сначала ковалентно связывается с Atg12, затем к комплексу присоединяется Atg16 и, таким образом, формируется убиквитин-подобная конъюгированная структура, имеющая высокий тропизм к аутофагосомной мембране. Согласованные изменения уровня экспрессии всех трех составляющих комплекса могут служить достоверным индикатором активации программы аутофагии, поэтому нами было проанализировано действие Димебона и на другие два элемента комплекса — *ATG12* и *ATG16* [44]. Результаты данного исследования указывают на то, что Димебон модулирует экспрессию всех трех этих генов в SH-SY5Y культуре, и выявленный нами синхронный рост

в уровнях транскрипции *ATG5*, *ATG12* и *ATG16* может являться свидетельством стимуляции аутофагии.

Важным элементом механизма нейропротекторного действия Димебона является его влияние на функциональное состояние митохондрий [34]. Нами была исследована экспрессия гена *IRGM* [44]. Кодируемый им белок обладает ГТФ-азой активностью, активирует деление митохондрий, и участвует в процессах активации аутофагии [25]. Мы показали, что Димебон стимулирует экспрессию *IRGM* и это хорошо согласуется с пиком фосфорилирования киназы p38.

Киназы p38 и ERK1/2 могут быть активированы одновременно, при этом p38 способна ингибировать аутофагию, вызванную активацией ERK1/2 [8]. В исследуемой клеточной системе Димебон вызывает быстрое повышение содержания фосфорилированных форм киназ ERK1/2 и p38 и имеет не только кратковременный стимулирующий эффект, но также может оказывать длительные эффекты. Эти данные показывают, что Димебон способен стимулировать аутофагию в клеточных культурах, что также подтверждается в работах других исследователей [28, 39, 43].

Таким образом, было накоплено достаточно данных, чтобы считать Димебон перспективным соединением для разработки на его основе препаратов для патофизиологической терапии нейродегенеративных заболеваний, основой патогенеза которых является протеинопатия, поскольку он действует именно на ключевое звено патогенеза протеинопатий — накопление нерастворимых белковых агрегатов в составе патогенных включений.

Заключение

В данной работе представлены данные по созданию клеточной модельной системы, воспроизводящей основные элементы молекулярного патогенеза TDP43-протеинопатии и использованию ее для отбора нейропротекторных препаратов, необходимых при разработке методов патогенетической терапии НДЗ, основным молекулярно-патологическим звеном которых является агрегация белка TDP43. В ходе исследования была создана генетическая конструкция, кодирующая патогенную форму белка TDP43 [Δ3-192] человека, наиболее адекватно воспроизводящая в клеточной культуре нейробластомы человека SH-SY5Y образование TDP43-реактивных структур, имитирующих патогистологические включения, выявляемые в аутопсийном материале у больных с рядом форм ФТЛД и БАС.

В созданной модельной системе исследован ингибирующий прогрессию протеинопатии эффект Димебона на процессы формирования TDP43-реактивных включений и показано, что как в недифференцированных, так и в дифференцированных по нейрональному типу клетках SH-SY5Y, исследованное соединение снижает количество TDP43-реактивных включений с одинаковой эффективностью. Создание адекватных модельных систем для изучения молекулярных механизмов развития ФТЛД и воспроизведения наиболее важных аспектов патогенеза данного заболевания является необходимым условием прогресса в данном направлении и оптимизации направленного поиска соединений для разработки патофизиологической терапии ФТЛД.

