Моделирование бокового амиотрофического склероза: трансгенный метод

С.О. БАЧУРИН[1], Н.Н. НИНКИНА[1], Т.В. ТАРАСОВА[1], Т.В. ШЕЛКОВНИКОВА[1], Е.А. КОВРАЖКИНА[2]*, А.П. СМИРНОВ[2], О.Д. РАЗИНСКАЯ[2], В.И. СКВОРЦОВА[2]

[1]Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Московская область; [2]кафедра фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии Российского национального исследовательского университета им. Н.И. Пирогова, Москва

Modeling of lateral amyotrophic sclerosis: a transgenic method

S.O. BACHURIN, N.N. NINKINA, T.V. TARASOVA, T.V. SHELKOVNIKOVA, E.A. KOVRAZHKINA, A.P. SMIRNOV, O.D. RAZINSKAYA, V.I. SKVORTSOVA

Institute of Physiologicaly Active Substances of the Russian Academy of Science, Chernogolovka, Moscow Region; Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Ключевые слова: *боковой амиотрофический склероз, нейродегенерация, моделирование in vivo, клеточные культуры, трансгенные животные, СОД1, TDP-43, FUS.*

Key words: *amyotrophic lateral sclerosis, neurodegeneration, in vivo models, cell culture, transgenic animals, SOD1, TDP-43, FUS.*

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — тяжелое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся избирательным поражением мотонейронов, быстро и неуклонно прогрессирующее, неизбежно приводящее к смерти пациента, обычно не позднее 2—3 лет с момента дебюта. Несмотря на более чем 100-летнюю историю изучения данного заболевания, его этиология и патогенез остаются неизвестными, соответственно не существует и эффективного лечения. Неясной остается причина, запускающая нейродегенерацию, не выяснен патогенез избирательного поражения при БАС только двигательных нейронов [2, 29]. При этом заболевание характеризуется значительной клинической гетерогеностью, возрастной вариабельностью, разной скоростью прогрессирования, длительностью выживания пациента и частотой экстрамоторных симптомов [1]. Несмотря на превалирование в клинике БАС генерализованных двигательных нарушений, это заболевание представляет собой системную дегенерацию с изменением структуры коллагеновых волокон кожи и морфологии тромбоцитов, в ряде случаев БАС сопровождается также когнитивными нарушениями (БАС-деменция), реже — негрубо выраженными экстрапирамидными и сенсорными признаками.

Известно, что в 10—15% случаев БАС носит семейный характер. Несомненное присутствие в патогенезе данного заболевания генетической компоненты послужило основной к поиску и созданию клеточных и животных моделей прогрессирующей дегенерации мотонейронов [2]. Ранее нами был опубликован касающийся негенетических методов моделирования БАС[1] обзор. Настоящий обзор посвящен трансгенным моделям БАС. Они создаются на основе знаний о клинико-генетической гетерогенности данного заболевания, так как при семейных формах обнаружены дефекты гена Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы-1 (*СОД1*-зависимые), а также мутации в генах ДНК/РНК-связывающих белков *TDP43* и *FUS* (*TDP-43* и *FUS*-зависимые). Соответственно были созданы трасгенные модели со сверхэкспрессией *СОД1*, *TDP-43* и *FUS*.

Модели со сверхэкспрессией СОД1

Клеточные. Для получения моделей применяется метод трансфекции с последующим получением клонов клеток, стабильно экспрессирующих интересующий исследователя белок. Для нейрональных моделей в качестве исходной линии чаще используют клетки нейробластомы линий N2a (мышь) и SH-SY5Y (человек), однако могут применяться и линии ненейронального происхождения.

На клеточных культурах был выполнен ряд работ по изучению *СОД1* дикого типа и ее мутантных форм. Получены клоны, стабильно экспрессирующие *СОД1* дикого типа или белок, несущий мутацию G93A [8]. Обнаружено, что мутация G93A приводит к возрастанию концентрации Ca^{2+} в цитозоле, не коррелирующему с общим содержанием фермента и его активностью в клетке. В качестве модельной системы использовали также эмбриональные клетки почки человека HEK293FT [27]. Целью данного исследования было выяснить, способна ли *СОД1* дикого типа способствовать агрегации мутантной формы белка.

[1]Журнал неврологии и психатрии им. С.С. Корсакова 2013; 113: 8.

© Коллектив авторов, 2013

*e-mail: elekov2@yandex.ru

Обнаружено, что коэкспрессия белка дикого типа (человек или мышь) с мутантным геном человека (A4V, G85R, G93A) замедляла агрегацию мутантной формы, однако не была способна полностью ее блокировать. В некоторых случаях при выделении агрегатов мутантного белка в нем присутствовал и белок дикого типа. Мышиный белок дикого типа был также способен замедлять агрегацию мутантной формы *СОД1* человека, однако никогда не присутствовал в агрегатах.

