

Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека

А.В. ДЕЙКИН¹, Е.А. КОВРАЖКИНА^{1,3*}, Р.К. ОВЧИННИКОВ^{2,4}, Е.В. БРОНОВИЦКИЙ², О.Д. РАЗИНСКАЯ³, А.П. СМIRНОВ³, Т.Г. ЕРМОЛКЕВИЧ¹, А.Б. ЕЛЯКОВ¹, А.Н. ПОПОВ¹, Е.Н. ФЕДОРОВ², О.А. ЛЫТКИНА², М.С. КУХАРСКИЙ², Т.В. ТАРАСОВА^{1,2,4}, Т.А. ШЕЛКОВНИКОВА², А.А. УСТЮГОВ², Н.Н. НИНКИНА^{2,4}, И.Л. ГОЛЬДМАН¹, Е.Р. САДЧИКОВА¹, С.О. БАЧУРИН², В.И. СКВОРЦОВА³

¹ФГБУ «Институт биологии гена» РАН, Москва; ²ФГБУ «Институт физиологически активных веществ» РАН, Черноголовка, Московская обл.; ³ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва; ⁴ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН, Москва

A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein

A.V. DEYKIN, E.A. KOVRAZHINA, R.K. OVCHINNIKOV, E.V. BRONOVITSKY, O.D. RAZINSKAYA, A.P. SMIRNOV, T.G. ERMOLKEVICH, A.B. ELYAKOV, A.N. POPOV, E.N. FEDOROV, O.A. LYTKINA, M.S. KUKHARSKIY, T.V. TARASOVA, T.A. SHELKOVNIKOVA, A.A. USTYUGOV, N.N. NINKINA, I.L. GOLDMAN, E.R. SADCHIKOVA, S.O. BACHURIN, V.I. SKVORTSOVA

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region; Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; Research Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Цель исследования. Нарушения конформации и функции ряда белков, обладающих повышенной склонностью к агрегации, являются важной составляющей патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний. В последнее время выявлен ряд новых белков, способных образовывать агрегаты неамилоидного типа, что в свою очередь потребовало создания новых модельных систем нейродегенерации, а также уточнения характеристик уже имеющихся *in vivo* моделей. Установлено, что в патогенезе некоторых форм бокового амиотрофического склероза (БАС) и лобно-височной деменции критическую роль играют ДНК/РНК-связывающие белки — FUS и TDP-43. **Цель данной работы** — создание новой трансгенной модели БАС. **Материал и методы.** Была выявлена патогенная форма белка FUS, способная агрегировать и формировать внутриклеточные депозиты, морфологически сходные с таковыми, обнаруживаемыми в аутопсийном материале больных, умерших от БАС. **Результаты и заключение.** Создана линия трансгенных мышей, в нервной системе которых экспрессируется патогенная форма белка FUS человека, что ведет к агрегации этого белка в двигательных нейронах спинного мозга с последующим развитием их дегенерации и схожего с БАС человека фенотипа заболевания. Фенотип развивающейся у трансгенных мышей нейродегенерации соответствует многим клиническим особенностям БАС у человека и является адекватной трансгенной моделью данного заболевания.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, боковой амиотрофический склероз (БАС), протеинопатии, ДНК/РНК-связывающие белки, FUS, трансгенная модель.

Background and objective. Loss of conformation and function of sufficient number of proteins with high aggregation capacity plays an important role in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders (NDD). Due to a recent discovery of new array of proteins with the capacity to form aggregates of nonamyloid type, new NDD models as well as a new level of understanding *in vivo* models which are already exist is needed. DNA/RN Abinding proteins — FUS and TDP-43 play a crucial role in the pathogenesis of some forms of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal dementia. The objective of the study was to develop a new ALS transgenic model. **Material and methods.** In cell culture experiments, we studied mutant FUS proteins capable to form intracellular deposits morphologically similar to those observed in the autopsy material of ALS patients. **Results and conclusion.** We created a transgenic mice line, in which a pathogenic form of human FUS protein was expressed in the nervous system. That led to the aggregation of FUS protein in spinal cord and motor neurons with the following degeneration and development of a phenotype, similar to the human ALS disease phenotype, in young grown-up animals. This neurodegenerative phenotype corresponds to a great number of clinical manifestations of human ALS and is an adequate transgenic model of the disease.

Key words: neurodegenerative diseases, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), RNA/DNA binding proteins, FUS, transgenic model.

К настоящему времени описано большое количество мутаций в генах, кодирующих ДНК/РНК-связывающие белки — FUS и TDP-43, которые ассоциированы с развитием бокового амиотрофического склероза (БАС) и лобно-височной деменции (ЛВД) [1–6]. В двигательных нейронах пациентов, несущих мутации в гене *FUS*, происходит перераспределение в норме имеющего ядерную локализацию белка, и значительная его часть обнаруживается в цитоплазме в виде характерных включений [7–11]. Более того, FUS-реактивные включения были выявлены и у пациентов со спорадическими формами БАС [12], ЛВД [13], заболеваниями с атипичными включениями промежуточных филаментов [14], болезнью Лафоры [15] и болезнью Унферрихта—Лундборга [16], что указывает на их важную роль в развитии нейродегенераций (нейродегенеративного процесса) [17–19].

