

УДК 577.125.54.616.832.543.51

ИЗМЕНЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА СФИНГОИДНЫХ ОСНОВАНИЙ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО И СПИННОГО МОЗГА ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ FUS(1-359), МОДЕЛИРУЮЩИХ БОКОВОЙ АМИОТРОФИЧЕСКИЙ СКЛЕРОЗ*

© 2019 У.А. Гутнер¹, М.А. Шупик¹, О.А. Малошицкая², С.А. Соколов², А.П. Резвых³, С.Ю. Фуников³, А.Т. Лебедев², А.А. Устюгов⁴, А.В. Алесенко^{1**}

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: alicelessenko@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН, 119991 Москва, Россия

⁴ Институт физиологически активных веществ РАН, 142432 Черноголовка, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 07.03.2019

После доработки 17.06.2019

Принята к публикации 17.06.2019

Целью исследования является определение изменений в уровнях сфингоидных оснований — сфингозина (СФЗ), сфинганина и сфингозин-1-фосфата (СФЗ-1-Ф) и экспрессии генов ферментов, участвующих в их метаболизме, в структурах головного мозга (гиппокампе, коре и мозжечке) и спинного мозга трансгенных мышей линии FUS (FUS(1-359)), моделирующих боковой амиотрофический склероз (БАС). В качестве модели БАС были использованы трансгенные мыши линии FUS(1-359), характеризующиеся наличием двигательных нарушений. Липиды из структур головного и спинного мозга через 2, 3 и 4 мес развития заболевания анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. Методом РНК-секвенирования были идентифицированы изменения в экспрессии следующих генов: *SPHK1*, *SPHK2*, *SGPP2*, *SGPL1*, *ASAH1* и *ASAH2*. Установлено резкое повышение уровня сфингоидных оснований — СФЗ и сфинганина, обладающих резко выраженными проапоптотическими свойствами, в клетках спинного мозга на терминальной стадии развития заболевания. Отношение антиапоптотического СФЗ-1-Ф к СФЗ и сфинганину резко снижается, что указывает на интенсивное развитие апоптоза в клетках спинного мозга. Значительные нарушения в содержании СФЗ и СФЗ-1-Ф и экспрессии генов их метаболизма обнаружены на терминальной стадии развития БАС в спинном мозге. Резко активируется экспрессия СФЗ-1-Ф-лиазы и снижается экспрессия СФЗ-1-фосфатазы. Более глубокое понимание биологических путей, регулирующих метаболизм различных сфинголипидов при развитии БАС, может привести к идентификации мишеней для лекарственных препаратов нового поколения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: боковой амиотрофический склероз, сфингозин, сфингозин-1-фосфат, *SPHK2*, *SGPP2*, *SGPL1*, *ASAH1*, *ASAH2*.

DOI: 10.1134/S0320972519100063

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся селективной дегенерацией двигательных нейронов спинного мозга и моторной коры и ствола головного мозга. Клинические признаки болезни выражаются в разви-

тии мышечного истощения, нарушении речи и глотания, фасцикуляции, изменении рефлексов и пластичности. Основная причина смерти больных, которая наступает в среднем через 3–5 лет с момента появления первых признаков заболевания, — паралич дыхательных путей. Око-

Принятые сокращения: БАС — боковой амиотрофический склероз, СФЗ — сфингозин, СФЗ-1-Ф — сфингозин-1-фосфат, ПКС — протеинкиназа С, *SPHK1* — ген сфингозин-киназы 1, *SPHK2* — ген сфингозин-киназы 2, *SGPP2* — ген сфингозин-1-фосфатфосфатазы 2, *SGPL1* — ген сфингозин-1-фосфат-лиазы 1, *ASAH1* — ген кислой церамидазы (A-CDase), *ASAH2* — ген нейтральной церамидазы (N-CDase).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-067, 09.09.2019.

** Адресат для корреспонденции.

ло 90% всех зарегистрированных случаев БАС имеют неизвестную этиологию и классифицируются как спорадические. Остальные 10% — это наследственные формы БАС, характеризующиеся мутациями в ряде генов, в основном ауто-сомно-доминантного характера [1].

Мутации, которые связывают с БАС, в основном приводят к конформационной нестабильности и агрегации белков (SOD-1 [2], VCP [3], OPTIN [4], UBQLN2 [5]), нарушениям процессинга и транспорта РНК (C9ORF72 [6], TDP-43 [7], FUS [8, 9]) и изменению динамики цитоскелета (PFN1 [10], DCTN1 [11], TUBA4A [12]) [13]. Исключительная генетическая изменчивость, ассоциированная с БАС, объясняет сложность заболевания, при котором гетерогенные механизмы приводят к общему патогенезу. Ключевыми чертами течения данного заболевания являются эксайтотоксичность, окислительный стресс, дисфункция митохондрий [2], нейровоспалительные и иммунные реакции [3, 4]. В последнее время интенсивно исследуются механизмы апоптоза (программируемой гибели клеток), который может быть ответственен за дегенерацию двигательных нейронов при этом заболевании [5].

В связи с этим большое внимание привлечено к изучению нарушений липидного метаболизма в процессе развития БАС. Липиды играют исключительно важную роль в центральной нервной системе: выполняют структурную функцию, являясь основными компонентами клеточных мембран, служат источником энергии, участвуют в межклеточной коммуникации и передаче клеточных сигналов апоптоза и дифференцировки. Нарушение липидного баланса оказывает негативное влияние на структурные и физиологические свойства мозга, функции нейронов и нейроглии, включая мембранный транспорт и контроль над активностью ферментов [14]. Разрушение клеточной мембраны является характерной чертой нейродегенерации, возникающей при хронических заболеваниях ЦНС [15].

Различные нарушения липидного метаболизма характерны как для спорадической, так и наследственной формы БАС, наиболее часто наблюдаемые из них — дис- или гиперлипидемия [16, 17]. Одним из характерных признаков БАС, наблюдаемых у ~66% пациентов с БАС, является снижение веса вследствие гиперметаболизма, который непосредственно связан с липидным метаболизмом [16].

Регуляторная роль липидов, как вторичных мессенджеров, выявляется при исследовании воспалительных процессов при развитии БАС, которые сопровождаются активацией микро-

глии, потерей нейромышечных соединений и последующей дегенерацией мотонейронов. При этом наблюдается повышенное содержание нейротоксичных молекул, таких как цитокины, в регуляции процессов синтеза которых активное участие принимают мессенджеры липидной природы [17].

Среди липидов особое место занимают сфинголипиды, которые являются наиболее важными источниками вторичных мессенджеров, передающих сигналы клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [18]. Дефекты метаболизма сфинголипидов обнаружены и при таких наследственно-обусловленных метаболических заболеваниях, как болезни Фабри, Ниманна–Пика и Гоше, относящиеся к лизосомным болезням накопления, и нейродегенеративные патологии — болезни Паркинсона и Альцгеймера [19].

В основе структур практически всех сфинголипидов присутствует сфингоидное основание — сфингозин (СФЗ). Свободный сфингозин возникает в результате гидролиза церамида церамидазой и вновь превращается в церамид с помощью церамидсинтазы. Кроме того, в результате действия двух киназ он способен фосфорилироваться до сфингозин-1-фосфата (СФЗ-1-Ф) (рис. 1).

Сфингозин способен оказывать влияние на рост, дифференцировку и гибель клеток [20, 21], агрегацию тромбоцитов [22], ингибирование свертываемости крови [23], стимуляцию митогенеза [24], он обладает противоопухолевой [25] и антимикробной активностью [26]. Особенно большое значение СФЗ приобретает благодаря своей способности индуцировать апоптоз [20, 27–32]. Механизмы апоптоза, опосредованные сфингозином, являются множественными. Было показано, что апоптоз в присутствии сфингозина развивается по каспазозависимому пути. Сфингозин способен расщеплять Bid, высвобождать митохондриальный цитохром С, а также активировать эффекторные каспазы 3 или 7 и расщеплять PARP. Участие сфингозина в митохондриальном апоптозе определяется его влиянием на белки Bcl-2 и Bax, снижая уровень экспрессии Bcl-2 и вызывая расщепление Bax [27].