Беспозвоночные. Ранние исследования показали, что отсутствие гомолога гена *СОД1* дрозофилы вызывает снижение продолжительности жизни и повышение восприимчивости к окислительному стрессу; затем было показано, что сверхэкспрессия гена *СОД1* дикого или мутантного типа как дрозофилы, так и человека приводит к нейротоксичности и агрегации этого белка [26]. Интересно, что аберрантные формы *СОД1* были способны «захватывать» белок дикого типа при формировании агрегатов. Любые функциональные ортологи СОД (например, *СОД1* человека) могли также захватывать белок дикого типа, что указало на высокую чувствительность СОД к конформационным изменениям. В другом исследовании [23] было показано, что экспрессия различных форм мутантного белка *СОД1* человека (мутации, ответственные за наследственные формы БАС у человека) у мух, у которых отсутствовал эндогенный белок, была связана с повышением окислительного стресса и резким снижением моторной функции, за которым следовала преждевременная гибель. При этом фенотип полностью восстанавливался экспрессией *СОД1* человека на минимальном (5—10%) уровне. Был также обнаружен эффект значительного (более 40%) снижения продолжительности жизни дрозофил при селективной экспрессии *СОД1* человека в мотонейронах [24].

Модель *СОД1*-токсичности впервые была получена T. Oeda и соавт. [25] с использованием нематоды *Caenorhabditis elegans* путем экспрессии белка дикого типа или мутантного, имеющего отношение к семейным формам БАС (мутации A4V, G37R или G93A), с помощью специфического для мышц промотора myo-3 или индуцируемого белками теплового шока промотора hsp-16.2 У трансгенных нематод не развивался выраженный фенотип при их содержании в нормальных условиях, однако при экспрессии мутантных форм *СОД1* повышалась их чувствительность к параквату. В другой работе [33] была получена модель с паннейрональной экспрессией СОД1 дикого типа или несущей мутацию *G85R* под контролем промотора гена snb-1, кодирующего синаптобревин. При экспрессии мутантной формы, но не белка дикого типа, снижалась подвижность нематод, кроме того, были обнаружены агрегаты белка в нейронах. Трансгенные нематоды, экспрессирующие *СОД1*, меченную флюоресцентным белком, были также получены с использованием специфичного для мышц промотора unc-54 для экспрессии форм *G85R*, *G93A* и укороченной формы белка [15]. При экспрессии мутантных форм фенотип нематод был слабовыраженным, однако введение в геном чувствительных к температуре миссенс-мутаций значительно повышало токсичность белка, что указывало на их патогенность.

Рыбы. Для получения трансгенной модели у рыб *Danio rerio*, экспрессирующей мутантный вариант *СОД1* (мутация G93R), использовали геномный район, содержащий эндогенный промотор *СОД1* и ген *СОД1* с применением искусственных бактериальных хромосом [28]. Ген *СОД1* высококонсервативен у человека, мыши и *Danio rerio,* выбранная мутация затрагивает район, консервативный для рыбы и человека и ассоциированный с БАС у человека. Аномалий у полученных трансгенных рыб не обнаруживалось до возраста 12 мес, затем проявлялись различные нарушения иннервации мускулатуры с угнетением двигательной активности, например снижением способности плыть против течения. У некоторых особей наблюдался временный паралич, обнаруживались дегенеративные изменения в митохондриях мотонейронов спинного мозга, также была снижена продолжительности жизни. Преимуществом данной модели является то, что *Danio rerio* может успешно использоваться для получения химерных животных и, таким образом, пригодна для изучения автономности клеток при БАС. Однако для исследования функциональных аспектов дегенерации мотонейронов необходимо применение более сложных моделей.

Мыши. С момента открытия наследственных форм БАС, развитие которых обусловлено мутациями в гене, кодирующем фермент *СОД1*, попытки исследователей были сосредоточены на создании *СОД1*-трансгенных моделей. Первыми полученными моделями были мыши со сверхэкспрессией мутантной формы *СОД1*, в которой глицин был замещен на аланин в положении 93 (G93A), либо аланин — на валин в положении 4 (A4V), т.е. несущие мутации, наиболее часто встречающиеся у больных с БАС. У этих животных моделей фенотипические проявления были пропорциональны количеству экспрессируемого белка, таким образом стало ясно, что мутированный белок приобретает свойство токсичности для клетки. У трансгенных животных первые симптомы заболевания включают слабость задних конечностей, при прогрессии заболевания наступает полный их паралич; на клеточном уровне отмечается дегенерация мотонейронов и их отростков, на более поздних стадиях — атрофия передних рогов спинного мозга, кроме того, поражаются мост и средний мозг [16].