При этом остается неизвестным, что является первичной и основной причиной патологий, связанных с аномальным функционированием белка FUS: агрегация aberrантной формы белка или же нарушения метаболизма РНК в клетке [20]. Ранее были показаны [21] молекулярные механизмы участия белков FUS и TDP-43 в метаболизме РНК, но агрегация белка FUS с образованием депозитов в поврежденных нейронах никогда не рассматривалась как инициатор прогрессии патологических изменений. Кроме того, в модельных трансгенных организмах со сверхэкспрессией полноразмерного или укороченного FUS с удаленным одним лишь сигналом ядерной локализации не удавалось достичь необходимого уровня агрегации белка и развития выраженной протеинопатии [22–25]. Мы предположили, что для инициации и эффективной агрегации FUS необходимо нарушение связывания этого белка с РНК, приводящее к его накоплению в цитоплазме и образованию патогенных комплексов с другими белками вместо естественного субстрата РНК, а также формированию включений. В результате нами была создана генетическая конструкция, кодирующая aberrантную форму белка FUS с удаленным сигналом ядерной локализации и неспособная к взаимодействию с РНК [2]. Данная конструкция была введена в геном мыши, где благодаря использованию нейронального промотора *Thy1* была получена ее экспрессия преимущественно в нервной системе модельных животных. Даже относительно низкий уровень экспрессии aberrантной формы FUS у трансгенных мышей инициировал развитие FUS-протеинопатии с последующим специфическим повреждением двигательных нейронов и появлением клинической картины БАС. Таким образом, нами были получены прямые доказательства ключевой роли дисфункции белка FUS в патогенезе БАС и создана новая трансгенная модель этого заболевания, которая может быть использована как для дальнейшего изучения молекулярных механизмов, сопровождающих патологию двигательных нейронов, так и с целью разработки эффективной терапии.

Цель работы — создание новой трансгенной модели БАС, в основе молекулярного патогенеза которой лежит патогенная агрегация белка FUS.

Материал и методы

Конструирование трансгенной кассеты

Последовательность гена FUS человека, кодирующая укороченную форму белка (аминокислоты с 1-й по 359-ю)

была амплифицирована из плазмиды 323-pTSC21k [3] с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), в которой были использованы праймеры, содержащие сайты рестрикции для XhoI: 5'-TCTCGAGCTATGGCCTCAAACGATTATAC-3' и 5'-ACTCGAGTTAGAATTCTTTACCATCAAACC-3'.

XhoI-фрагмент после вырезания из агарозного геля был встроен в вектор 323-pTSC21k по XhoI-сайту, расположенному в линкерной последовательности. Ориентацию фрагмента и корректность кодирующей FUS последовательности определяли секвенированием.

Получение трансгенных мышей

Для микроинъекций в пронуклеус использовали раствор плазмидной ДНК (5 нг/мкл), линеаризованной рестрикционной эндонуклеазой NotI и очищенной из агарозного геля. В работе использовались мыши линии C57BL/6хСВА. Мыши в возрасте от 4 до 6 нед (средняя масса 12 г) использовались в качестве доноров яйцеклеток, остальные работы проводились на взрослых мышах. Реконбиантную ДНК микроинъектировали в пронуклеус зигот мыши на стадии двух пронуклеусов. Инъекцию проводили преимущественно в мужской пронуклеус. Зиготы помещали в камеру, состоящую из двух покровных стекол, закрепленных одно над другим таким образом, чтобы верхний и нижний края капли среды были плоские и параллельные. Визуализировали пронуклеусы с помощью DIC-оптики на микроскопе Axiovert 200 («Zeiss», Германия). Иглы для микроинъекции готовили из стеклянных капилляров G100 («Narishige», Япония) на пуллере P97 (Shutter instruments, США), капилляро-держатель готовили из капилляров GD1 («Narishige», Япония) на пуллере рос-10 («Narishige», Япония) и микрокузнице MF-900 («Narishige», Япония). После микроинъекции зиготы культивировали в течение 2–3 ч в CO₂-инкубаторе IGO 150 («Thermo Electron Corporation», Франция). После культивирования клетки визуально оценивались, и те из них, которые находились в удовлетворительном состоянии, пересаживались самкам-реципиентам. Культивирование яйцеклеток осуществлялось в CO₂-инкубаторе при содержании углекислого газа в воздухе 5 и 100% влажности. Культивирование проходило в чашках Петри диаметром 35 мм в каплях размером 50–60 мкл. Сверху капли покрывались легким минеральным маслом категории «embryo tested». Все подготовительные процедуры осуществлялись в ламинарном боксе. Яйцеклетки мышам-реципиентам пересаживали спустя 2–3 ч после микроинъекции. Для этого отбирались жизнеспособные яйцеклетки, пережившие микроинъекцию. Пересадка проводилась хирургически под наркозом Avertin.

Генотипирование трансгенных животных проводили методом ПЦР с использованием праймеров 5'-TCTTTGTGCAAGGCCTGGGT-3' и 5'-AGAAGCAAGACCTCTGCAGAG-3', характерный для трансгенной кассеты фрагмент размером 255 bp выявляли в агарозном геле. Трансен поддерживается в геноме трансгенных мышей в гемизиготном состоянии.

Экспериментальные животные были получены и поддерживались на генетической основе гибридной линии C57Bl/6хСВА. Работы с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (2003).

Выделение тканей, фиксация и приготовление срезов. Подопытных животных подвергали медикаментозной эвтаназии путем внутрибрюшинного введения летальной дозы пентобарбитала натрия (euthatal). Образцы тканей замораживали в жидком азоте или фиксировали для последующего гистохимического анализа в холодном растворе 4% параформальдегида, проводили дегидратацию образцов в батарее спиртов и хлороформа, после чего заключали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 8 мкм получали с помощью ротационного микротомы RM2265 («Leica», Германия) и монтировали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном («Thermo Scientific», Великобритания). Срезы депарафинизировали в ксилоле с последующей регидратацией в серии спиртов понижающейся концентрации.