Наряду с церамидом, сфингозин ингибирует протеинкиназу С (ПКС), наиболее значимый липид-зависимый фермент, определяющий выживаемость клетки. Этот эффект обусловлен наличием у сфингозина первичной аминогруппы и длинного жирнокислотного остатка. Степень ингибирования зависит от присутствия в инкубационной среде фосфатидилсерина, диацилглицерина, ионов Ca^{2+} , лизофосфатидилхолина,

форболовых эфиров и жирных кислот, которые являются активаторами ПКС [33]. Диацилглицерин в мембране облегчает транслокацию протеинкиназы С из цитозоля в плазматическую мембрану и повышает ее сродство к Ca -кальмодулину, вызывая активацию фермента при более низкой концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Форболовые эфиры имитируют действие диацилглицерина. Присутствие фосфолипидов и жирных кислот необходимо для активации фермента.

Кроме влияния на активность ПКС, СФЗ способен активировать ряд других протеинки-

наз: казеинкиназу II [34], митоген-активируемые протеинкиназы [35], киназу, активность которой специфически регулируется сфингозином и диметилсфингозином (сфингозин-зависимая киназа) [36], c-Jun *N*-концевую киназу [37], протеинкиназу FA/GSK-3 α , участвующую в проведении сигнала теплового шока [38] и другие.

Также СФЗ может оказывать влияние на множество других ферментов в клетке. Он активирует GTP-циклогидролазу [39] и аденилатциклазу [40], фосфолипазу D [41] и фосфолипазу C δ [42]. К ингибирующим эффектам сфингозина относятся ингибирование НАДФН-окси-

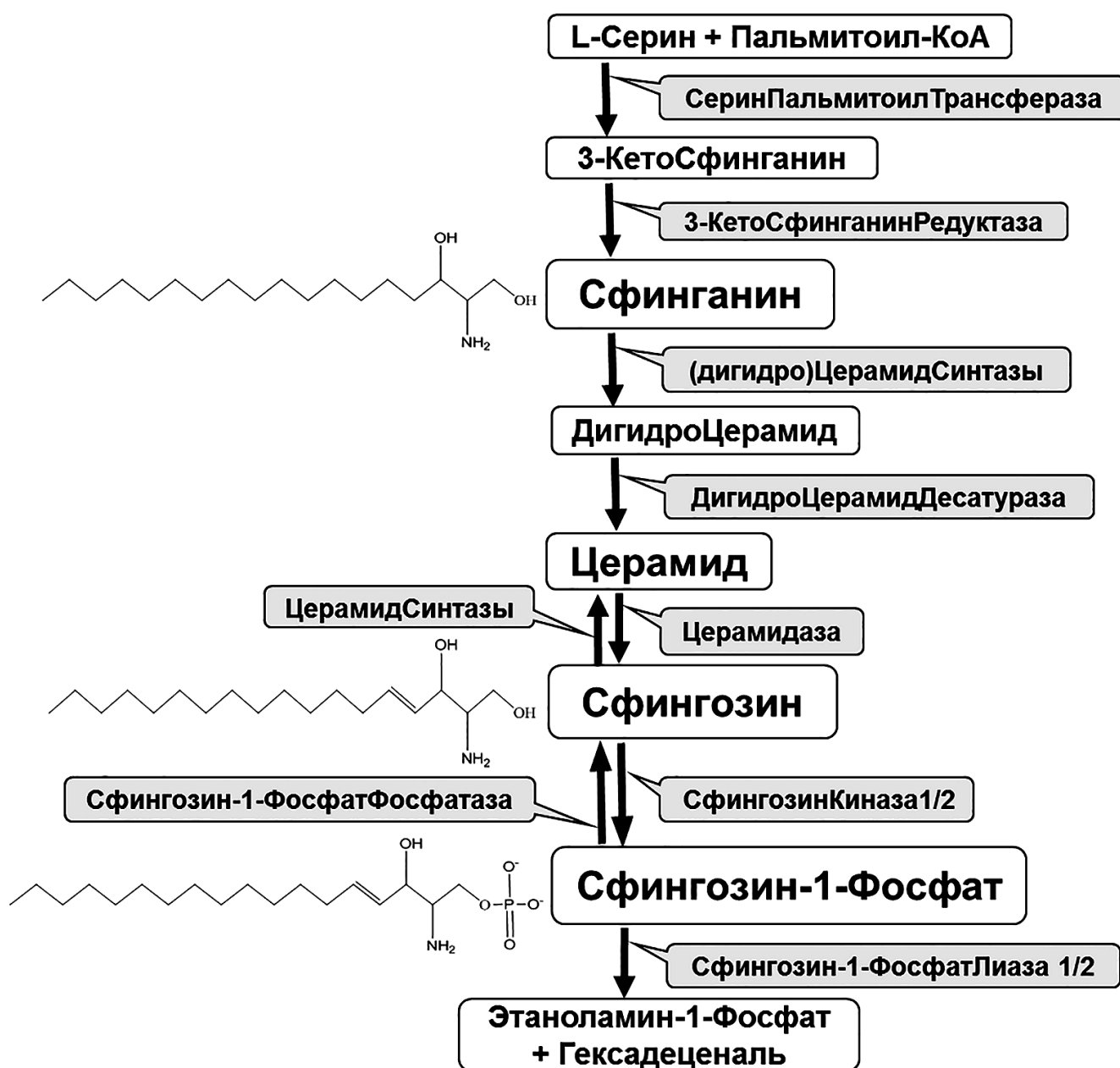


Рис. 1. Схема метаболизма сфингоидных оснований

дазы [43], тканевого ростового фактора [44], кальмодулинзависимой киназы [45], и тирозинкиназной активности инсулинового рецептора [46], фосфогидролазы фосфатидной кислоты [47], регуляция активности ДАГ-киназы [48], ингибирование ЦТФ: фосфохолинцитидилтрансферазы [49]. СФЗ способен влиять на фосфорилирование различных рецепторных белков [44, 50, 51], а также вызывать мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо [52, 53].

Проапоптотическое действие СФЗ связывают с его способностью взаимодействовать с ДНК, оказывать влияние на активность ферментов репликации и транскрипции [54] и на ДНК-связывающие свойства ряда регуляторных белков, включая транскрипционные факторы и топоизомеразы [55, 56]. Некоторые свойства сфингозина характерны также и для другого сфингоидного основания — дигидросфингозина или сфинганина — предшественника сфингозина в процессе его синтеза (рис. 1).

Напротив, сфингозин-1-фосфат обладает антиапоптотическими свойствами и пролиферативными эффектами. Особую роль в этих процессах играет фермент сфингозин киназа, которая снижает уровень сфингозина в клетке, тем самым спасая ее от гибели [20, 27].

Обладая яркими проапоптотическими свойствами, сфингозин и сфинганин могут принимать непосредственное участие в гибели клеток ЦНС в процессе развития БАС. Однако до сих пор практически не исследовали характер изменения уровня сфингоидных оснований при развитии БАС не только у людей, но и в модельных экспериментах у животных. Характер изменения СФЗ-1-Ф также мало изучен в ходе развития БАС. Поэтому в нашей работе обращено особое внимание на изменение содержания сфингозина и других сфингоидных оснований в структурах головного и спинного мозга и на их возможное участие в гибели нейрональных клеток при БАС.

Целью исследования является определение изменений в уровнях сфингоидных оснований — сфингозина, сфинганина и сфингозин-1-фосфата и экспрессии генов ферментов, участвующих в их метаболизме, в структурах головного мозга (гиппокампе, коре и мозжечке) и в поясничном отделе спинного мозга трансгенных мышей линии FUS(1-359), моделирующих боковой амиотрофический склероз.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модели БАС использовали линию трансгенных мышей FUS(1-359), (биоресурсная

коллекция ИФАВ РАН, Россия), проявляющих характеристики БАС, в нервной системе которых экспрессируется трансгенная последовательность, кодирующая аберрантную форму белка FUS человека с удаленным сигналом ядерной локализации под нейронспецифичным промотором Thy-1. Линию стабильно поддерживали в гемизиготном состоянии, согласно ранее описанному протоколу с переводом животных на CD-1 генетический фон [57]. У трансгенных мышей накапливаются белковые включения в цитоплазме нервных клеток. Данный вид FUS-протеинопатии приводит к повреждению аксонов мотонейронов, а также нейровоспалительной реакции и снижению численности тел мотонейронов. Такая клиническая картина характеризуется относительно ранней манифестацией заболевания (2,5–4,5 мес.) и быстрым летальным исходом (в течение нескольких дней с момента манифестации).

