

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ЖИВОТНЫХ С FUS-ПРОТЕИНОПАТИЕЙ

© 2021 г. Е. А. Вихарева^{1, *}, М. М. Чичёва¹, М. Б. Евгеньев², С. Ю. Фуников²,
А. В. Дейкин³, С. О. Бачурин¹, А. А. Устюгов¹

¹ФГБУН Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
Черноголовка, Московская область, Россия

²ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

³ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.06.2020 г.

После доработки 03.07.2020 г.

Принята к публикации 04.07.2020 г.

Известно, что шапероны и, в частности, белки теплового шока массой 70 кДа (БТШ70) являются неотъемлемой частью клеточного протеостаза. Чтобы оценить роль БТШ70 в течении нейродегенеративного процесса мы использовали новую гибридную линию мышей с коэкспрессией аберрантного белка Δ FUS(1-359) и БТШ70 человека. Мыши новой гибридной линии характеризуются большей продолжительностью жизни, а также увеличением продолжительности симптоматической стадии по сравнению с контрольными животными. Кроме этого, по результатам физиологических тестов можно сделать вывод о положительном влиянии БТШ70 на мышечную силу на симптоматической стадии течения модельного заболевания.

Ключевые слова: трансгенные животные, шапероны, протеинопатия

DOI: 10.31857/S1027813321010143

ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС) это одно из самых часто встречаемых возрастных заболеваний моторного нейрона, которое затрагивает спинной и головной мозг. С БАС связано множество генетических мутаций, основные из которых затрагивают Cu/Zn супероксиддисумутазу (SOD1), а также РНК-связывающие белки – TDP-43 и FUS. Большинство случаев заболевания БАС связано с накоплением неправильно свернутых белков, а также их агрегатов [1]. Дегградация таких белков при помощи убиквитинпротеасомной системы или аутофагосомного пути относится к потенциальным терапевтическим мишеням, поскольку эффективность этих механизмов снижается с возрастом [2, 3].

Шапероны (белки теплового шока) и кошапероны обеспечивают внутриклеточный гомеостаз и препятствуют повреждению клеточных белков при повышении температур и других стрессирующих воздействиях внешней среды, а также при старении. Они являются неотъемлемой частью системы протеостаза в эукариотических клетках,

выполняя ключевую роль в процессах сворачивания и созревания белков, а также дегградации белков с неправильной конформацией и агрегатов из них. К семейству белков теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70) относятся одни из самых распространенных и повсеместно экспрессируемых шаперонов, которые участвуют во многих биологических процессах [4].

В исследованиях, проведенных на клеточных и животных моделях, показано, что повышенная экспрессия БТШ70 способствует снижению олигомеризации α -синуклеина [5, 6], а также ингибирует аккумуляцию полиглутамина, характерную для болезни Хантингтона [7]. Было показано, что введение рекомбинантного человеческого стресс белка (БТШ70) животным с моделью нейродегенерации типа болезни Альцгеймера, а также при сепсисе способно уменьшать клинические проявления этих патологий [8]. Уровень БТШ70 в спинном мозге пациентов со спорадической формой БАС значительно снижен [9], из чего можно предположить его роль в предотвращении развития патогенетического процесса.

Результаты этого исследования также вносят вклад в понимание роли БТШ70 в развитие процесса протеинопатии.

* Адресат для корреспонденции: 142432 Россия, Московская область, г. Черноголовка, Северный пр-д, 1; e-mail: ekaterina.ipac@gmail.com.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Для этого исследования была создана новая гибридная линия животных с коэкспрессией аберрантного белка Δ FUS(1-359) [1] и БТШ70 человека [10]. Генотип животных подтверждали при помощи ПЦР. Для определения наличия трансгенных кассет использовался метод ПЦР с использованием коммерческого набора GenPak PCR Core (ISOGENE laboratory ltd., Россия). Для детекции вставки FUS использовалась смесь праймеров: FUS_for: TCTTTGTGCAAGGCCTGG-GT, FUS_rev: TAATCATGGGCTGTCCCGTT (Evrogen, Россия, C = 100 мкм) – 0.2 мкл. Для детекции вставки HSP использовалась смесь праймеров: HSP_for: AAGACCCTCCTCCTGTATGG, HSP_rev: TCAGACGCAACTCAGCAC (Evrogen, Россия, C = 100 мкм) – 0.2 мкл.

Для исследования использовали только самцов. В качестве контроля использовали гомизиготных особей по трансгенной кассете FUS(1-359), а также животных с экспрессией человеческой изоформы белка теплового шока 70 кДа (HSP^{Het}) и животных дикого типа (CD1).