Список литературы

1. Бачурин С.О., Устюгов А.А., Петерс О. Блокада нейродегенеративных процессов, вызванных протеинопатией, как новый механизм действия нейропротекторных и когнитивно-стимулирующих препаратов // ДАН. — 2009. — №428. — P. 262-265.
2. Устюгов А.А., Бачурин С.О., Петерс О., Шелковникова Т.А., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Димебон снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в детергент-нерастворимых фракциях *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2011. — Vol. 152, №12. — P. 675-678.
3. 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. — Vol. 46, №3. — P. 402-415.
4. Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Смирнов А.П., Скворцова В.И., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Мутации в гене FUS, ассоциированные с наследственными формами бокового амиотрофического склероза // Доклады академии наук. — 2011. — Vol. 438, №3. — P. 422-426.
5. Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y., Oda T. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2006. — Vol. 351, №3. — P. 602-11.
6. Bachurin S.O., Shelkvnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Khritankova I., Afanasieva M.A., Tarasova T.V., Alentov, II, Buchman V.L., Ninkina N.N. Dimebon slows progression of proteinopathy in gamma-synuclein transgenic mice // *Neurotox Res.* — 2012. — Vol. 22, №1. — P. 33-42.
7. Buratti E., Baralle F.E. The molecular links between TDP-43 dysfunction and neurodegeneration // *Adv Genet.* — 2009. — Vol. 66. — P. 1-34.
8. Corcelle E., Djerbi N., Mari M., Nebout M., Fiorini C., Fenichel P., Hofman P., Poujeol P., Mograbi B. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens // *Autophagy.* — 2007. — Vol. 3, №1. — P. 57-9.
9. Day M., Chandran P., Luo F., Rustay N.R., Markosyan S., LeBlond F., Fox G.B. Latrepirdine increases cerebral glucose utilization in aged mice as measured by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography // *Neuroscience.* — 2011. — Vol. 189. — P. 299-304.
10. Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. TDP-43: a novel neurodegenerative proteinopathy // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 2007. — Vol. 17, №5. — P. 548-55.
11. Gendron T.F., Rademakers R., Petrucelli L. TARDBP mutation analysis in TDP-43 proteinopathies and deciphering the toxicity of mutant TDP-43 // *J. Alzheimers Dis.* — 2012. — Vol. 33 Suppl 1. — P. S35-45.
12. Grigorev V.V., Dranyi O.A., Bachurin S.O. Comparative study of action mechanisms of dimebon and memantine on AMPA- and NMDA-subtypes glutamate receptors in rat cerebral neurons // *Bull Exp Biol Med.* — 2003. — Vol. 136, №5. — P. 474-7.
13. Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice // *Nature.* — 2006. — Vol. 441, №7095. — P. 885-9.
14. Hasegawa M., Arai T., Nonaka T., Kametani F., Yoshida M., Hashizume Y., Beach T.G., Buratti E., Baralle F., Morita M., Nakano I., Oda T., Tsuchiya K., Akiyama H. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis // *Ann Neurol.* — 2008. — Vol. 64, №1. — P. 60-70.
15. Kadokura A., Yamazaki T., Kakuda S., Makioka K., Lemerre C.A., Fujita Y., Takatama M., Okamoto K. Phosphorylation-dependent TDP-43 antibody detects intraneuronal dot-like structures showing morphological characters of granulovacuolar degeneration // *Neurosci Lett.* — 2009. — Vol. 463, №1. — P. 87-92.
16. Kanazawa M., Kakita A., Igarashi H., Takahashi T., Kawamura K., Takahashi H., Nakada T., Nishizawa M., Shimohata T. Biochemical and histopathological alterations in TAR DNA-binding protein-43 after acute ischemic stroke in rats // *J Neurochem.* — 2011. — Vol. 116, №6. — P. 957-65.
17. Lee E.B., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Neumann M. TDP-43 immunoreactivity in anoxic, ischemic and neoplastic lesions of the central nervous system // *Acta Neuropathol.* — 2008. — Vol. 115, №3. — P. 305-11.
18. Lermontova N.N., Redkozubov A.E., Shevtsova E.F., Serkova T.P., Kireeva E.G., Bachurin S.O. Dimebon and tacrine inhibit neurotoxic action of beta-amyloid in culture and block L-type Ca(2+) channels // *Bull Exp Biol Med.* — 2001. — Vol. 132, №5. — P. 1079-83.
19. Mackenzie I.R., Rademakers R., Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia // *Lancet Neurol.* — 2010. — Vol. 9, №10. — P. 995-1007.
20. Moisse K., Mephram J., Volkening K., Welch I., Hill T., Strong M.J. Cytosolic TDP-43 expression following axotomy is associated with caspase 3 activation in NFL-/- mice: support for a role for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury // *Brain Res.* — 2009. — Vol. 1296. — P. 176-86.
21. Moisse K., Volkening K., Leystra-Lantz C., Welch I., Hill T., Strong M.J. Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury // *Brain Res.* — 2009. — Vol. 1249. — P. 202-11.
22. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretzschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis // *Science.* — 2006. — Vol. 314, №5796. — P. 130-3.
23. Pesiridis G.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis // *Hum Mol Genet.* — 2009. — Vol. 18, №R2. — P. R156-62.
24. Pieper A.A., Xie S., Capota E., Estill S.J., Zhong J., Long J.M., Becker G.L., Huntington P., Goldman S.E., Shen C.H., Capota M., Britt J.K., Kotti T., Ure K., Brat D.J., Williams N.S., MacMillan K.S., Naidoo J., Melito L., Hsieh J., De Brabander J., Ready J.M., McKnight S.L. Discovery of a proneurogenic, neuroprotective chemical // *Cell.* — 2010. — Vol. 142, №1. — P. 39-51.
25. Singh S.B., Ornatowski W., Vergne I., Naylor J., Delgado M., Roberts E., Ponpuak M., Master S., Pilli M., White E., Komatsu M., Deretic V. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria // *Nat Cell Biol.* — 2010. — Vol. 12, №12. — P. 1154-65.
26. Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance C., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.C., Williams K.L., Buratti E., Baralle F., de Belleroche J., Mitchell J.D., Leigh P.N., Al-Chalabi A., Miller C.C., Nicholson G., Shaw C.E. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis // *Science.* — 2008. — Vol. 319, №5870. — P. 1668-72.
27. Strong M.J., Volkening K., Hammond R., Yang W., Strong W., Leystra-Lantz C., Shoemith C. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein // *Mol Cell Neurosci.* — 2007. — Vol. 35, №2. — P. 320-7.
28. Tesla R., Wolf H.P., Xu P., Drawbridge J., Estill S.J., Huntington P., McDaniel L., Knobbe W., Burket A., Tran S., Starwalt R., Morlock L., Naidoo J., Williams N.S., Ready J.M., McKnight S.L., Pieper A.A. Neuroprotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2012. — Vol. 109, №42. — P. 17016-21.
29. Thal D.R., Del Tredici K., Ludolph A.C., Hoozemans J.J., Rozemuller A.J., Braak H., Knippschild U. Stages of granulovacuolar degeneration: their relation to Alzheimer's disease and chronic stress response // *Acta Neuropathol.* — 2011. — Vol. 122, №5. — P. 577-89.
30. Tong J., Huang C., Bi F., Wu Q., Huang B., Zhou H. XBP1 depletion precedes ubiquitin aggregation and Golgi fragmentation in TDP-43 transgenic rats // *J Neurochem.* — 2012. — Vol. 123, №3. — P. 406-16.
31. Wang H.Y., Wang I.F., Bose J., Shen C.K. Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family // *Genomics.* — 2004. — Vol. 83, №1. — P. 130-9.
32. Wu J., Li Q., Bezprozvanny I. Evaluation of Dimebon in cellular model of Huntington's disease // *Mol Neurodegener.* — 2008. — Vol. 3. — P. 15.
33. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V.L., Ninkina N., Bachurin S.O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models // *FEBS Lett.* — 2009. — Vol. 583, №14. — P. 2419-24.