Трансгенные по *СОД1* мыши широко используются в исследованиях механизмов развития БАС и тестирования терапевтических подходов, причем существенным преимуществом данных моделей является их относительная универсальность, обусловленная отсутствием симптоматических различий между семейными и спорадическими формами. Мнения по поводу первичной причины патологических изменений у этих моделей значительно различаются, так как были обнаружены нарушения функции многих систем на клеточном и молекулярном уровне — окислительный стресс, эксайтотоксичность, агрегация *СОД1*, нарушение функции аксонов, митохондриальная дисфункция, стресс эндоплазматического ретикулума и др. Очевидный недостаток таких моделей — моделирование патогенетических механизмов только 2% случаев БАС.

Трансгенные мыши со сверхэкспрессией мутантных форм *СОД1* человека достаточно хорошо воспроизводят фенотип и патоморфологические изменения при наследственных формах БАС, эти модели позволили установить связь между мутациями в гене *СОД1*, связанными с наследственным БАС, и агрегацией белков. Агрегаты *СОД1* впервые были обнаружены в астроцитах трансгенных мышей линии G85R (ранний признак развития патологии), их число увеличивается по мере прогрессирования заболевания. Убиквитин- и СОД-положительные включения

были обнаружены в нейронах и астроцитах трансгенных мышей, экспрессирующих варианты *СОД1 — G37R*, *G85R* и *G93A*. При использовании различных схем скрещивания были получены мыши *G85R*, у которых отсутствовал эндогенный белок, но присутствовало повышенное количество *СОД1* дикого типа человека; в данной модели не было обнаружено эффектов в отношении прогрессии заболевания, что является одним из доказательств связи токсичности белка с приобретением им новых свойств в результате мутаций, но не окислительным стрессом, опосредуемым супероксидом. Также было показано, что генетические манипуляции, направленные на повышение уровня белка, не способствовали значительному увеличению числа агрегатов в нейронах и астроцитах. В недавних исследованиях были проанализирован состав и локализация агрегатов *СОД1* у мышиных моделей БАС, было обнаружено, что агрегаты *СОД1* состоят из олигомерных форм мутантного белка.

Модели со сверхэкспрессией TDP-43

Клеточные. Для моделирования *TDP-43*-протеинопатии был создан ряд клеточных линий, транзиентно или конститутивно экспрессирующих меченные флюоресцентными и нефлуоресцентными репортерами формы TDP-43 (нормальный белок и его мутантные и укороченные формы) на основе популярных клеточных линий — HeLa, нейробластомы SK-N-SH, карциномы шейки матки HEK293, нейробластомы SH-5YSY, COS7, NSC-34, U2OS, NIH-3T3 [4, 11, 14, 24, 32]. Как основной подход для введения ДНК в клетки использовалась трансфекция, в качестве меток для визуализации белка чаще всего применяли зеленый и красный флюоресцентные белки и FLAG. Кроме того, TDP-43-протеинопатию моделировали в клетках линий Neuro2A и Cos1 после их нейрональной дифференцировки, а также культурах двигательных нейронов мыши [20, 21].

Постоянное перемещение белка между ядром и цитоплазмой было обнаружено при исследовании транзиентно трансфецированных клеток линии U2OS, в этом же исследовании было выявлено нарушение ядерной локализации белка у мутантных форм с делецией С-конца [4]. Домены, ответственные за предрасположенность *TDP-43* к агрегации, также были идентифицированы в экспериментах на клеточных культурах. В клеточной модели на основе линии SH-5YSY было обнаружено, что наиболее высокую способность к агрегации проявляют С-концевые фрагменты белка, тогда как N-концевые фрагменты не склонны к образованию агрегатов. Мутации, выявленные у пациентов с БАС (D169G, G294A, Q331K, M337V, Q343R, N390D, N390S), также повышали агрегационную способность белка [24]. На культурах мышиных двигательных нейронов была показана токсичность TDP-43 для клетки при сверхпродукции, в том числе и мутантных форм [21], однако для дифференцированных клеток линий Neuro2A и Cos1 подобного токсического эффекта обнаружено не было. Таким образом, в экспериментах на клеточных культурах были получены важные данные относительно клеточной патологии при TDP-43-протеинопатии.

Дрожжи. Дрожжевая модель TDP-43-протеинопатии представляет собой линию, несущую единственную копию гена *TDP-43* человека, объединенную с геном белка GFP под контролем галактозаиндуцибельного промотора, позволяющего синхронно индуцировать экспрессию гена в культуре клеток [19]. Модель позволяет исследовать механизмы перехода белка в токсичное состояние, включая потерю ядерной локализации, агрегацию и токсичность агрегированных форм. В силу простоты систем, как и большинство других моделей у беспозвоночных, позволяет изучать общебиологические аспекты функционирования белка, участвующего в развитии заболевания. Модель может использоваться для изучения токсичности TDP-43 при его агрегации, а также тестирования терапевтических средств, направленных на предотвращение или замедление агрегации белка и снижение его токсичности.