У модельных мышей выделяли структуры головного мозга (гиппокамп, мозжечок и кору) и спинной мозг (поясничный отдел) в 2, 3 и 4 мес. жизни, что коррелировало с досимптомной, ранней симптоматической и симптоматической фазой. В качестве контролей использовали однопометных особей, не содержащих трансгенную кассету того же возраста, как и модельные.

Липиды экстрагировали по методу Bligh и Dyer [58].

Сфингоидные основания (сфингозин и сфинганин) и сфингозин-1-фосфат анализировали методом хромато-масс-спектрометрии [59]. Выделенные липиды упаривали под током азота ПЭ-8920 («Экротхим», Россия) и растворяли в смеси (хлороформ : метанол) = (2 : 1) (v/v) в концентрации 6,8 мг/мл. Анализ липидов проводили методом ВЭЖХ/МС на приборе TSQ Endura («Thermo Scientific», США), снабженном ВЭЖХ колонкой EclipsePlusC8 («Agilent», США), в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). ММР переходы для сфингоидных оснований указаны на схеме: сфингозин — $\text{MH}^+ > (\text{M}-2\text{H}_2\text{O})^+$, $m/z\ 300 \rightarrow m/z\ 264$; сфинганин: $\text{MH}^+ \rightarrow (\text{M}-2\text{H}_2\text{O})^+$, $m/z\ 302 > m/z\ 266$; сфингозин-1-фосфат: $\text{MH}^+ \rightarrow (\text{M}-\text{H}_3\text{PO}_4)^+$, $m/z\ 381 \rightarrow m/z\ 264$.

Для построения калибровочных зависимостей были использованы сфингозин, дейтеросфингозин, сфинганин и сфингозинфосфат C17 («Avanti», США), (MRM переход: $366 > 250$). Для каждого липида вычисляли отношение площади под хроматографическим пиком этой молекулы к площади хроматографического пика от молекулы стандарта.

Анализ экспрессии генов ферментов метаболизма сфинголипидов проводили методом РНК-

секвенирования. Библиотеки мРНК для секвенирования получены с помощью набора для выделения поли(A)⁺ фракции мРНК от NEB («New England Biolabs», США) и набора для создания библиотек NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina («NEB», США) по методике, предложенной производителем [60]. Секвенирование поли(A)-обогащенной фракции РНК проводилось на платформе Illumina NextSeq 500 («Illumina», США) в центре коллективного пользования ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php). Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения PPLine [61], она включала триммирование коротких прочтений по качеству и длине при помощи программы Trimmomatic [62], выравнивание прочтений на референсный геном версии GRCm38 программой STAR [63] и подсчет прочтений, выровненных на гены программой htseq-count [64].

Статистическая обработка данных и вычисление дифференциальной экспрессии генов производили при помощи пакета edgeR [65], используемого в среде статистической обработки данных языка R [66]. В ходе парного сравнения экспериментальных групп для определения достоверности дифференциальной экспрессии использовали стандартный F-тест Фишера, с применением метода Бенъямини–Хохберга для внесения поправки на множественное тестирование [67]. Для визуализации полученных данных применяли пакет ggplot2 [68].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание сфингозина в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга и в спинном мозге при развитии БАС у мышей. Анализ сфингозина, способного вызывать апоптоз в клетках ЦНС, проводили в 2, 3 и 4-месячном возрасте. Количество сфингозина (пг) определяли в расчете на мг ткани и на мг фосфора в липидном образце. Изменений в количестве сфингозина, по отношению к контрольным значениям, в расчетах на вес ткани в мозжечке, коре и гиппокампе практически не наблюдается, в то время как в структурах спинного мозга на терминальной стадии (4 мес.) происходит 4× повышение уровня сфингозина (рис. 2). В этот период происходит резкая гибель клеток именно в спинном мозге. Вполне возможно, что индуктором этой гибели является сфингозин. При анализе изменений сфингозина в расчете на мг фосфора (данные не представлены) можно отметить небольшое повышение в гиппокампе через 3 мес. и в коре через 4 мес., однако в мозжечке никаких изменений

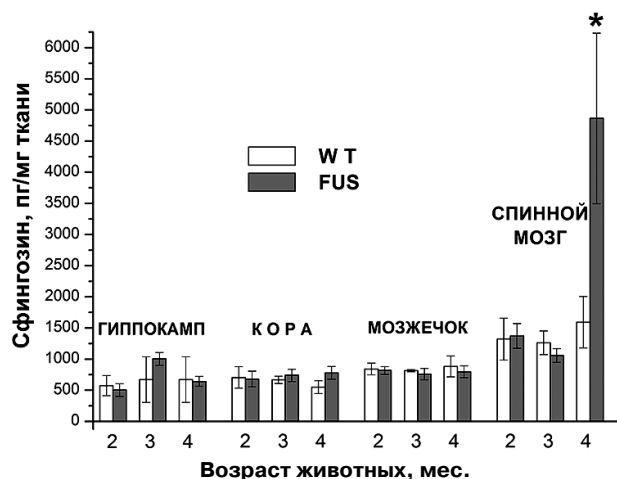


Рис. 2. Изменение уровня сфингозина в структурах головного мозга и в спинном мозге в процессе развития БАС у мышей

не наблюдается. Напротив, в спинном мозге при расчете количества сфингозина на мг фосфора установлены такие же резкие изменения, как и при расчете на мг ткани.

Содержание дигидросфингозина (сфинганина) в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга и в спинном мозге при развитии БАС у мышей. При анализе содержания дигидросфингозина (сфинганина) в тех же условиях мы обнаружили практически ту же картину, которую мы наблюдали для сфингозина. Увеличение содержания этого метаболита происходит в возрасте 4 мес. в спинном мозге, но не так резко (только в 2 раза), как это наблюдалось для сфингозина (рис. 3). В структурах головного мозга его уровень на протяжении

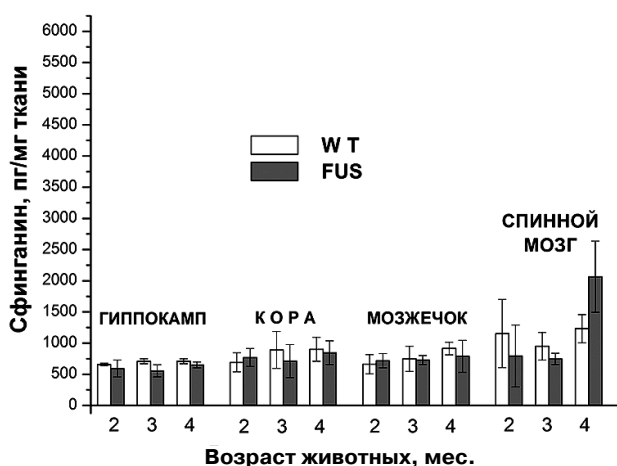


Рис. 3. Изменение уровня сфинганина в структурах головного мозга и в спинном мозге в процессе развития БАС у мышей

нии всего срока наблюдений за развитием БАС у мышей практически не отличается от контролей. Эти результаты отмечены как при расчете его количества в ткани, так и на мг фосфора.

Содержание сфингозин-1-фосфата в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга и в спинном мозге при развитии БАС у мышей. Сфингозин-1-фосфат — фосфорилированный продукт сфингозина в противоположность церамиду и сфингозину, обладает антиапоптотическими свойствами и участвует в регуляции клеточной пролиферации [20]. Изменение его уровня и его отношения к сфингозину и сфинганину могут критическим способом влиять на выживаемость клеток ЦНС. В структурах головного мозга уровень СФЗ-1-Ф имеет исходно низкий уровень и практически не меняется в ходе заболевания (рис. 4). В спинном мозге уровень данного сфинголипида существенно выше, чем в структурах головного мозга, и в процессе развития БАС его уровень достоверно не меняется в течение 4-х мес. Через 4 мес. отмечается лишь тенденция к повышению. У контрольных животных с возрастом, напротив, отмечается тенденция к снижению уровня СФЗ-1-Ф. Этот эффект, вероятно, связан с возможным снижением защитных противоапоптотических резервов организма. Повышение содержания СФЗ-1-Ф у модельных животных можно объяснить резким ростом сфингозина, из которого он образуется. Кроме того, его отношение к СФЗ у этих животных резко падает, т.е. нарушается баланс пролиферации и апоптоза в клетках спинного мозга (рис. 2 и 4).