Иммуногистохимический анализ. Депарафинизированные срезы для иммуногистохимической окраски инкубировали в 3% перекиси водорода в метаноле в течение 30 мин при 4°C, отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали в блокирующем растворе ФСБ, содержащем 10% сыворотки лошади и 0,4% Твин 20 (ФСБ-Т) в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего инкубировали с первичными поликлональными антителами против FUS (rabbit polyclonal, Abcam; mouse polyclonal, BD Biosciences) в том же блокирующем буфере при комнатной температуре в течение 1 ч.

Препараты отмывали в ФСБ и инкубировали со вторичными биотинилированными антителами (Vectastain ABC kit, «Vector Laboratories», Великобритания) в ФСБ-Т в течение 1,5 ч, снова промывали в ФСБ и добавляли 3,3-диаминобензидин («Sigma», США), далее инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре и отмывали в воде в течение 5 мин. Дегидратацию срезов проводили в серии спиртов (50, 95 и 100% этанол по 5 мин), осветляли срезы в ксилоле в течение 10 мин, заключали в синтетическую среду DPX (BDH, Великобритания) и подсушивали. Микрофотографии получали при помощи фотокамеры Leica DFS 490 и программного обеспечения Leica Application Suit v. 2.8.1 («Leica Microsystems», Швейцария).

ОТ-рвПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus (Qiagen), синтезировали комплементарную цепь ДНК в реакции обратной транскрипции с использованием фермента SuperScript III (Invitrogen) и гексамерного рандом-праймера (Promega). ПЦР в реальном времени проводили с полученной кДНК в качестве матрицы в амплификаторе StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes). Для детекции транскриптов FUS человека использовали праймеры TCTTTGTGCAAGCCTGGGT и TAATCATGGGCTGTCCGTT. В качестве внутреннего контроля определяли уровень экспрессии гена *GAPDH* мыши с использованием праймеров: CACTGAG CATCTCCCTCASC и GTGGGTGCAGCGAАСТТТAT.

Иммуноблоттинг. Для анализа белков проводили экстракцию тотального белка из тканей отделов нервной системы. Белки разделяли с помощью электрофореза на ПААГ геле в денатурирующих условиях, переносят на PVDF (поливинилдендифторидную) мембрану (Hybon-P, «Amersham»), используя полусухой метод. После блокировки мембрану инкубировали с первичными поликлональными антителами против FUS человека (rabbit poly-

clonal, Abcam; BD Biosciences), отмывали и инкубировали с вторичными антителами против иммуноглобулина (Ig) кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Amersham). Визуализацию осуществляли в стандартной ECL-реакции как описано ранее [26]. Мембрану использовали повторно для инкубации с антителами против *GAPDH* в качестве внутреннего контроля.

Результаты и обсуждение

Трансгенная кассета: генетическая конструкция, кодирующая aberrантную форму белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации и нарушенным РНК-взаимодействием вследствие делеции основной области распознавания и связывания РНК (два С-концевых РНК — связывающих мотива — RGG — боксы (Arg-Gly-Gly) и мотив типа «цинковые пальцы»), была отобрана в качестве основы для создания трансгенной кассеты. Удаление С-концевых доменов, ответственных за конформационную стабильность белковой молекулы FUS, с одновременной делецией сигнала ядерной локализации и нарушением РНК-связывающего участка обеспечивало создание патогенной формы белка F15-FUS с измененной компартиментализацией, нестабильной вторичной структурой и высокими агрегационными свойствами (рис. 1, а). Примечательно, что укороченная форма FUS[1-359] сохраняет N-концевой прионоподобный домен [27], способствующий более эффективной агрегации белка.

Анализ физико-химических свойств мутантной формы F15-FUS и экспериментальное воспроизведение каскадной агрегации F15-FUS в клеточных культурах подтвердили данные Т.А. Шелковниковой и соавт. [2] и собственные полученные ранее (неопубликованные) данные, свидетельствующие, что данная форма белка способна образовывать с высокой эффективностью FUS-реактивные внутриклеточные включения неамилоидного типа, подобные тем, которые обнаруживаются при патогистологическом анализе у больных с FUS-ассоциированными формами БАС. Более того, в ряде работ было показано, что другой ДНК/РНК-связывающий белок, имеющий сходную с FUS доменную структуру — TDP-43, который также обнаруживается при некоторых формах БАС в составе патогистологических включений неамилоидного типа, присутствует в составе этих TDP-43-реактивных включений, в основном в модифицированном состоянии [28]: патогенная форма TDP-43 (25 кДа) укорочена и не содержит сигнала ядерной локализации, части РНК-связывающего участка и доменов, ответственных за конформационную стабильность [29]. Эти данные послужили основой для предположения, что именно такие изменения доменной структуры молекулы белка FUS обеспечивают ее патогенность, являясь причиной развития FUS-опатии и последующего прогрессирующего нейродегенеративного процесса.