Беспозвоночные. Последовательность аминокислот в белке TDP-43 высококонсервативна у разных видов, например мышей, человека, *Drosophila* и *Caenorhabditis elegans*, так же как и его функция — связывание ДНК и регуляция сплайсинга [4, 32]. Первая генетическая модель TDP-43-опосредованной токсичности появилась у дрожжей [19], вскоре были предложены модели с использованием дрозофилы [13, 17]. Изучались фенотипы, появляющиеся в результате манипуляций как с эндогенным *TDP-43* дрозофилы (dTDP-43), так и с TDP-43 человека (hTDP-43). Оба белка имеют домены, ответственные за узнавание РНК, и глицин-богатый район, однако С-конец белка у дрозофилы содержит больше аминокислот. Нокаут или нокдаун гена приводит к летальности на стадии личинки, при этом мухи с одним функциональным аллелем не отличаются от контрольных особей. Таким образом, у дрозофилы TDP-43 необходим для развития и выживания. При сверхэкпрессии hTDP-43 и dTDP-43 фенотипы были эквивалентными, что свидетельствует о функциональной консервативности генов мухи и человека. При внесении в ген мутаций, приводящих к потере его функции, и при сверхэкспрессии гена фенотипы были сходными — снижались ветвление аксонов, число синаптических бутонов, диаметр аксонов и дендритов. Кроме того, сверхэкспрессия dTDP-43 усиливала ветвление дендритов сенсорных нейронов, что свидетельствует о различиях в функции TDP-43 в аксонах и дендритах.

Крысы. Для создания модели TDP-43-протеинопатии на крысах использовали вектор на основе аденоассоциированного вируса [32]. Вирусные частицы вводили в область черной субстанции. Как и ожидалось, экспрессия TDP-43 обнаруживалась в основном в ядре, однако также и в цитоплазме, причем через 4 нед было обнаружено как диффузное распределение белка, так и TDP-43-позитивные включения. В цитоплазме таких нейронов также накапливался убиквитин, при этом возрастало количество микроглиальных клеток, а часть нейронов деградировала, в них отмечались явления пикноза и апоптоза. Таким образом, экспрессия TDP-43 обусловливала гибель нейронов черной субстанции и их аксонов в стриатуме. Тем не менее данная модель в основном отражает патоморфологические изменения, свойственные фронтотемпоральной деменции, но не БАС.

Недавно были получены трансгенные крысы с применением техники инъекций в пронуклеус [37]. Использовали конструкцию, несущую TDP-43 с мутацией M337V, которая присутствует у пациентов с БАС из географически разобщенных популяций, а также конструкцию, несущую TDP-43 дикого типа. У трансгенных крыс с мутацией M337V развивался паралич, и они погибали вскоре после рождения. Для конструкции с геном дикого типа такого

эффекта обнаружено не было, что указывает на высокую токсичность мутантной формы белка. Исследователи ввели тетрациклиновый регуляторный элемент в конструкцию, который позволял исследовать экспрессию мутированного гена на разных стадиях развития. Было обнаружено, что первичная мишень дегенерации при этой мутации — аксоны, в результате чего развивается денервация мышц и их атрофия. На поздних стадиях заболевания происходит гибель нейронов, кроме того, было увеличено количество астро- и микроглиоцитов. Иммугистохимическое исследование показало присутствие диффузно распределенного фосфорилированного TDP-43 в нейронах трансгенных крыс. Таким образом, данная модель позволила достаточно хорошо воспроизвести патологические изменения, характерные для БАС, поэтому может использоваться для дальнейшего исследования патогенеза случаев БАС с патологией TDP-43 и скрининговых целей.