Анализ экспрессии генов метаболизма сфингозина, дигидросфингозина (сфинганина) и сфингозин-1-фосфата в спинном мозге мышей при развитии БАС. В связи с тем, что мы обнаружили высокий исходный уровень СФЗ, сфинганина и

СФЗ-1-Ф и изменения в содержании сфингозина и сфинганина только в спинном мозге, мы проанализировали экспрессию генов ферментов, участвующих непосредственно в их метаболизме. Нами были тестированы гены ферментов 3-KSR, церамидазы, сфингозин киназы, сфингозин-1-фосфат фосфатазы и СФЗ-1-Ф-лиазы (рис. 1). 3-KSR превращает 3-кетосфинганин непосредственно в сфинганин. С помощью дигидроцерамид синтазы сфинганин превращается в дигидроцерамид, который метаболизируется в церамид. Церамид с помощью церамидаз превращается в сфингозин. Сфингозин в клетке появляется в результате именно этой реакции. К настоящему времени известно 5 церамидаз [19]. Кислая церамидаза (ASAH1) локализована в лизосомальных компартментах, нейтральная церамидаза (ASAH2) преимущественно находится в плазматической мембране, три щелочных церамидазы обнаружены в аппарате Гольджи и плазматической мембране. А сфингозин киназа фосфорилирует сфингозин, что приводит к появлению антиапоптотического агента — сфингозин-1-фосфата (СФЗ-1-Ф), который, в свою очередь, при определенных условиях может превратиться снова в сфингозин с помощью СФЗ-1-Ф фосфатазы или полностью быть выведен из метаболического цикла СФЗ-1-Ф лиазой с образованием этаноламин-фосфата и гексадеценаля (рис. 1). Таким образом, для изменения уровня сфингозина в клетке имеется несколько путей.

Вначале мы оценили уровень экспрессии гена 3-KSR, который участвует в синтезе сфинганина, в ткани спинного мозга трансгенных мышей (FUS) и нетрансгенных животных дикого типа (WT). Нами обнаружено, что у 4-х месячных мышей уровень мРНК гена 3-KSR имеет тенденцию к повышению по сравнению с контрольными значениями. (рис. 5). Далее мы исследовали уровень экспрессии 4-х генов, кодирующих церамидазу и обнаружили, что уровень мРНК кислой церамидазы (ASAH1), локализованной в лизосомах, повышается, тогда как уровень экспрессии нейтральной церамидазы (ASAH2), которая находится на поверхности плазматической мембраны, достоверно снижается в ходе прогрессии FUS-опосредованной протеинопатии ($p < 0,05$, тест Фишера) (рис. 6). Следует также отметить, что уровень мРНК щелочных церамидаз (ACER2 и ACER3) остается без изменений, а экспрессия ACER1 вообще отсутствует в клетках спинного мозга (данные не приведены).

Анализ изменения экспрессии генов СФЗ-1-Ф-лиазы (SGPL) (рис. 7, а) и СФЗ-1-Ф-фосфатазы-2 (SGPP2) (рис. 7, б), СФЗ-1-Ф-киназы 1

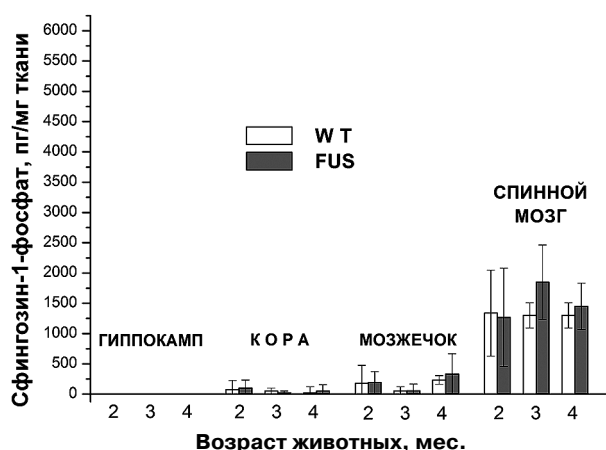


Рис. 4. Изменение уровня СФЗ-1-Ф в структурах головного мозга и в спинном мозге в процессе развития БАС у мышей

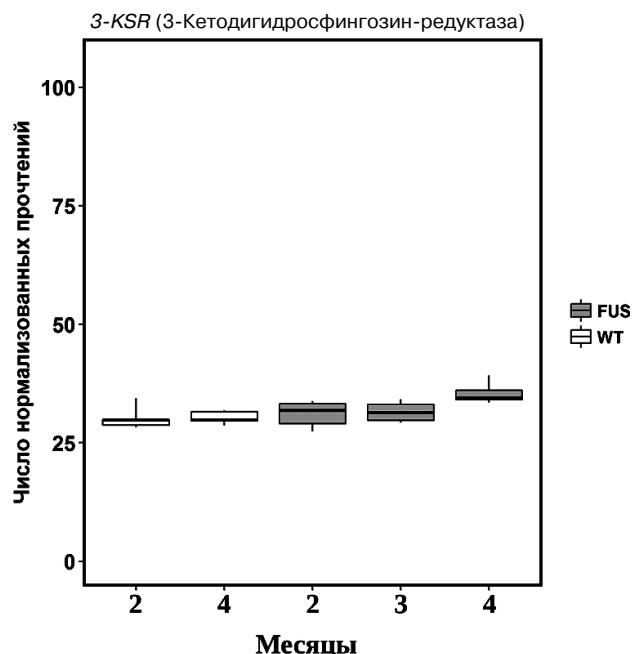


Рис. 5. Уровень мРНК 3-кетодигидросфингозин-редуктазы в спинном мозге трансгенных мышей FUS(1-359) и нетрансгенных животных дикого типа (WT) в динамике развития FUS-опосредованной протеинопатии. Данные получены в результате RNA-seq анализа и представлены в виде количества картированных прочтений на миллион секвенированных прочтений (CPM)

(*SPHK1*) (рис. 7, в), СФ3-1-Ф-киназы 2 (*SPHK2*) (рис. 7, г) показал, что резко активируется распад СФ3-1-Ф СФ3-1-Ф-лиазой до конечных продуктов этаноламин-фосфата и гексадеценаля, падает фосфатазная активность и наблюдается тенденция к снижению киназной активности (рис. 7). Эти данные указывают на то, что, несмотря на резкий рост СФ3 и сфинганина, метаболизм СФ3-1-Ф сдвинут в сторону его деградации (рис. 7). Кроме того, отношение содержания СФ3-1-Ф к сфингоидным основаниям резко падает, создавая условия для активного апоптоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До сих пор механизмы дегенерации двигательных нейронов при БАС не понятны, у этого заболевания нет точно известных причин возникновения и нет эффективных методов лечения. Однако в самых последних исследованиях было установлено, что дегенерация моторных нейронов при БАС является формой апоптотической гибели клеток [5]. Апоптоз регулируется различными путями, которые взаимодействуют и в конечном итоге приводят к контролируемой гибели клеток. Помимо генетической регуляции, в каче-