При получении трансгенной кассеты для модификации генома мыши последовательность кДНК-гена человека, кодирующая укороченную патогенную форму белка F15-FUS, была встроена в вектор 323-pTSC21k с помощью рестрикционных сайтов XhoI (см. рис. 1, а). Использование в составе вектора Thy1 промотора обеспечивает высокий уровень синтеза экзогенного белка во всех отделах нервной системы модельных животных. Плазмидная конструкция была линейаризована с помощью рестрикта-

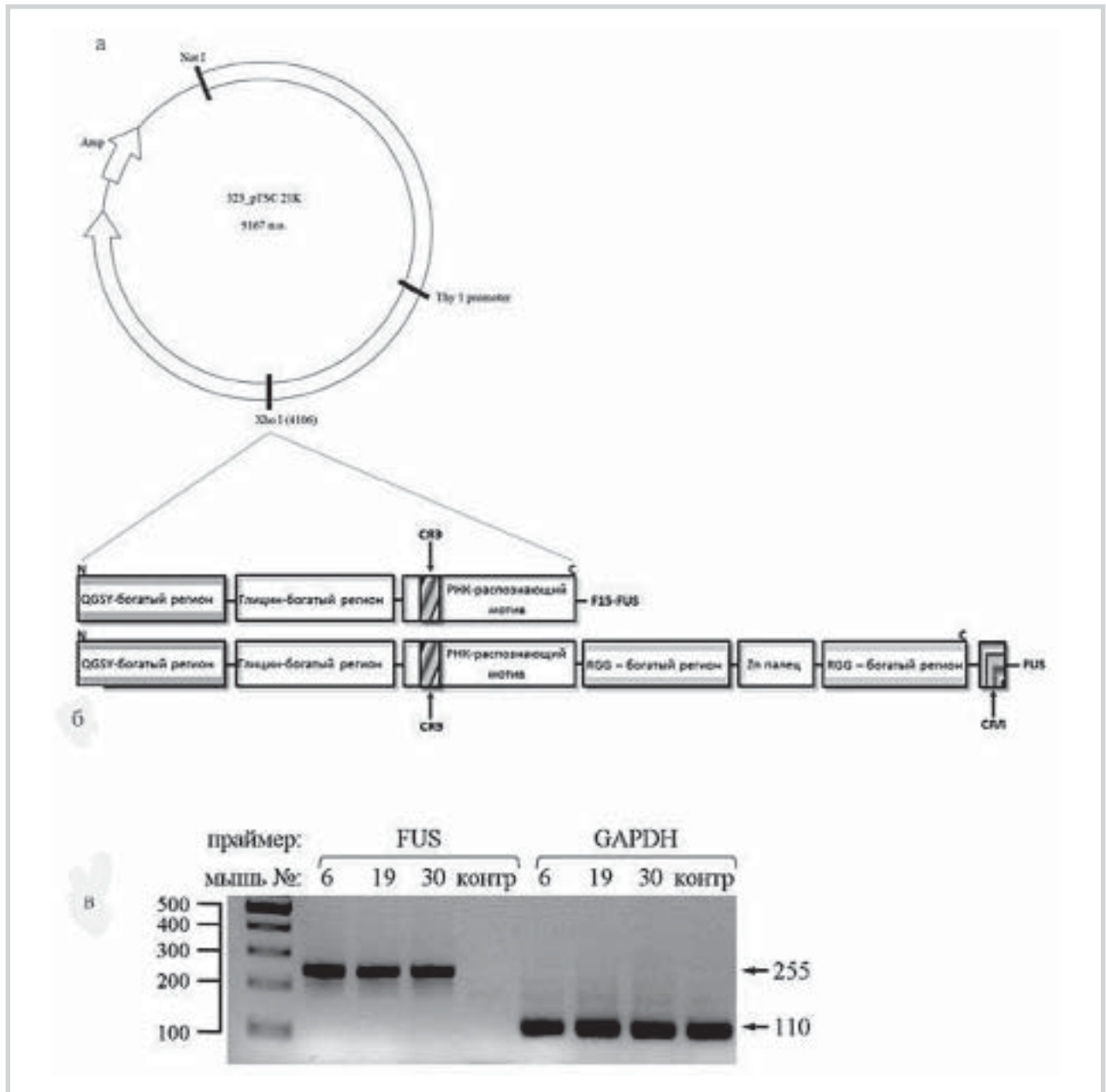


Рис. 1. Трансгенная кассета и ее детекция в геноме мыши.

а — схема трансгенной кассеты, кодирующей патогенную форму белка человека hFUS F15-FUS; б — доменная структура полноразмерного белка FUS; в — анализ ДНК из биопсий уха методом ПЦР; 6 — первичный трансген (клон 6); 19 — первичный трансген (клон 19); 30 — [F1] потомок первичного трансгена 6; контр — ДНК контрольного нетрансгенного животного из [F1] помета. Слева указан размер маркерных фрагментов ДНК (п.о.).

зы NotI и микроинъекцирована в пронуклеус ранних эмбрионов мыши (на стадии двух пронуклеусов), полученных после гормонально индуцированной суперовуляции самок мышей на генетическом фоне F1 [C57Bl/6×CBA], как описано ранее (подробнее см. [30]). После инъекций эмбрионы были подсажены хирургическим путем самкам-реципиентам линии F1 [C57Bl/6×CBA], от которых было получено 29 родившихся после манипуляций и выживших животных, что составляет менее 3% от общего числа подсаженных (968) постманипуляционных эмбрионов и существенно ниже ожидаемого результата (6,9%), рассчитанного исходя из средних значений, определен-

ных по результатам создания других линий трансгенных мышей в Лаборатории трансгенеза (см. таблицу). Генотипирование выживших животных выявило наличие трансгенной кассеты в геноме лишь в 2 случаях из 29, что составляет 0,2% от общего числа подсаженных эмбрионов — в 6,5 раз ниже расчетного. Наиболее вероятным объяснением такого исключительно низкого выхода при создании данной линии может быть высокая эмбриональная смертность трансгенных животных, даже несмотря на то, что максимальный уровень экспрессии трансгена, направляемой Thy1 промотором, достигается на 2-й неделе после рождения.