Мыши. Для создания трансгенных животных использовались конструкции, содержащие мутантный ген TDP-43 человека (с БАС-ассоциированными мутациями A315T и M337V) или ген дикого типа под контролем мышиного прионового промотора [30, 34, 36]. В исследовании I. Wegorzewska и соавт. [34] трансгенные мыши не обнаруживали каких-либо отклонений до возраста 3 мес, затем у них начинали развиваться аномалии передвижения, к возрасту 4,5 мес животные начинали терять вес, были совершенно неспособны передвигаться и погибали к 5 мес. При иммуногистохимическом исследовании были обнаружены убиквитин-положительные включения во многих отделах ЦНС, прежде всего двигательных нейронах спинного мозга и пирамидальных нейронах лобных долей коры головного мозга. Интересно, что эти включения не были TDP-43-иммунореактивными. На терминальных стадиях заболевания у мышей наблюдались гибель приблизительно 20% двигательных нейронов спинного мозга, дегенерация аксонов и электромиографические отклонения. Помимо полноразмерного белка TDP-43, обнаруживались его С-концевые укороченные формы размером около 25 кД, в основном на ранних стадиях заболевания, что позволило исследователям сделать вывод об участии этих форм в TDP-43-опосредуемой дегенерации в этой модели. TDP-43 присутствовал только в детергент-растворимых фракциях, что согласуется с отсутствием агрегатов в нервной системе мышей. Несмотря на характерные для БАС фенотипические проявления этой модели, отсутствие TDP-43-положительных включений, которые являются отличительным признаком TDP-ассоциированных форм БАС, можно отнести к несомненным ее недостаткам, и до сих пор непонятно, почему такие агрегаты не образовывались при сверхпродукции белка. Возможно, клетки гибли еще до формирования агрегатов из-за токсического эффекта избытка TDP-43 в цитоплазме.

В исследовании Y. Xu и соавт. [36] было обнаружено подавление экспрессии мышиной РНК, кодирующей TDP-43, при сверхэкспрессии трансгена. Было также обнаружено повышение уровня убиквитина, однако внутриядерные и цитоплазматические включения были TDP-43-позитивными (фосфорилированная и укороченная формы). Фенотипически мыши характеризовались реактивным глиозом, дегенерацией аксонов, нарушением передвижения и ранней гибелью.

N. Stallings и соавт. [30] был получен ряд линий с варьирующими уровнем экспрессии трансгена и степенью выраженности патологии. Авторами также была отмечена зависимость тяжести отклонений от дозы трансгена и его типа (белок дикого типа при умеренном уровне экспрессии не вызывал развития патологии). В одной из линий со сверхэкспрессией TDP-43 дикого типа наблюдалась прогрессирующая миопатия. Интересно, что, как и в работе [34], в исследовании [30] не было обнаружено колокализации убиквитина и TDP-43 при использовании антител против нефосфорилированной формы белка, тогда как фосфороспецифические антитела узнавали такие включения. Объяснений этому явлению пока не найдено.

Для получения трансгенных мышей использовали также мышиный нейрональный промотор Thy-1 и немутированный ген TDP-43. Уже к 14-му дню у трансгенных гомозиготных особей появлялись аномальный рефлекс задних конечностей, часто регистрируемый на ранних стадиях в других моделях БАС, нарушение передвижения, снижение показателей в тесте «ротарод» в 2,5 раза, наблюдались фасцикуляции и мышечные спазмы. Заболевание прогрессировало стремительно, в течение 25 дней после рождения у животных развивался паралич с последующим летальным исходом. В линиях с более низкой экспрессией трансгена развитие заболевания происходило медленнее — продолжительность жизни составляла до 7 мес.

Таким образом, TDP-43-трансгенные мыши демонстрируют БАС-подобный фенотип, зависимый от дозы трансгена. На гистологическом уровне линии преимущественно характеризуются наличием цитоплазматических убиквитинированных включений, снижением TDP-43-иммунореактивности в ядре; в пораженных участках ЦНС обнаруживаются астро- и микроглиоз, количество нейронов значительно снижено. Существует и ряд других моделей БАС с TDP-43-протеинопатией, в целом имеющих сходный набор характеристик и достаточно хорошо воспроизводящих патологию, характерную для данного заболевания.

Модели со сверхэкспрессией FUS

Клеточные. Первые данные по перераспределению FUS из ядра в цитоплазму и его накоплению в дендритах были получены еще до выявления роли этого белка в патогенезе БАС. В последующих работах с привлечением различных перевиваемых клеточных линий, таких как HeLa, HEK-293, NSC34, N2A, а также первичных культур нейронов гиппокампа и коры головного мозга были охарактеризованы основные патологические свойства разных форм этого белка [6, 10]. Именно на клеточных моделях впервые было показано, что мутантные формы FUS при сверхэкспрессии накапливаются в так называемых стресс-гранулах, а также продемонстрировано нарушение ядерного transportin-опосредованного транспорта мутантных форм.

Беспозвоночные. Недавно были предложены модели FUS-протеинопатии у дрозофил [9, 22, 35]. В работе Y. Chen и соавт. [9] при экспрессии нормального белка человека и FUS, несущего мутации R524S и P525L, под контролем UAS-Gal4 в фоторецепторах, грибовидных телах и мотонейронах мух наблюдались возрастзависимые нейродегенеративные изменения, в том числе повреждение аксонов. В работе L. Miguel и соавт. [22] FUS, продуцируемый в ретинальных клетках, накапливался в растворимой форме и приводил к развитию слабовыраженного фено-

типа, а при экспрессии этих же форм в нейронах белок накапливался в нерастворимой фракции, при этом существенно снижалась продолжительность жизни мух. Однако для нейротоксического действия образование агрегатов FUS не было обязательным условием. Авторы считают, что и у человека первичное токсическое действие характеризуется FUS в растворимой форме, но не его агрегированными формами. R. Xia и соавт. [35] исследовали эффект сверхэкспрессии немутированного FUS человека, его мутантной формы и ортолога FUS дрозофилы, Cabeza (Caz), в мотонейронах дрозофилы. Все три формы приводили к нарушению двигательной активности мух, апоптозу мотонейронов и денервации мышц. Авторы также показали, что присутствие сигнала ядерной локализации играет важную роль в токсичности белка.