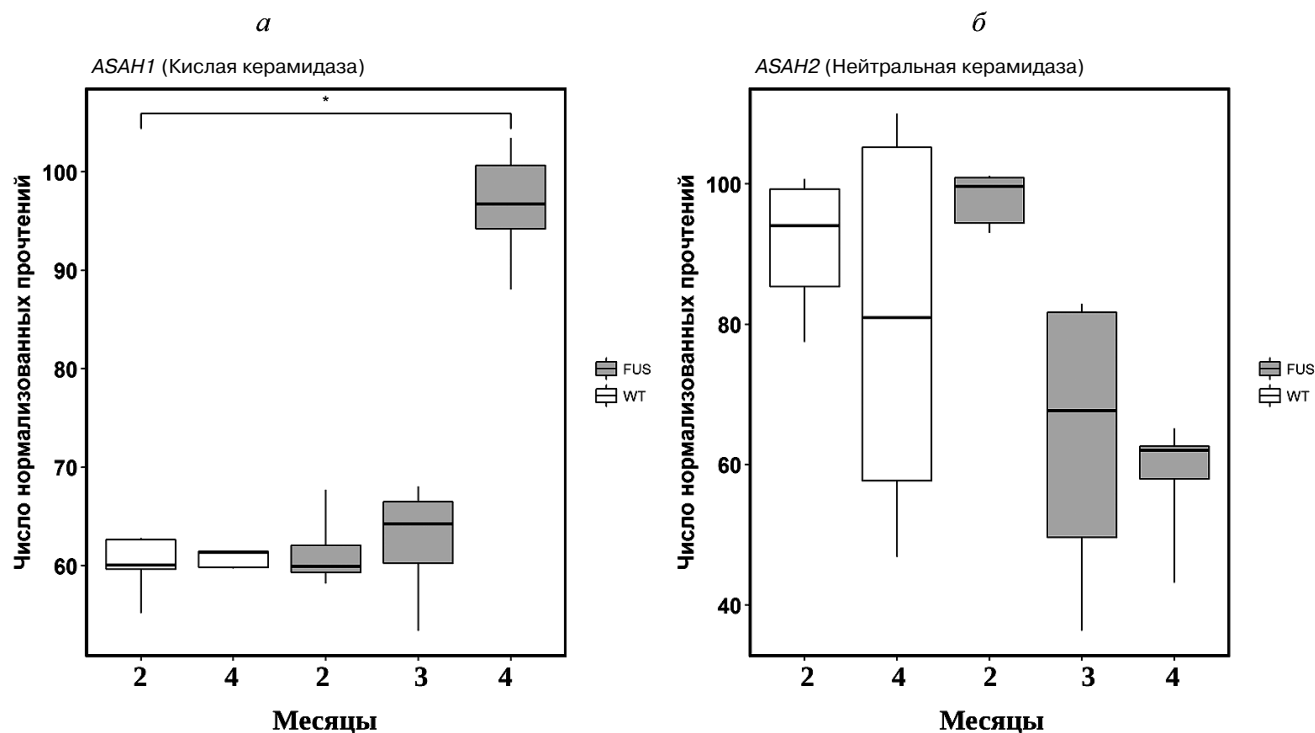


Рис. 6. Уровень мРНК кислой (*ASAH1*) (а) и нейтральной (*ASAH2*) (б) керамидаз в спинном мозге трансгенных мышей FUS(1-359) и нетрансгенных животных дикого типа (WT). * $p < 0,05$ (тест Фишера)

стве факторов, участвующих в контроле апоптоза, можно отметить свободные радикалы, рецепторы смерти, каспазы, проапоптозные белки семейства Bcl-2, ингибиторы белков апоптоза (IAP), белок-супрессор опухолей p53, фактор некроза опухоли- α

и многие другие молекулы, связанные с апоптозом. Различают апоптоз, инициируемый при повреждении ДНК, митохондрий и мембран лизосом. Ряд из этих типов апоптоза зафиксирован на моделях БАС у животных [5, 69–71].

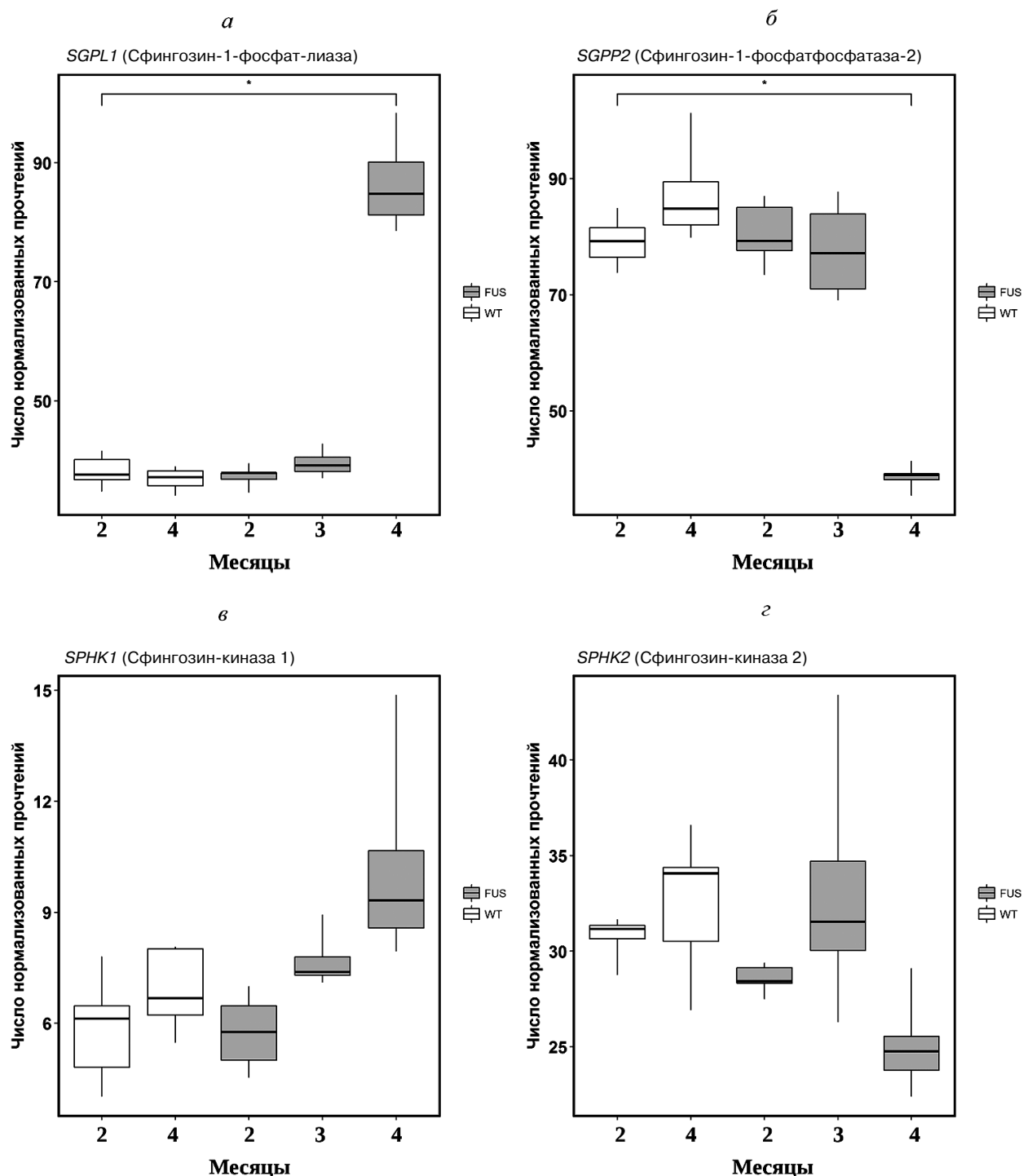


Рис. 7. Уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма Сфингозина и Сфингозин-1-Фосфата у трансгенных мышей FUS(1-359) и нетрансгенных животных дикого типа (WT). *а* – Сфингозин-1-фосфат-лиазы; *б* – сфингозин-1-фосфатфосфатазы; *в* и *г* – уровень экспрессии сфингозин-киназы 1 и 2 соответственно. * $p < 0,05$ (тест Фишера)

При дегенерации двигательных нейронов, вызванных мутантной супероксиддисмутазой-1 (mSOD1), развиваются события, характерные для митохондриально-зависимого апоптоза у трансгенных мышей mSOD1 (проапоптотический белок Вах перемещается из цитозоля в митохондрии, а цитохром С переходит из митохондрий в цитозоль, каспаза-9 активируется в спинном мозге трансгенных мышей mSOD1 во время прогрессирования заболевания) [71].