34. Zhang S., Hedskog L., Petersen C.A., Winblad B., Ankarcrona M. Dimebon (latrepirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death // *J Alzheimers Dis.* — 2010. — Vol. 21, №2. — P. 389-402.
35. Zhang Y.J., Xu Y.F., Dickey C.A., Buratti E., Baralle F., Bailey R., Pickering-Brown S., Dickson D., Petrucelli L. Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43 // *J. Neurosci.* — 2007. — Vol. 27, №39. — P. 10530-4.
36. Пат. 0 876 818 B1 Europen. Agent for Treating Neuro-Degenerative Disorders / S. Zefirov. Оpubл. 18.12.2002.
37. Пат. 6,187,785 В1США. Agent for treating neurodegenerative disorders / S. Zefirov. Оpubл. 13.02.2001.
38. Пат. 2106864 РФ. Средство для лечения болезни Альцгеймера / Н.С. Зефилов. Оpubл. 20.03.1998.
39. Bharadwaj P.R., Verdile G., Barr R.K., Gupta V., Steele J.W., Lachenmayer M.L., Yue Z., Ehrlich M.E., Petsko G., Ju S., Ringe D., Sankovich S.E., Caine J.M., Macreadie I.G., Gandy S., Martins R.N. Latrepirdine (Dimebon) enhances autophagy and reduces intracellular GFP-Abeta42 levels in yeast // *J Alzheimers Dis.* — 2012. — Vol. 32, №4. — P. 949-67.
40. Matveeva I.A. [Action of dimebon on histamine receptors] // *Farmakol Toksikol.* — 1983. — Vol. 46, №4. — P. 27-9.
41. Peters O.M., Connor-Robson N., Sokolov V.B., Aksinenko A.Y., Kukharsky M.S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. Chronic administration of dimebon ameliorates pathology in TauP301S transgenic mice // *J Alzheimers Dis.* — 2013. — Vol. 33, №4. — P. 1041-9.
42. Sridharan S., Jain K., Basu A. Regulation of Autophagy by Kinases // *Cancers.* — 2011. — Vol. 3, №2. — P. 2630-2654.
43. Steele J.W., Ju S., Lachenmayer M.L., Liken J., Stock A., Kim S.H., Delgado L.M., Alfaro I.E., Bernales S., Verdile G., Bharadwaj P., Gupta V., Barr R., Friss A., Dolios G., Wang R., Ringe D., Protter A.A., Martins R.N., Ehrlich M.E., Yue Z., Petsko G.A., Gandy S. Latrepirdine stimulates autophagy and reduces accumulation of alpha-synuclein in cells and in mouse brain // *Mol Psychiatry.* — 2012. 10.1038/mp.2012.115.
44. Хританкова И.В., Кухарский М.С., Лыткина О.А., Бачурин С.О., Шоринг Б.Ю. Активация компонентов аутофагосомной системы под действием димебона в культуре клеток нейробластомы человека // *Доклады Академии наук.* — 2012. — Vol. 446, №4. — P. 471-473.