Эффективность получения трансгенных мышей

Показатель	FUS-трансген	Средние значения по получению 97 трансгенов
Число первичных фертильных фаундеров	2	97
Общее число рожденных животных после операций по пересадке модифицированных ранних эмбрионов	29	507
Доля животных, содержащих трансгенную кассету, от общего числа подсаженных эмбрионов, %	0,2	1,27
Общее число пересаженных ранних эмбрионов	968	7581
Доля выживших до стадии рождения пересаженных эмбрионов, %	3,00	6,69

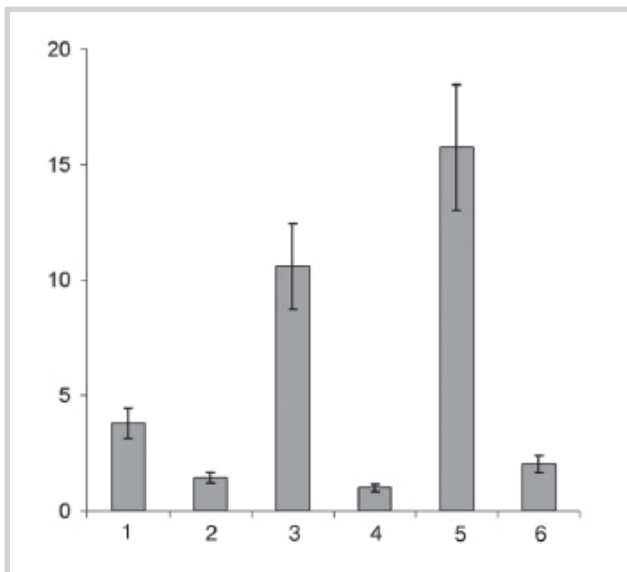


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии трансгена методом ПЦР в реальном времени.

Относительный уровень экспрессии трансгена (ось ординат) в отделах нервной системы и почке мышей линии mutFUS-6. 1 — мезэнцефальная область мозга; 2 — почка; 3 — ствол мозга; 4 — мозжечок; 5 — спинной мозг; 6 — кора головного мозга.

Оба выживших первичных трансгенных животных были фертильны и обладали способностью передавать трансгенную кассету по наследству, что было подтверждено генетическим анализом ДНК при биопсии животных, проведенным методом ПЦР (см. рис. 1, б). Характерный фрагмент размером 255 bp выявлялся в геномной ДНК как первичных трансгенных животных — основателей колоний 6 и 19, так и в ДНК половины их потомков (пример F1 потомка см. на рис. 1, в).

От 2 первичных трансгенов были получены независимые линии трансгенных мышей: mutFUS-6 и mutFUS-19. В каждой из этих линий методом RT-PCR в реальном времени был исследован уровень экспрессии трансгена в тканях отделов нервной системы. Уровень экспрессии трансгена в mutFUS-6 оказался намного ниже, чем в линии mutFUS-19, при этом в линии 19 максимальный уровень экспрессии наблюдался в спинном мозге (рис. 2), что делало данную трансгенную линию пригодной для моделирования нарушений функций двигательных нейронов.

Данные иммуноблоттинга по анализу содержания экзогенного FUS белка человека в тканях трансгенных мышей подтвердили наличие патогенных форм белка в спин-

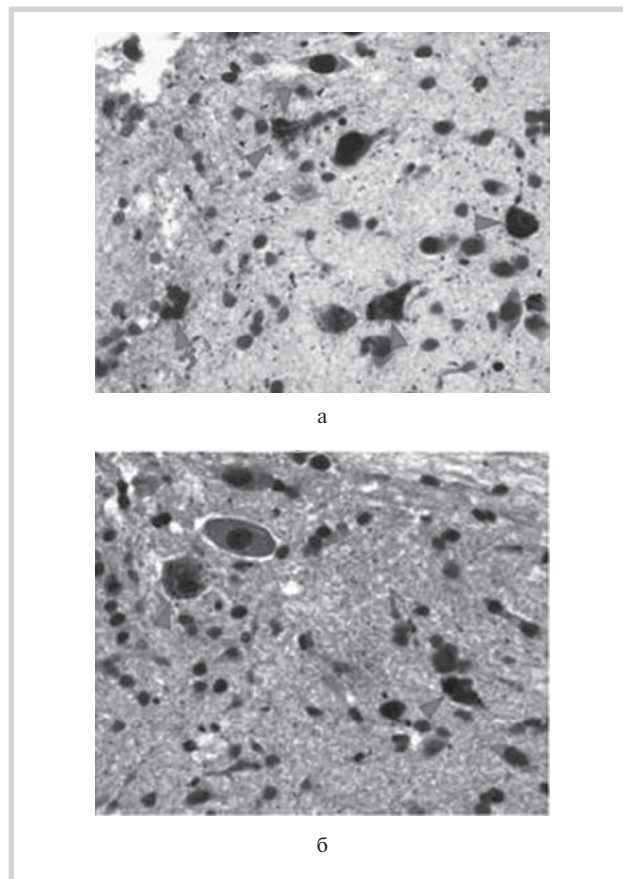


Рис. 3. Иммуногистохимическая окраска срезов грудного отдела спинного мозга трансгенных мышей линии mutFUS-19, находящихся на симптоматической стадии FUSопатии.

а — окраска антителами против белка FUS человека; б — окраска антителами против убиквитина мыши.

ном мозге животных, что в свою очередь соответствовало уровням транскрипции трансгена [31].

Таким образом, нами были получены 2 линии трансгенных мышей, у которых с различной эффективностью в тканях нервной системы накапливалась патогенная форма белка FUS человека.