Несмотря на многочисленные работы, участие сфинголипидов в развитии и регуляции апоптоза еще недостаточно изучено. Это связано, прежде всего, с разнообразием молекул сфинголипидов, сложной системой их метаболизма и многоуровневым контролем выполнения функций, а также с участием сфинголипидов практически во всех физиологических и патофизиологических процессах в клетке. Однако роль керамидов и сфингоидных оснований в индукции апоптоза практически определена. Сфингозин способен индуцировать все вышеперечисленные типы апоптоза. В частности, он вызывает деградацию ДНК [54], проводит токсический сигнал от фактора некроза опухоли- α [28–30], индуцирует окислительный стресс, активирует каспазы [31, 32] и многие другие сигнальные молекулы апоптоза. Однако участие сфингоидных оснований в гибели двигательных нейронов при БАС практически не известно.

Представленные результаты наших исследований демонстрируют резко выраженную дисрегуляцию в метаболизме сфингоидных оснований, включая сфингозин, сфинганин и сфингозин-1-фосфат преимущественно в спинном мозге мышей, в то время как содержание этих сфинголипидов оказывается на низком уровне и практически не меняется в структурах головного мозга в процессе развития БАС. Это может определяться поражением именно двигательных нейронов при этом заболевании. При этом резко снижается отношение антиапоптотического агента — СФЗ-1-Ф к проапоптотическим СФЗ и сфинганину, что указывает на резкую интенсификацию гибели клеток в структурах спинного мозга. Такого разрушительного процесса в головном мозге мы не наблюдаем.

Также значительные нарушения в экспрессии генов метаболизма сфинголипидов обнаружены на разных стадиях развития БАС преимущественно в спинном мозге. Из 4-х изученных генов, кодирующих керамидазу, повышается уровень мРНК кислой керамидазы *ASAH1*, локализованной в лизосомах, тогда как уровень экспрессии нейтральной керамидазы *ASAH2*, которая находится на поверхности плазматической мембраны, достоверно снижается в ходе

прогрессии FUS-опосредованной протеинопатии (рис. 6). Кислая керамидаза (*ASAH1*) лизосом гидролизует C10-C14-керамиды с насыщенными связями или C18:1-, C18:2-керамиды с ненасыщенными связями. Субстратами *ASAH2* являются C16-C22-керамиды или C26-C36-керамиды. Таким образом, сфингозин генерируется лизосомальной керамидазой из керамидов с более короткими жирными кислотами. Изменение активности лизосомальной керамидазы может указывать на развитие «лизосомального» апоптоза. Следует также отметить, что уровень мРНК щелочных керамидаз (*ACER2* и *ACER3*) остается без изменений, а экспрессия *ACER1* вообще отсутствует в клетках спинного мозга. Эти керамидазы локализуются в эндоплазматическом ретикулуме и в комплексе Гольджи, т.е. этот вид керамидаз не участвует в генерации сфингозина из керамидов. Резкий скачок экспрессии СФЗ-1-Ф-лиазы на терминальной стадии заболевания демонстрирует падение антиапоптотических резервов клеток двигательных нейронов и стремительное развитие апоптоза. А усиление экспрессии гена сфингозин-киназы на 2-й и 3-й мес. эксперимента может объясняться защитными свойствами клеток двигательных нейронов спинного мозга. Однако эти свойства нивелируются в результате стремительного развития их гибели на терминальной стадии в возрасте 4 мес.

Применение метода масс-спектрометрии позволило изучить различия в уровнях трех самых важных сфингоидных оснований, анализ которых другими методами довольно затруднителен. Мы впервые продемонстрировали участие сфингоидных оснований в гибели клеток спинного мозга при развитии БАС. Кроме того, эти данные получены на модели, которая довольно близко имитирует спорадическую форму БАС у человека. Более глубокое понимание биологических путей, регулирующих метаболизм различных сфинголипидов при развитии БАС, может привести к идентификации мишеней для лекарственных препаратов. В качестве таких мишеней могут выступить ферменты метаболизма сфингоидных оснований, участвующих в патогенезе БАС, например, ингибиторы кислой керамидазы, ответственной за генерацию сфингозина. Особый интерес в качестве потенциального лекарственного средства для лечения БАС представляет препарат Fingolimod — синтетический аналог сфингозина, который в организме фосфорилируется и оказывает влияние, характерное для сфингозин-1-фосфата, антиапоптотического метаболита сфинголипидов [72]. Таким образом, подробное изучение изменений в метаболизме сфингоидных оснований при БАС позволит более подробно понять его пато-

логические аспекты и создать новые лекарственные средства для лечения данной нейродегенеративной патологии.

Финансирование. Исследование нейродегенеративных процессов в модельных животных линии FUS(1-359) поддержано Российским научным фондом (проект № 19-13-00378). Содержание животных обеспечено программой поддержки биоресурсных коллекций ИФАВ РАН и проведено на оборудовании ЦКП ИФАВ РАН в рамках Гос. задания ИФАВ РАН «Поиск и исследование механизмов действия нейропротекторов и стимуляторов когнитивных функций» № 0090-2019-0005. Исследования по свойствам

липидов в нейропатологиях выполнены в рамках госзадания ИБХФ РАН тема № 44.4 (Гос. Регистрации 01201253310).

Благодарности. Содержание животных обеспечено программой поддержки биоресурсных коллекций ИФАВ РАН и проведено на оборудовании ЦКП ИФАВ РАН. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования был выполнен на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Den Bosch, L. (2011) Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 348765, doi: 10.1155/2011/348765.
2. Robberecht, W., Sapp, P., Viaene, M.K., Rosen, D., McKenna-Yasek, D., Haines, J., Horvitz, R., Theys, P., and Brown, R. Jr. (1994) Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.*, **62**, 384–387, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62010384.x.
3. Koppers, M., van Blitterswijk, M.M., Vlam, L., Rowicka, P.A., van Vught, P.W., Groen, E.J., Spliet, W.G., Engelen-Lee, J., Schelhaas, H.J., de Visser, M., van der Kooi, A.J., van der Pol, W.L., Pasterkamp, R.J., Veldink, J.H., and van den Berg, L.H. (2012) VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiol. Aging*, **33**, 837, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.006.
4. Daoud, H., Suhail, H., Szuto, A., Camu, W., Salachas, F., Meininger, V., Bouchard, J.P., Dupre, N., Dion, P.A., and Rouleau, G.A. (2012) UBQLN2 mutations are rare in French and French-Canadian amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiol. Aging*, **33**, 2230–2233, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.03.015.
5. Sathasivam, S., Ince, P.G., and Shaw, P.J. (2001) Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **27**, 257–274, doi: 10.1046/j.0305-1846.2001.00332.x.
6. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., et al. (2011) Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS, *Neuron*, **72**, 245–256, doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011.
7. Mackenzie, I.R., Bigio, E.H., Ince, P.G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N.J., Kwong, L.K., Forman, M.S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretschmar, H.A., Monoranu, C.M., Highley, J.R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P.J., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2007) Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations, *Ann. Neurol.*, **61**, 427–434, doi: 10.1002/ana.21147.
8. Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., and Vandenberg, C.R. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis, *Science*, **323**, 1205–1208, doi: 10.1126/science.1166066.
9. Deng, H.X., Zhai, H., Bigio, E.H., Yan, J., Fecto, F., Ajroud, K., Mishra, M., Ajroud-Driss, S., Heller, S., Sufit, R., Siddique, N., Mugnaini, E., and Siddique, T. (2010) FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and nonSOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Neurol.*, **67**, 739–748, doi: 10.1002/ana.22051.
10. Daoud, H., Dobrzeniecka, S., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., Dion, P.A., and Rouleau, G.A. (2013) Mutation analysis of PFN1 in familial amyotrophic lateral sclerosis patients, *Neurobiol. Aging*, **34**, 1311.e1–1311.e2, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.001.
11. Munch, C., Sedlmeier, R., Meyer, T., Homberg, V., Sperfeld, A.D., Kurt, A., Prudlo, J., Peraus, G., Hanemann, C.O., Stumm, G., and Ludolph, A.C. (2004) Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS, *Neurology*, **63**, 724–726, doi: 10.1212/01.WNL.0000134608.83927.B1.
12. Rademakers, R., and van Blitterswijk, M. (2014) Excess of rare damaging TUBA4A variants suggests cytoskeletal defects in ALS, *Neuron*, **84**, 241–243, doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.002.
13. Ghasemi, M., and Brown, R.H. (2017) Genetics of amyotrophic lateral sclerosis, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **7**, a024125.
14. Hussain, G., Anwar, H., Rasul, A., Imran, A., Qasim, M., Zafar, S., Imran, M., Kamran, S.K.S., Aziz, N., Razzaq, A., Ahmad, W., Shabbir, A., Iqbal, J., Baig, S.M., Ali, M., Gonzalez de Aguilar, J.L., Sun, T., Muhammad, A., and Muhammad Umair, A. (2019) Lipids as biomarkers of brain disorders, *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, **7**, 1–24, doi: 10.1080/10408398.2018.1529653.
15. Hussain, G., Wang, J., Rasul, A., Anwar, H., Imran, A., Qasim, M., Zafar, S., Kamran, S.K.S., Razzaq, A., Aziz, N., Ahmad, W., Shabbir, A., and Iqbal, J. (2019) Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases, *Lipids Health Dis.*, **18**, 26–38, doi: 10.1186/s12944-019-0965-z.
16. Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Seilhean, D., Hauw, J.J., Lacomblez, L., Loeffler, J.P., and Meininger, V.