Методы оценки локомоторных функций. Оценку моторных функций трансгенных животных проводили при помощи тестов: “сила хватки”, “перевернутая сетка”, а также анализировали изменение походки при помощи установки CatWalk (Noldus, США). Животных тестировали в возрастных точках 30, 60, 90 и 120 дней, соответствующих разным стадиям развития модельного заболевания. Силу хватки передними лапами оценивали при помощи динамометра, каждое животное тестировали 3 раза. В качестве результата представлена сумма сил хватки в трех попытках.

В тесте “перевернутая сетка” животное помещали на сетку (размер ячейки 1 × 1 см), которую затем поднимали на высоту 1 м и переворачивали на 180° таким образом, чтобы мышь оказалась снизу, и выдерживали в течение 60 с. Фиксировали время проведенное на сетке в трех последовательных попытках с разницей 30 мин. В качестве результата представлено среднее время удержания на сетке в трех попытках. В данном тесте оценивается выносливость животного.

Дополнительно был проведен анализ изменения координации и походки животных на установке CatWalk. Животных помещали в темный коридор, подсвеченный снизу, и давали возможность свободно проходить в любом направлении. Каждое животное должно было совершить 3 успешных пробежки (“успешность” определяется программным обеспечением Noldus).

Протоколы экспериментального исследования на животных и методы эвтаназии согласованы с Комиссией по биоэтике ИФАВ РАН (протокол заседания Комиссии по биоэтике № 30 от 15.04.2019 г.).

Иммуногистохимия. Для иммуногистохимического анализа брали шейный отдел спинного мозга, как у животных гибридной линии FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het}, так и у FUS(1-359)^{Het} в качестве контроля. Ткани забирали в двух временных точках – 60 и 90 дней, каждая группа состояла из трех животных. Образцы ткани были зафиксированы раствором параформальдегида 4% и заключены в парафин. Проводили иммуофлуоресцентное окрашивание трансгенной аберрантной формы FUS(1-359), которую визуализировали с помощью антител против N-концевого фрагмента белка FUS (Abcam, Великобритания). Эндогенный FUS белок визуализирован с помощью окрашивания антителами против C-концевого фрагмента белка FUS (SantaCruzBiotech, США), который отсутствует у FUS(1-359).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Начиная с возраста 60 дней, животных ежедневно осматривали для детектирования начала симптоматической стадии болезни. Кривая выживаемости Каплан–Майера показывает, что у двойных трансгенов FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} средний возраст гибели был выше по сравнению с контрольными животными линии FUS(1-359)^{Het} и FUS(1-359)^{Hom} (рис. 1). Эти данные также коррелируют со средним возрастом начала манифестаций и продолжительности симптомов (рис. 2).

Другим важным физиологическим параметром, отражающим общую оценку здоровья, является прирост массы. Как правило, здоровые животные имеют стабильный прирост, тогда как начало патологического процесса часто коррелирует с флуктуациями в массе животных. В нашем исследовании было установлено, что прирост массы мышей двойных трансгенов FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} схож с приростом массы мышей дикого типа и трансгенных животных с экспрессией человеческой изоформы hHSP^{Het}, тогда как у трансгенных гомизиготных животных FUS(1-359)^{Het} этот показатель снижен. Было установлено, что пик падения прироста массы для двойных трансгенов (FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het}) приходится на возраст 140 дней, тогда как у животных FUS^{Het} – на 130 день.

Сила хватки у животных FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} в возрастной группе 60 дней достоверно превышала значения группы животных FUS(1-359)^{Het} в этом же возрасте. Однако с возрастом сила хватки к 120 дню снижалась у животных FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} и достоверно не отличалась от животных FUS(1-359)^{Het}, тогда как показатели в двух других контрольных группах (контрольные животные дикого типа WT и животные с экспрессией hHSP^{Het}) неуклонно росли (рис. 3a). Такого рода данные могут свидетельствовать о потенциаль-