Как и ожидалось, склонная к агрегации F15-FUS форма, к тому же с измененной компартиментализацией, инициировала образование нерастворимых фибриллярных структур и формирование патогистологических включений, аналогичных тем, что выявлялись у больших

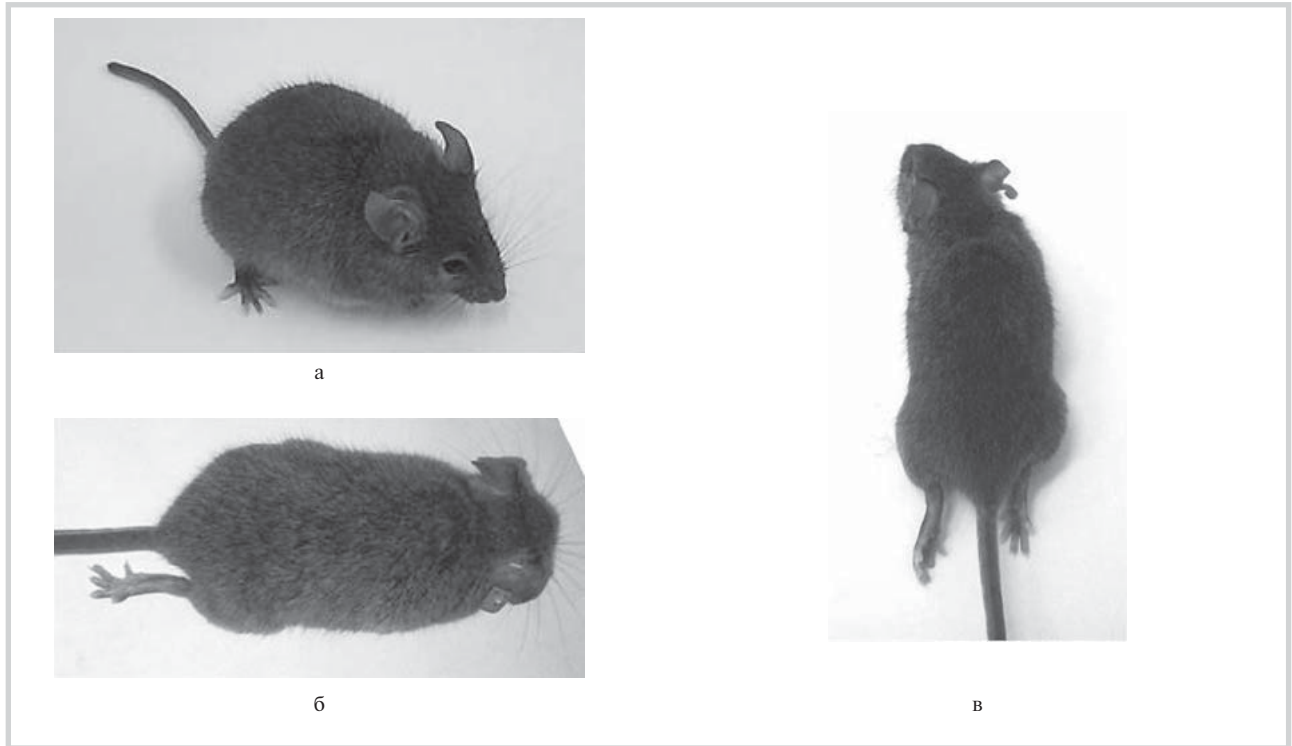


Рис. 4. Животные на различных стадиях прогрессии FUSопатии.

а — досимптомная; б — начальный признак заболевания, парез одной задней лапы; в — тетраплегия.

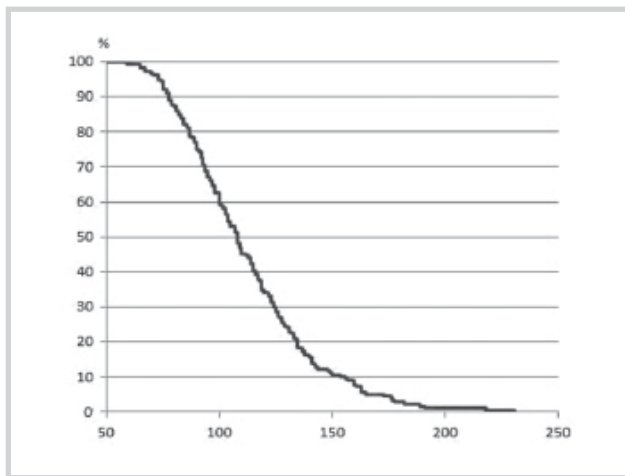


Рис. 5. График выживаемости трансгенных мышей (метод Каплан—Мейера).

По оси абсцисс — возраст (дни), по оси ординат — число мышей в эксперименте (в %).

БАС. У взрослых молодых трансгенных животных при иммуногистохимическом анализе препаратов спинного мозга были обнаружены FUS-реактивные цитоплазматические включения (рис. 3, а), которые также были убиквитинированы (рис. 3, б).

У мышей полученной нами линии mutFUS-19 прогрессия FUS-патии приводила к развитию нейродегенеративного процесса с избирательным поражением двигательных нейронов. Начальные стадии FUSопатии протекали бессимптомно, хотя за несколько дней (1—2 дня при

средней продолжительности жизни после первых симптомов 5 дней) до появления первых симптомов заболевания трансгенные мыши падали при прохождении теста «перевернутая сетка», отмечались общая вялость и снижение активности животных. У подавляющего большинства сравнительно молодых субъективно внешне здоровых половозрелых животных в возрасте в среднем 108 дней развивались двигательные нарушения, быстро и неуклонно прогрессирующие — последовательный парез нижних, затем верхних конечностей на фоне тремора и общей гипотрофии (рис. 4). Наиболее ранние сроки перехода модельного заболевания в симптоматическую стадию отмечены у единичных животных уже в возрасте 60 дней (рис. 5). При этом средняя продолжительность жизни мышей линии mutFUS-19 (179 животных) составила 113 дней при максимальном значении 231 день.