Одновременно A. Vaccaro и соавт. [31] разработали модель на основе *Caenorhabditis elegans*, в которой мутантный FUS экспрессировался в ГАМКергических мотонейронах, что приводило к возрастзависимому снижению двигательной активности, параличу и нейродегенерации у нематод. При этом белок накапливался в нерастворимой форме, тогда как немутантный FUS оставался растворимым при его сверхэкспрессии. Авторам также удалось разработать систему скрининга в жидкой среде на основе данной модели.

Крысы. В настоящий момент имеется лишь одна модель FUS-протеинопатии у грызунов — крысы со сверхэкспрессией нормального или мутантного FUS (R521C) человека [18], мышиных моделей пока не предложено. Крысы, экспрессирующие мутантный FUS, но не FUS дикого типа, характеризовались прогрессирующим параличом, дегенерацией аксонов и гибелью нейронов в коре и гиппокампе. В нервной системе накапливались убиквитированные агрегаты и наблюдалась воспалительная реакция. Тем не менее гибели мотонейронов зарегистрировано не было, также в данной модели не удалось добиться агрегации FUS. В целом данная модель обладает некоторыми фенотипическими признаками БАС и фронтотемпоральной деменции, однако не воспроизводит многих характерных патологических черт, прежде всего гибели мотонейронов. Таким образом, требуется дальнейшая работа в данном направлении и разработке других моделей FUS-протеинопатии у мышей и крыс.

Другие трансгенные модели

Известно, что мутации в гене *ALS2*, кодирующем белок алсин (*alsin*), участвуют в патогенезе некоторых форм БАС. Были получены мыши, нокаутные по этому гену, у которых наблюдается нарушение координации движений, аномальный эндосомальный транспорт, дегенерация аксонов и повышенная чувствительность к окислительному стрессу. При этом дегенерация мотонейронов в данной модели не обнаруживается, но она может использоваться для изучения изменений физиологии нейронов, например нарушения аксонального транспорта [7].

Предложен ряд трансгенных моделей, в которых экспрессия мутантных белков мыши и человека приводит к развитию патологии, в той или иной степени сходной с наблюдаемой при БАС. Чаще всего при моделировании используются манипуляции с генами, вызывающими селективную гибель мотонейронов через тот или иной механизм. Одна из них — мышиная модель мотонейронного расстройства с поздним началом, вызываемого делецией рецептора оксистерола — рецептора X-β печени. Этот рецептор участвует в регуляции обмена холестерина, липидов и ослаблении воспалительных ответов в периферических органах и ЦНС (в том числе ингибирует воспалительный ответ, опосредуемый микро- и астроглией). У трансгенных мышей в возрасте 8 мес появляются нарушение обучения и координации движений, морфологически — потеря мотонейронов, реактивный глиоз и накопление липидов и холестерина в мотонейронах спинного мозга, а также уменьшение количества нервно-мышечных синапсов [3, 5]. В данной модели отсутствует избирательность в отношении мотонейронов, наблюдается гибель и других нейронов спинного мозга, кроме того, даже в возрасте 24 мес у мышей не развивается паралич, уменьшение продолжительности жизни также не было обнаружено. Таким образом, использование данной модели весьма ограничено.

Основные патологические признаки БАС были выявлены при изучении мышей, трансгенных по гену g-синуклеина мыши [2]. Двигательные нарушения, развитие которых быстро прогрессировало и заканчивалось параличом задних и передних конечностей, регистрировались у этих животных с возраста 6 мес, продолжительность жизни была снижена. Результаты поведенческих тестов для оценки координации движений и равновесия у трансгенных мышей были существенно хуже по сравнению с мышами дикого типа. Гистологически у трансгенных мышей обнаруживалось значительное число g-синуклеин и убиквитин-положительных включений в спинном мозге наряду с нейровоспалительными изменениями (астроглиоз). Кроме того, количество мотонейронов у этих животных к возрасту 12 мес снижалось на 40% по сравнению с животными дикого типа, развитие патологии сопровождалось также дегенерацией аксонов. Таким образом, описанная модель обладает многими клинико-морфологическими признаками, сходными с БАС у человека.