- (2008) Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology*, **70**, 1004–1009, doi: 10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27.
17. Chen, X., Yazdani, S., Piehl, F., Magnusson, P.K.E., and Fang, F. (2018) Polygenic link between blood lipids and amyotrophic lateral sclerosis, *Neurobiol. Aging*, **67**, 202.e1–202.e6, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.022.
 18. Albi, E., Alessenko, A., and Grosch, S. (2018), *Mediators Inflamm.*, **2018**, 1–3, doi: 10.1155/2018/7464702.
 19. Алесенко А.В. (2013) Потенциальная роль сфинголипидов в нейропатогенезе болезни Альцгеймера, *Биомедицинская химия*, **59**, 25–50, doi: 10.18097/pbmc.20135901025.
 20. Maceyka, M., and Spiegel, S. (2014) Sphingolipid metabolites in inflammatory disease, *Nature*, **510**, 58–67, doi: 10.1038/nature13475.
 21. Okuwa, H., Kanno, T., Fujita, Y., Gotoh, A., Tabata, C., Fukuoka, K., Nakano, T., and Nishizaki, T. (2012) Sphingosine suppresses mesothelioma cell proliferation by inhibiting PKC- δ and inducing cell cycle arrest at the G(0)/G(1) phase, *Cell Physiol. Biochem.*, **30**, 995–1004, doi: 10.1159/000341476.
 22. Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H. Jr., and Bell, R.M. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12604–12609.
 23. Conkling, P.R., Patton, K.L., Hannun, Y.A., Greenberg, C.S., and Weinberg, J.B. (1989) Sphingosine inhibits monocyte tissue factor-initiated coagulation by altering factor VII binding, *J. Biol. Chem.*, **264**, 18440–18444.
 24. Zhang, H., Buckley, N.E., Gibson, K., and Spiegel, S. (1990) Sphingosine stimulates cellular proliferation via a protein kinase C-independent pathway, *J. Biol. Chem.*, **265**, 76–81.
 25. Hakomori, S.-I. (1992) Functional role of glycosphingolipids in tumor progression, *J. Exp. Med.*, **168**, 211–222, doi: 10.1620/tjem.168.211.
 26. Bibel, D.J., Aly, R., and Shinefield, H.R. (1995) Topical sphingolipids in antisepsis and antifungal therapy, *Clin. Exp. Dermatol. Clin. Exp. Dermatol.*, **20**, 395–400.
 27. Taha, T.A., Mullen, N.D., and Obeid, L.M. (2006) A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 2027–2036.
 28. Alessenko, A.V., and Khrenov, A.V. (1999) Role of sphingosine in induced apoptosis, *Lipids*, **34**, S75–S76, doi: 10.1007/bf02562235.
 29. Krown, K.A., Page, Mt., Nguyen, C., Zechner, D., Gutierrez, V., Comstock, K.L., Gembotski, C.C., Quintana, P.J., and Sabbadini, R.A. (1996) Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death, *J. Clin. Invest.*, **98**, 2854–2865, doi: 10.1172/jci119114.
 30. Sweeney, E.A., Sakakura, C., Shirahama, T., Masamune, A., Ohta, H., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1996) Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines, *Int. J. Cancer*, **66**, 358–366, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19960503)66:3<358::aid-ijc16>3.0.co;2-7.
 31. Cuvillier, O., Nava, V.T., Murthy, S.K., Edsall, L.C., Levade, T., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001) Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells, *Cell Death Differ.*, **8**, 162–171, doi: 10.1038/sj.cdd.4400793.
 32. Hung, W.C., Chang H.C., and Chuang, L.Y. (1999) Activation of caspase-3-like proteases in apoptosis induced by sphingosine and other long-chain bases in Hep3B hepatoma cells, *Biochem. J.*, **338**, 161–166.
 33. Smith, E.R., Merrill, A.H., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2000) Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C, *Methods Enzymol.*, **312**, 361–373, doi: 10.1016/s0076-6879(00)12921-0.
 34. McDonald, O.B., Hannun, Y.A., Reynolds, C.H., and Sahyoun, N. (1991) Activation of casein kinase II by sphingosine, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21773–21776.
 35. Coroneos, E., Wang, Y., Panuska, J.R., Templeton, D.J., and Kester, M. (1996) Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades, *Biochem. J.*, **316**, 13–17, doi: 10.1042/bj3160013.
 36. Megidish, T., White, T., Takio, K., Titani, K., Igarashi, Y., and Hakomori, S. (1995) The signal molecular protein 14-3-3 is a target a sphingosine- or N,N-dimethylsphingosine-depend kinase in 3T3 (A31) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **216**, 739–747, doi: 10.1006/bbrc.1995.2684.
 37. Pyne, S., and Pyne, N.J. (1996) The differential regulation of cyclic AMP by sphingomyelin-derived lipids and the modulation of sphingolipid-stimulated extracellular signal regulated kinase-2 in airway smooth, *Biochem. J.*, **315**, 917–923, doi: 10.1042/bj3150917.
 38. Yang, S.D., Chang, H.C., and Lee, S.C. (1996) Okadaic acid, sphingosine, and phorbol ester reversibly modulate heat induction on protein kinase FA/GSK-3 alpha in A431 cells, *J. Cell. Biochem.*, **60**, 218–225, doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960201)60:2<218::AID-JCB6>3.0.CO;2-#.
 39. Anastasiadis, P.Z., Kuhn, D.M., Blitz, J., Imerman, B.A., Louie, M.C., and Levine, R.A. (1996) Regulation of tyrosine hydrolase and tetrahydrobiopterin biosynthetic in PC12 cells by NGF, EGF and IFN-gamma, *Brain Res.*, **713**, 125–133, doi: 10.1016/0006-8993(95)01494-2.
 40. Zhou, H., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Pittman, R.N. (1998) Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16568–16575, doi: 10.1074/jbc.273.26.16568.
 41. Lavie, Y., and Liscovitch, M. (1990) Activation of phospholipase D by sphigoid bases in NG108-15 neural derived cells, *J. Biol. Chem.*, **265**, 3868–3872.
 42. Matecki, A., Stopa, M., Was, A., and Pawelczyk, T. (1997) Effect of sphingomyelin and its metabolites on the activity of human recombinant PLC delta 1, *Int. Biochem. Cell. Biol.*, **29**, 815–828, doi: 10.1016/s1357-2725(97)00014-9.
 43. Sasaki, J.I., Yamaguchi, M., Yamane, H., Okamura, N., and Ishibashi, S. (1996) Sphingosine inhibition of NADPH oxidase activation in a cell-free system, *J. Biochem. (Tokio)*, **120**, 705–709, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021468.
 44. Pushkareva, M.Yu., Khan, W.A., Alessenko, A.V., Sahyoun, N., and Hannun, Y.A. (1992) Sphingosine activation of protein kinases in Jurkat T cells. *In vitro* phosphorylation of endogenous protein substrates and specificity of action, *J. Biol. Chem.*, **267**, 15246–15251.
 45. Jefferson, A.B., and Schulman, H. (1988) Sphingosine inhibites calmoduline-depended enzymes, *J. Biol. Chem.*, **263**, 15241–15244.