Характерной особенностью модельного заболевания, вызванного FUS-патией, является его стремительная прогрессия после перехода из пресимптоматической в симптоматическую стадию. Так, после появления первых клинических признаков животные погибали в среднем в течение 1 нед, что составляет менее 0,5% от средней продолжительности жизни мышей, хотя в единичных случаях мыши с выраженными симптомами заболевания продолжали жить до 45 дней. При этом следует учитывать, что в большинстве случаев больные животные были подвергнуты гуманной эвтаназии, поскольку не могли самостоятельно питаться и получать воду — таким образом, при использовании методов искусственного поддержания жизни ее продолжительность могла оказаться выше. Похожее течение заболевания характерно и для БАС у человека: отсутствие явно выраженной преклинической стадии (несмотря на протекающий в пораженных мотоней-

ронах нейродегенеративный процесс); быстрое нарастание двигательных нарушений (вплоть до тетраплегии) и мышечных атрофий до стадии, на которой поддержание жизни возможно лишь искусственными методами (гастростомия, дыхательная поддержка). Для БАС у человека, как и для описанных модельных животных, характерна определенная вариабельность возраста больного в периоде дебюта и скорости прогрессирования болезни.

Созданная нами линия мышей *mutFUS-19* является первой трансгенной моделью, в которой удалось воспроизвести FUS-патию, характеризующуюся формированием и накоплением зрелых полноценных включений. Предыдущие попытки моделирования FUS-патии оказались менее успешными, поскольку для гиперэкспрессии были использованы либо полноразмерный белок FUS человека [32], либо формы белка с единичными мутациями, обнаруженные у больных при наследственных формах БАС [33]. И хотя ряду исследователей удалось воспроизвести гибель нейронов в результате цитотоксичности гиперэкспрессируемого белка FUS, при этом у животных не происходило формирования характерных включений и не развивался БАС-подобный фенотип [25].

Прямым доказательством причинной роли FUS-патии в развитии нейродегенеративного процесса со специфическим поражением двигательных нейронов является создание трансгенной модели, в которой имеет место лишь единственная молекулярная патология: накопление в нейронах мышечной укороченной (1—359) формы белка — F15 человека. Подобное накопление белка FUS в составе патогистологических включений неамилоидного типа характерно для больных БАС. Таким образом, результатом данной работы явилось выявление непосредственного механизма нарушения нормального метаболизма белка FUS, которое приводит к последующему каскадному развитию целого комплекса патологических процессов, заканчивающихся специфической гибелью двигательных нейронов.

Созданная нами трансгенная модель болезни двигательного нейрона может быть применена для разработки и тестирования новых методов патогенетической терапии БАС.

Работа выполнена на базе Трансгенбанка Института биологии гена РАН при финансовой поддержке грантов «Фундаментальные науки медицине», КОМФИ №3-04-40379-Н13, РФФИ: 14-04-00796_а, 12-04-31371_мол_а, 12-04-01610-а, РФФ 2014—2016 (14-14-01138).