Подобные модели являются симптоматическими, так как для многих из них не доказано, что механизмы развития наблюдаемой патологии могут иметь место и у человека при БАС. Тем не менее исследования с использованием подобных симптоматических моделей являются крайне важными, так как известно, что лишь 10% случаев БАС — наследуемые формы, молекулярные и клеточные механизмы развития болезни в спорадических случаях, которые составляют подавляющее большинство, изучены недостаточно. Модели, подобные описанным выше, могут быть полезны именно при изучении спорадических форм БАС.

Таким образом, многообразие доступных на сегодня моделей БАС в значительной степени обусловило прогресс, достигнутый в изучении патогенетических основ этого заболевания. Невозможно переоценить важность всех созданных моделей, так как каждая из них позволила внести определенный вклад в исследование патогенеза заболевания на каждом из этапов его развития. Например, клеточные культуры — незаменимый инструмент для проверки и валидации научных гипотез об основах развития патологии при нарушении метаболизма вовлеченных в патогенез БАС белков, а также влияния мутаций на свойства последних. Моделирование у беспозвоночных позволяет устанавливать детерминанты, определяющие белковую токсичность, а также изучать

белковые взаимодействия. Наконец, позвоночные, прежде всего грызуны, наиболее адекватно отражают механизм развития патологии у человека и являются наиболее релеватными моделями, для которых возможна экстраполяция данных на человека. Все модельные организмы могут использоваться в биоскрининге либо для оценки прямого воздействия терапевтических подходов на метаболизм белка (клеточные модели), либо их эффекта на организм в целом, с учетом межклеточных взаимодействий.

Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России за 2007—2012 гг. (государственный контракт №16.11.512.2080) и гранта Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (руководитель Н.Н. Нинкина).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Скворцова В.И., Смирнов А.П., Алехин А.В., Ковражкина Е.А.* Клинико-эпидемиологическое исследование болезни двигательного нейрона в Москве. Журн неврол и психиат 2009; 109: 3: 53—55.
2. *Скворцова В.И., Бачурин С.О., Разинская О.Д. и др.* Новые аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза. Журн неврол и психиат 2011; 111: 2: 4—9.
3. *Andersson S., Gustafsson N., Warner M. et al.* Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 3857—3862.
4. *Ayala Y.M., Zago P., D'Ambrogio A. et al.* Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. J Cell Sci 2008; 121: Pt 22: 3778—3785.
5. *Bigini P., Steffensen K.R., Ferrario A., Diomede L., Ferrara G., Barbera S., Salzano S., Fumagalli E., Ghezzi P., Mennini T., Gustafsson J.A.* Neuropathologic and biochemical changes during disease progression in liver X receptor beta-/mice, a model of adult neuron disease. J Neuropathol Exp Neurol 2010; 69: 6: 593—605.
6. *Bosco D.A., Lemay N., Ko H.K. et al.* Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. Hum Mol Genet 2010; 19: 21: 4160—4175.
7. *Cai H., Lin X., Xie C., Laird F.M., Lai C., Wen H., Chiang H.C., Shim H., Farah M.H., Hoke A., Price D.L., Wong P.C.* Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knockout mice but predisposes neurons to oxidative stress. J Neurosci 2005; 25: 7567—7574.
8. *Carrì M.T., Ferri A., Battistoni A., Famhy L., Gabbianelli R., Poccia F., Rotilio G.* Expression of a Cu, Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca^{2+} concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. FEBS Lett 1997; 414: 2: 365—368.
9. *Chen Y., Yang M., Deng J., Chen X., Ye Y., Zhu L., Liu J., Ye H., Shen Y., Li Y., Rao E.J., Fushimi K., Zhou X., Bigio E.H., Mesulam M., Xu Q., Wu J.Y.* Expression of human FUS protein in Drosophila leads to progressive neurodegeneration. Protein Cell 2011; 2: 6: 477—486: doi: 10.1007/s13238-011-1065-7.
10. *Dormann D., Rodde R., Edbauer D. et al.* ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. EMBO J 2010; 29: 16: 2841—2857.
11. *Duan W., Li X., Shi J., Guo Y., Li Z., Li C.* Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell. Neuroscience 2010; 169: 4: 1621—1629.
12. *Elia A.J., Parkes T.L., Kirby K., St George-Hyslop P., Boulianne G.L., Phillips J.P., Hilliker A.J.* Expression of human FALS SOD in motorneurons of Drosophila. Free Radic Biol Med 1999; 26: 9—10: 1332—1338.
13. *Feiguin F., Godena V.K., Romano G., D'Ambrogio A., Klima R., Baralle F.E.* Depletion of TDP-43 affects Drosophila motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. FEBS Lett 2009; 583: 10: 1586—1592.
14. *Fuentealba R.A., Udan M., Bell S. et al.* Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43. J Biol Chem 2010; 285: 34: 26304—26314.
15. *Gidalevitz T., Krupinski T., Garcia S., Morimoto R.I.* Destabilizing protein polymorphisms in the genetic background direct phenotypic expression of mutant SOD1 toxicity. PLoS Genet 2009; 5: 3: 1000399.
16. *Gurney M.E., Pu H., Chiu A.Y., Dal Canto M.C., Polchow C.Y., Alexander D.D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y.W., Deng H.X., Chen W., Zhai P., Sufit R.L., Siddique T.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. Science
17. *Hanson K.A., Kim S.H., Wassarman D.A., Tibbetts R.S.* Ubiquilin modifies TDP-43 toxicity in a Drosophila model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). J Biol Chem 2010; 285: 15: 11068—11072.
18. *Huang C., Zhou H., Tong J., Chen H., Liu Y.J., Wang D., Wei X., Xia X.G.* FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. PLoS Genet 2011; 7: 3: 1002011.
19. *Johnson B.S., J. Michael McCaffery, Susan Lindquist, Aaron D. Gitler.* A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 17: 6439—6444.
20. *Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion P. et al.* TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. Nat Genet 2008; 40: 572—574.
21. *Kabashi E., Lin L., Tradewell M.L. et al.* Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. Hum Mol Genet 2010; 19: 4: 671—683.
22. *Miguel L., Avequin T., Delarue M., Feuillette S., Frébourg T., Campion D., Lecourtois M.* Accumulation of insoluble forms of FUS protein correlates with toxicity in Drosophila. Neurobiol Aging 2012; 33: 5: 1008—1008.
23. *Mockett R.J., Radyuk S.N., Benes J.J., Orr W.C., Sohal R.S.* Phenotypic effects of familial amyotrophic lateral sclerosis mutant Sod alleles in transgenic Drosophila. Proc Natl Acad Sci
24. *Nonaka T., Kametani F., Arai T., Akiyama H., Hasegawa M.* Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. Hum Mol Genet 2009; 18: 18: 3353—3364.
25. *Oeda T., Shimohama S., Kitagawa N., Kohno R., Imura T., Shibasaki H., Ishii N.* Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic Caenorhabditis elegans. Hum Mol Genet 2001; 10: 19: 2013—2023.
26. *Philips T., Robberecht W.* Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. Lancet Neurol 2011; 10: 3: 253—263.
27. *Prudencio M., Armando Durazo, Julian P. Whitelegge, David R.* Borchelt Modulation of mutant superoxide dismutase 1 aggregation by co-expression of wild-type enzyme Neurochem 2009; 108: 4: 1009—1018.
28. *Ramesh T., Lyon A.N., Pineda R.H., Wang C., Janssen P.M., Canan B.D., Burghes A.H., Beattie C.E.* Genetic model of amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish displays phenotypic hallmarks of motoneuron disease. Dis Model Mech 2010; 9—10: 652—662.
29. *Skvortsova V.I., Limborskaia S.A., Sokolov K.V., Levitskiĭ G.N.* Molecular mechanisms of motor neuron disease. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova 2005; 105: Specil Issue—Stroke, 4: 68—76.
30. *Stallings N.R., Puttaparthi K., Luther C.M., Burns D.K., Elliott J.L.* Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. Neurobiol Dis 2010; 40: 2: 404—414.
31. *Vaccaro A., Tauffenberger A., Aggad D., Rouleau G., Drapeau P., Parker J.A.* Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in C. elegans. PLoS One 2012; 7: 2: 31321.
32. *Wang D.B., Dayton R.D., Henning P.P., Cain C.D., Zhao L.R., Schrott L.M., Orchard E.A., Knight D.S., Klein R.L.* Expansive gene transfer in the rat CNS rapidly produces amyotrophic lateral sclerosis relevant sequelae when TDP-43 is overexpressed. Mol Ther 2010; 18: 12: 2064.
33. *Wang J., Farr G.W., Hall D.H., Li F., Furtak K., Dreier L., Horwich A.L.* An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of Caenorhabditis elegans. PLoS Genet 2009; 5: 1: 1000350.
34. *Wegorzewska I., Bell S., Nigel J. Cairns, Timothy M. Miller, Robert H. Baloh.* TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. PNAS 2009; 106: 44: 18809—18814.
35. *Xia R., Liu Y., Yang L., Gal J., Zhu H., Jia J.* Mol Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS. Neurodegener 2012; 7: 1: 10.
36. *Xu Y.F., Gendron T.F., Zhang Y.J. et al.* Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. J Neurosci 2010; 30: 32: 10851—10859.
37. *Zhou H., Huang H., Chen D. et al.* Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. PLoS Genet 2010; 6: 1000887.