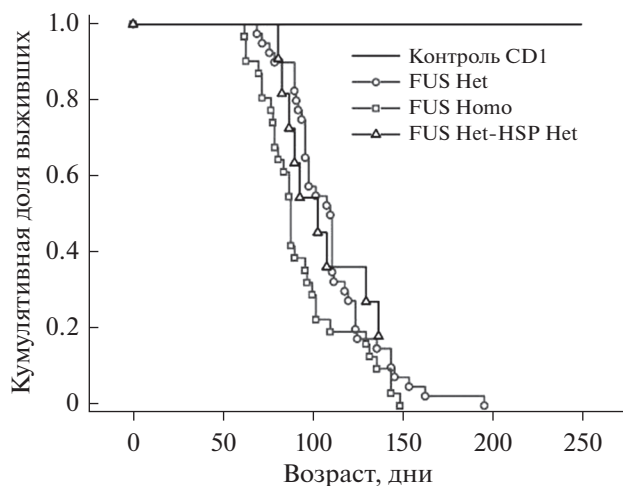


Рис. 1. Сравнение кривых выживаемости (по Каплану-Мейеру) между группами модельных животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 40$), FUS(1-359)^{Het} ($n = 42$), FUS(1-359)^{Homo} ($n = 45$) и животными дикого типа линии CD1 ($n = 11$).

ном терапевтическом эффекте БТШ70 на ранних стадиях заболевания, когда в тканях трансгенных животных с развивающейся протеинопатией еще не детектируются отложения. Вероятнее всего, с возрастом накопление внутриклеточных FUS-позитивных отложений приводит к гибели мотонейронов и прогрессии протеинопатии.

Результаты теста “перевернутая сетка” показали, что достоверные отличия были обнаружены у животных FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} и FUS(1-359)^{Het} в возрастных группах 30 и 90 дней (рис. 3б), что свидетельствует о том, что животные гибридной

линии с экспрессией человеческой изоформы hHSP^{Het} были выносливее трансгенных животных линии FUS(1-359)^{Het}.

Дополнительно был проведен анализ изменения координации и походки животных на установке CatWalk. Ранее были определены критерии, которые позволяли оценить основные параметры моторной дисфункции, отличающиеся у контрольных животных дикого типа и трансгенных животных линии FUS(1-359)^{Het}. Однако, несмотря на большое количество выявленных критериев, наиболее физиологически релевантным оказалось изменение средней скорости движения животного. Достоверные отличия скорости движения в группах FUS(1-359)^{Het} и FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} наблюдались во всех возрастных группах (рис. 4). Однако стоит отметить, что показатели скорости животных в группе FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} достоверно отличались во всех тестируемых возрастных группах относительно контрольной группы животных дикого типа. Это может свидетельствовать о том, что нейропротекторный эффект БТШ70 был недостаточным для полного восстановления двигательных функций до значений, наблюдаемых у контрольной группы.

Для определения роли БТШ70 в накоплении FUS(1-359)-позитивных отложений провели иммунофлуоресцентный анализ гистопатологических отложений в спинном мозге трансгенных животных. Оказалось, что у гибридной линии трансгенных животных FUS-HSP общая плотность FUS(1-359)-позитивно окрашенных клеток ниже по сравнению с трансгенными животными линии FUS Het в обеих возрастных точках, выбранных для анализа. Для количественной оценки этого

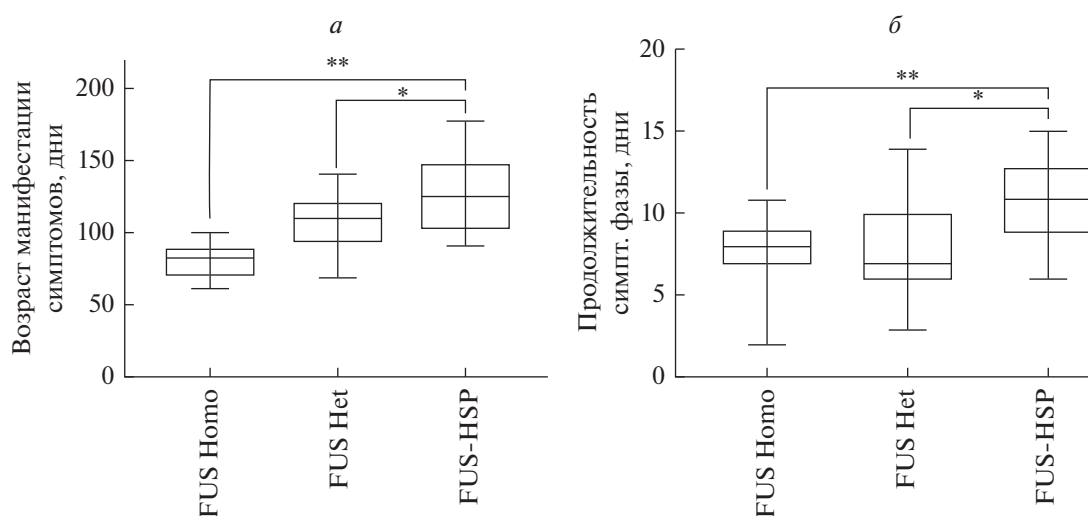


Рис. 2. Манифестация и продолжительность клинических симптомов у трансгенных животных. Средний возраст начала (а) и продолжительности симптоматического периода (б) у животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 39$), гемизиготных FUS(1-359)^{Het} ($n = 60$) и гомозиготных FUS(1-359)^{Homo} ($n = 53$). Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому t -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