Development of the TDP43-proteinopathia cell model to search approaches to pathogenic therapy of the Frontotemporal Lobar Degeneration

Kukharsky M.S.¹, Khritankova I.V.^{1,3}, Lytkina O.A.¹, Ovchinnikov R.K.¹, Ustugov A.A.¹, Sheikovnikova T.A.^{1,2}, Bronovitsky E.V.¹, Kokhan V.S.¹, Ninkina N.N.^{1,2,3}, Bachurin S.O.¹

¹ — Agency of Russian Academy of Sciences Institute of Physiologically Active Compounds RAS, Severniy lane, 1, Chernogolovka, 142432

² — Cardiff University, BIOS3, Cardiff, Museum Avenue CF10 1AX, UK

³ — FSBI Science-research institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, Baltiyskaya str., 8, 125315, Moscow

Change in compartmentalization of TDP43 protein, loss of its nuclear localization, and the protein loading in the cytoplasm, where it forms aggregates, are the important pathogenic factors of molecular dysfunction development during the TDP43-proteinopathies. Inhibition of the pathogenic proteins aggregation is considered now as a perspective approach to development of the methods of pathogenic therapy of neurodegenerative diseases caused by the proteinopathies. Development of convenient cell models, which are more adequately reproduce molecular mechanism of the proteins aggregation typical for the proteinopathies allows significant optimization of the development of compounds, which can specifically suppress or block different stages of the proteinopathy. The present work demonstrates the development of the original model of the TDP43-proteinopathy in the culture of human neuroblastoma SH-SY5Y cells with formation of typical TDP43-reactive structures, imitating pathogistological inclusions, which are revealed in tissue autopsy of patients with different forms of FLD. Russian preparation Dimebon with the neuroprotective effect can inhibit formation of the TDP43-reactive inclusions in this cell model. It can be assumed as the potential compound, on the basis of which the development of methods of the pathogenic therapy of TDP43-proteinopathy is possible, and some of the FLD forms, particularly.

Key words: neurodegeneration, dementia, frontotemporal lobar degeneration, TDP43