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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; 438: 3: 422—426.
3. Скворцова В.И., Бачурин С.О., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., Почигаева К.И., Нинкина Н.Н., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А. Новые аспекты патогенеза бокового амиотрофического склероза. Журн неврол и психиатр 2011; 111: 2: 4—9.
4. Скворцова В.И., Левицкий Г.Н. Современные представления об этиологии, патогенезе и лечении болезни двигательного нейрона. Consilium Medicum 2004; 8: 592—597.
5. Скворцова В.И., Лимборская С.И., Левицкий Г.Н. Современные представления об этиологии, патогенезе и лечении болезни двигательного нейрона. Журн неврол и психиатр 2005; 105: 1: 4—12.
6. Скворцова В.И., Лимборская С.И., Соколов К.В., Левицкий Г.Н. Молекулярные механизмы развития болезни двигательного нейрона. Журн неврол и психиатр 2005; 105: 4: 68—76.
7. Kwiatkowski T.J.Jr., Bosco D.A., Leclerc A.L., Tamrazian E., Vandenberg C.R., Russ C., Davis A., Gilchrist J., Kasarskis E.J., Munsat T., Valdmanis P., Rouleau G.A., Hosler B.A., Cortelli P., de Jong P.J., Yoshinaga Y., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Yan J., Ticozzi N., Siddique T., McKenna-Yasek D., Sapp P.C., Horvitz H.R., Landers J.E., Brown R.H.Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. Science 2009; 323: 5918: 1205—1208.
8. Vance C., Rogelj B., Hortobagyi T., De Vos K.J., Nishimura A.L., Sreedharan J., Hu X., Smith B., Ruddy D., Wright P., Ganesalingam J., Williams K.L., Tripathi V., Al-Saraj S., Al-Chalabi A., Leigh P.N., Blair I.P., Nicholson G., de Belleruche J., Gallo J.M., Miller C.A., Shaw C.E. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. Science 2009; 323: 5918: 1208—1211.
9. Левицкий Г.Н., Смирнов А.П., Анохин Д.Н., Лапина Г.В., Скворцова В.И. Сроки диагностики, наступления фактической инвалидности и ее регистрации при боковом амиотрофическом склерозе в Москве и Московской области. Материалы научно-практической конференции «Современные аспекты нейрореабилитации» (Москва, 18—19 мая 2007). М 2007; 165—166.
10. Скворцова В.И., Смирнов А.П., Алехин А.В., Ковражкина Е.А. Клинико-эпидемиологическое исследование болезни двигательного нейрона в Москве. Журн неврол и психиатр 2009; 109: 3: 53—55.
11. Скворцова В.И., Смирнов А.П., Алехин А.В., Ковражкина Е.А. Факторы риска бокового амиотрофического склероза: исследование «случай—контроль». Журн неврол и психиатр 2009; 109: 2: 69—72.
12. Deng H.X., Zhai H., Bigio E.H., Yan J., Fecto F., Ajroud K., Mishra M., Ajroud-Driss S., S Heller., R Sufit., Siddique N., Mugnaini E., Siddique T. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 2010; 67: 6: 739—748.
13. Neumann M., Rademakers R., Roeber S., Baker M., Kretzschmar H.A., Mackenzie I.R. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. Brain 2009; 132: Pt 11: 2922—2931.
14. Neumann M., Roeber S., Kretzschmar H.A., Rademakers R., Baker M., Mackenzie I.R. Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. Acta Neuropathol 2009; 118: 5: 605—616.
15. Munoz D.G., Neumann M., Kusaka H., Yokota O., Ishihara K., Terada S., Kuroda S., Mackenzie I.R. FUS pathology in basophilic inclusion body disease. Acta Neuropathol 2009; 118: 5: 617—627.
16. Cohen N.R., Hammans S.R., Macpherson J., Nicoll J.A. New neuropathological findings in Unverricht-Lundborg disease: neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions. Acta Neuropathol 2011; 121: 3: 421—427.
17. Сердюк А.В., Левицкий Г.Н., Мясоедов Н.Ф., Скворцова В.И. Изучение денервационно-реиннервационного процесса при болезни двигательного нейрона на фоне лечения препаратом семакс. Журн неврол и психиатр 2007; 107: 4: 29—39.
18. Сердюк А.В., Левицкий Г.Н., Скворцова В.И. Изучение денервационно-реиннервационного процесса при болезни двигательного нейрона и доброкачественных заболеваниях мотонейронов. Журн неврол и психиатр 2006; 106: 2: 37—43.
19. Скворцова В.И., Лимборская С.А., Левицкий Г.Н. Спорадический боковой амиотрофический склероз у пациентов с Asp90Ala медь-цинксодержащей супероксиддисмутазы в России. Журн неврол и психиатр 2000; 100: 1: 44—47.
20. Скворцова В.И., Смирнов А.П., Алехин А.В., Ковражкина Е.А. Моторная мультифокальная невропатия. Диагностика и дифференциальная диагностика 2009; 2: 69—72.
21. Lagier-Tourenne C., Polyimenidou M., Hutt K.R., Vu A.Q., Baughn M., Huelga S.C., Clutario K.M., Ling S.C., Liang T.Y., Mazur C., Wanciewicz E., Kim A.S., Watt A., Freier S., Hicks G.G., Donohue J.P., Shieh L., Bennett C.F., Ravits J., Cleveland D.W., Yeo G.W. Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. Nat Neurosci 2012; 15: 11: 1488—97.

22. 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.
23. Xia R., Liu Y., Yang L., Gal J., Zhu H., Jia J. Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 10.
24. Murakami T., Yang S.P., Xie L., Kawano T., Fu D., Mukai A., Bohm C., Chen F., Robertson J., Suzuki H., Tartaglia G.G., Vendruscolo M., Kaminski Schierle G.S., Chan F.T., Moloney A., Crowther D., Kaminski C.F., Zhen M., St George-Hyslop P. ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 1: 1—9.
25. 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.
26. Buchman V.L., Hunter H.J.A., Pino L.G.P., Thompson J., Privalova E.M., Ninkina N.N., Davies A.M. Persyn, a Member of the Synuclein Family, Has a Distinct Pattern of Expression in the Developing Nervous System. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 22: 9335—9341.
27. Cushman M., Johnson B.S., King O.D., Gitler A.D., Shorter J. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Sci* 2010; 123: 8: 1191—1201.
28. Collins M., Riascos D., Kovalik T., An J., Krupa K., Krupa K., Hood B.L., Conrads T.P., Renton A.E., Traynor B.J., Bowser R. The RNA-binding motif 45 (RBM45) protein accumulates in inclusion bodies in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 inclusions (FTLD-TDP) patients. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 5: 717—732.
29. 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; 314: 5796: 130—133.
30. Звездова Е.С., Силаева Ю.Ю., Вагида М.С., Марюхнич Е.В., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Кадулин С.Г., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Казанский Д.Б. Создание трансгенных животных, синтезирующих альфа- и бета-цепи аутореактивного T-клеточного рецептора. *Молекуляр биол* 2010; 44: 2: 311—322.
31. Shelkownikova 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—25274.
32. Mitchell J.C., McGoldrick P., Vance C., Hortobagyi T., Sreedharan J., Rogelj B., Tudor E.L., Smith B.N., Klasen C., Miller C.C., Cooper J.D., Greensmith L., Shaw C.E. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol* 2012; 125: 2: 273—288.
33. Verbeeck C., Deng Q., Dejesus-Hernandez M., Taylor G., Ceballos-Diaz C., Kocerha J., Golde T., Das P., Rademakers R., Dickson D.W., Kukar T. Expression of Fused in sarcoma mutations in mice recapitulates the neuropathology of FUS proteinopathies and provides insight into disease pathogenesis. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 53.