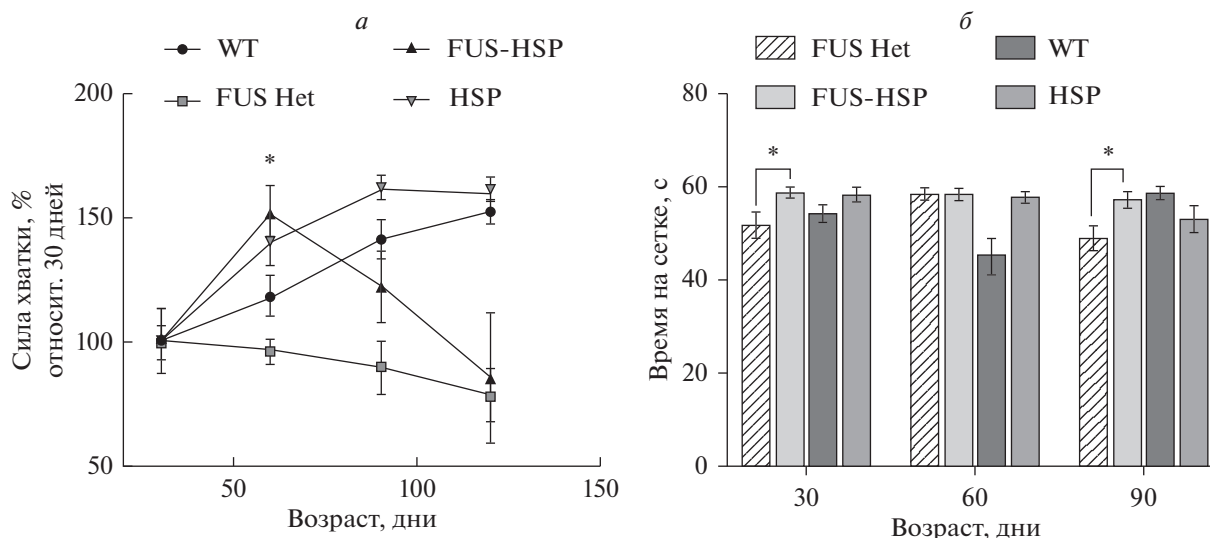


Рис. 3. Результаты теста «сила хватки» (а) и среднее время удерживания на перевернутой сетке (б) для групп FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 13$), FUS(1-359)^{Het} ($n = 9$), дикого типа CD1 (WT) ($n = 7$), а также hHSP^{Het} ($n = 11$). Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому t -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$.

параметра использовали отношение плотности сигнала эндогенного белка FUS к экзогенному (рис. 5).

Известно, что белки теплового шока играют важную роль в обеспечении гомеостаза организма, а также являются частью нейропротекторной

системы. Возрастные изменения совпадают с нейродегенеративными процессами, связанными с накоплением в нервной системе различных белковых отложений. Поведенческая характеристика и фенотипирование новой гибридной линии животных выявили, что экспрессия белка БТШ70 человека способствует увеличению продолжительности жизни в условиях развивающейся протеинопатии. Это один из первых важных результатов, указывающих на возможность использования препаратов на основе БТШ70 в качестве лекарственного средства для лечения нейродегенеративных расстройств. Полученные результаты по оценке возраста манифестации и продолжительности симптоматической фазы (оба значения увеличивались) у FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} животных могут свидетельствовать о болезнью-модифицирующих свойствах привнесенного БТШ70. Это также поддерживает вывод об основной роли БТШ70 в качестве нейропротекторного агента при развивающейся FUS-протеинопатии, что подтверждается результатами иммуногистохимического окрашивания срезов спинного мозга.

Можно отметить, что биологическая роль БТШ70 при развивающейся протеинопатии на физиологическом уровне заключается в увеличении выносливости, мышечной силы и улучшении координации трангенных животных, моделирующих нейродегенеративное заболевание.