46. Arnold, R.S., and Newton, A.C. (1991) Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine, *Biochemistry*, **30**, 7747–7754.
47. Mullmann, T.J., Siegel, M.I., Egan, R.W., and Billah, M.M. (1991) Sphingosine inhibits phosphatidate phosphohydrolase in human neutrophils by a PKC-independent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **266**, 2013–2016.
48. Sakane, S., Takemura, H., Yamada, K., Imoto, K., Kaneko, M., and Ohshika, H. (1996) Different effects of sphingosine, R59022 and anionic amphiphiles on two diacylglycerol kinase isozymes purified from porcine thymus cytosol, *J. Biol. Chem.*, **271**, 1148–1155, doi: 10.1016/0014-5793(89)81134-2.
49. Sohal, P.S., and Corne, R.B. (1990) Sphingosine inhibits the activity of rat liver CTP- phosphocholine cytidyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **265**, 11746–11750.
50. Davis, R.J., Girones, N., and Faucher, M. (1988) Two alternative mechanisms control the interconversion of functional states of the epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5373–5379.
51. Fausher, M., Girones, N., Hannun, Y.A., Bell, R.M., and Davis, R.J. (1988) Regulation of the epidermal growth factor receptor phosphorylation state by sphingosine in A431 human epidermoid carcinoma cells, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5319–5327.
52. Huang, W.C., and Chueh, S.H. (1996) Calcium mobilization from the intracellular mitochondrial and nonmitochondrial stores of the rat cerebellum, *Brain Res.*, **718**, 151–158, doi: 10.1016/0006-8993(96)00108-4.
53. Czajkowski, R., and Baranska, J. (1999) Sphingosine and phorbol ester modulate protein kinase C activity and modify ATP-evoked calcium mobilization in glioma C6 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 614–618, doi: 10.1006/bbrc.1999.0946.
54. Tamiya-Koizumi, K., Murate, T., Suzuki, M., Simbulan, C.M., Nakagawa, M., Takemura, M., Furuta, K., Izuta, S., and Yoshida, S. (1997) Inhibition of DNA primase by sphingosine and its analogues parallels with their growth suppression of cultured human leukemic cells, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **41**, 1179–1189, doi: 10.1080/15216549700202271.
55. Koiv, A., Palvimä, J., and Kinnunen, P.K. (1995) Evidence for ternary complex formation by histone H1 and liposomes, *Biochemistry*, **34**, 8018–8027, doi: 10.1021/bi00025a007.
56. Hwang, C.L., Chen, M.S., and Hwang, J.L. (1989) Phorbol ester transiently increases topoisomerase I mRNA levels in human skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **264**, 14923–14926.
57. Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Броницкий Е.В., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ермолевич Т.Г., Еляков А.Б., Попов А.Н., Федоров Е.Н., Лыткина О.А., Кухарский М.С., Тарасова Т.В., Шелковникова Т.А., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Гольдман И.Л., Садчиков Е.Р., Бачурин С.О., Скворцова В.И. (2014) Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **8**, 63–70.
58. Bligh, T.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917, doi: 10.1139/o59-099.
59. Sullards, M.C. (2000) Analysis of sphingomyelin, glucosylceramide, ceramide, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate by tandem mass spectrometry, *Methods Enzymol.*, **312**, 32–45, doi: 10.1016/S0076-6879(00)12898-8.
60. Funikov, S.Y., Rezvykh, A.P., Mazin, P.V., Morozov, A.V., Maltsev, A.V., Chicheva, M.M., Vikhareva, E.A., Evgen'ev, M.B., Ustyugov, A.A. (2018) FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy, *Neurogenetics*, **19**, 189–204, doi: 10.1007/s10048-018-0553-9.
61. Krasnov, G.S., Dmitriev, A.A., Kudryavtseva, A.V., Shargunov, A.V., Karpov, D.S., Uroshlev, L.A., Melnikova, N.V., Blinov, V.M., Poverennaya, E.V., Archacov, A.I., Lisitsa, A.V., and Ponomarenko, E.A. (2015) PPLine: An automated pipeline for SNP, SAP, and splice variant detection in the context of proteogenomics, *J. Proteome Res.*, **14**, 3729–3737, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00490.
62. Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
63. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15–21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
64. Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015) HTSeq – a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinformatics*, **31**, 166–169, doi: 10.1101/002824.
65. Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010) edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139–140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
66. RC Team (2000) *R Language Definition*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
67. Thissen, D., Steinberg, L., and Kuang, D. (2002) Quick and easy implementation of the Benjamini-Hochberg procedure for controlling the false positive rate in multiple comparisons, *J. Educ. and Behav. Stat.*, **27**, 77–83, doi: 10.3102/10769986027001077.
68. Wickham, H. (2011) ggplot2, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, **3**, 180–185, doi: 10.1002/wics.147.
69. Hensley, K., Floyd, R.A., Gordon, B., Mou, S., Pye, Q.N., Stewart, C., West, M., and Williamson, K. (2002) Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.*, **82**, 365–367, doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00968.x.
70. Ekegren, T., Grundstrom, E., Lindholm, D., and Aquilonius, S.M. (1999) Upregulation of Bax protein and increased DNA degradation in ALS spinal cord motor neurons, *Acta Neurol. Scand.*, **100**, 317–21, doi: 10.1111/j.1600-0404.1999.tb00403.x.
71. Guegan, C., Vila, M., Rosoklija, G., Hays, A.P., and Przedborski, S. (2001) Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurosci.*, **21**, 6569–6576, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-17-06569.2001.
72. Berry, J.D., Paganoni, S., Atassi, N., Macklin, E.A., Goyal, N., Rivner, M., Simpson, E., Appel, S., Grasso, D.L., Mejia, N.I., Mateen, F., Gill, A., Vieira, F., Tassinari, V., and Perrin, S. (2017) Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability, *Muscle Nerve*, **56**, 107784, doi: 10.1002/mus.25733.

CHANGES IN METABOLISM OF SPHINGOID BASES IN THE BRAIN AND SPINAL CORD OF TRANSGENIC MICE FUS(1-359) MODELING AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

U. A. Gutner¹, M. A. Shupik¹, O. A. Maloshitskaya², S. A. Sokolov², A. P. Rezvykh³,
S. Yu. Funikov³, A. T. Lebedev², A. A. Ustyugov⁴, and A. V. Alessenko^{1*}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; E-mail: alicealessenko@gmail.com

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119999 Moscow, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

⁴ Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy
of Sciences, 142432 Chernogolovka, Moscow Region, Russia

Received March 7, 2019

Revised June 17, 2019

Accepted June 17, 2019

The aim of this study was to determine changes in the levels of sphingoid bases – sphingosine (SPH), sphinganine and sphingosine-1-phosphate (S1P) – and expression of genes encoding enzymes, involved in their metabolism, in brain structures (hippocampus, cortex and cerebellum) and in spinal cord of transgenic mice of the FUS(1-359) strain. FUS(1-359) mice, possessing motor impairments, were used as an amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model. Lipids from the structures of the brain and spinal cord after 2, 3, and 4 months of disease development were analyzed by chromat-mass-spectrometry. Expression of *SPHK1*, *SPHK2*, *SGPP2*, *SGPL1*, *ASAH1*, and *ASAH2* genes was changed. The level of SPH and sphinganine, sphingoid bases with pronounced pro-apoptotic properties, dramatically increased in spinal cord at the terminal stage of the disease. The ratio of anti-apoptotic S1P to SPH and sphinganine was sharply reduced, indicating an intensive apoptosis in spinal cord cells. Significant changes in the content of SPH and S1P and in the expression of genes related to their metabolism were found at the terminal stage of ALS in spinal cord. Expression of *SGPL* gene (S1P lyase) was sharply activated and expression of *SGPP2* gene (S1P phosphatase) was reduced. Deeper understanding of the regulation of metabolism of various sphingolipids in ALS will help to identify targets for new-generation drugs.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, sphingosine, sphingosine-1-phosphate, *SPHK2*, *SGPP2*, *SGPL1*, *ASAH1*, *ASAH2*