При детальном анализе отложений было выявлено, что нейроны в передних рогах шейного отдела спинного мозга (в зоне от третьего сегмента L3 до пятого L5) у трангенных животных линии FUS Het образуют гистопатологические включения, которые не встречаются в этих же сегментах

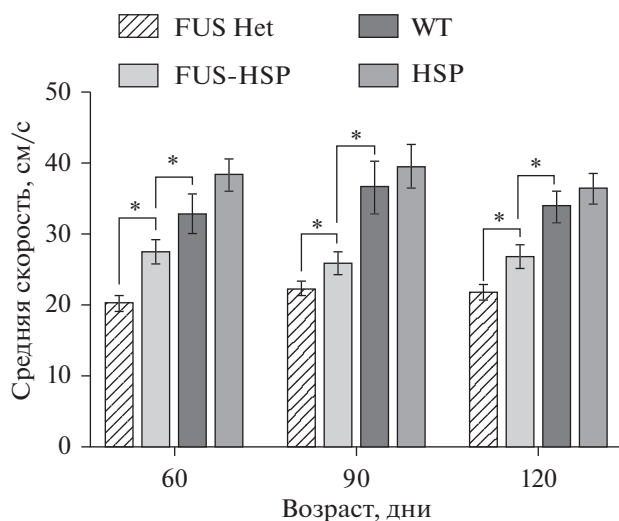


Рис. 4. Результаты характеристики средней скорости движения животных в установке NoldusCatwalk у трангенных животных в разных возрастных группах (60, 90 и 120 дней). Количество животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} ($n = 13$), FUS(1-359)^{Het} ($n = 9$), животных дикого типа линии CD1 (WT, $n = 7$) и животных с экспрессией человеческой изоформы БТШ70 (HSP, $n = 11$). Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому t -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$.

Отношение интенсивности флуоресцентного сигнала эндогенного белка FUS к экзогенному

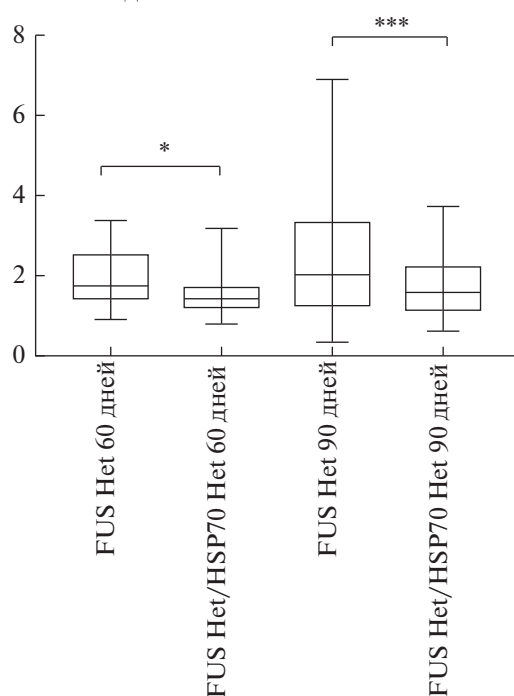


Рис. 5. Сравнение отношения флуоресцентного сигнала эндогенного белка FUS к экзогенному у животных с двойным трансгеном FUS(1-359)^{Het}-hHSP^{Het} и FUS(1-359)^{Het}. Уровень достоверности оценивался согласно непараметрическому *t*-критерию Вилкоксона–Манна–Уитни: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

спинного мозга у гибридной линии животных FUS-HSP. Вполне возможно, что наличие трансгенной человеческой изоформы БТШ70 может влиять на формирование сложных внутриклеточных отложений, являющихся причиной развивающейся протеинопатии. Следовательно, наличие человеческой изоформы БТШ70 в трансгенных животных может выполнять функцию шаперона, которая препятствует формированию белковых отложений, тем самым проявляя нейропротекторные свойства.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках РНФ № 19-13-00378 и соответствует теме Госзадания ИФАВ РАН № 0090-2019-0005 (содержание и фенотипирование трансгенных животных) с использованием оборудования ЦКП ИФАВ РАН. Линии мышей созданы и предоставлены для проведения экспериментов ЦКП Геномное редактирование при поддержке Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными выполнены в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных [11]. Протоколы экспериментального исследования на животных и методы эвтаназии согласованы с Комиссией по биоэтике ИФАВ РАН (протокол заседания Комиссии по биоэтике № 30 от 15.04.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shelkovernikova 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. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 35. P. 25266–25274.
2. Labbadia J., Morimoto R.I. // Annu. Rev. Biochem. 2015. № 84. P. 435–464.
3. Yerbury J.J., Ooi L., Dillin A., Saunders D.N., Hatters D.M., Beart P.M., Cashman N.R., Wilson M.R., Ecroyd H. // J. Neurochem. 2016. № 137. P. 489–505.
4. Lackie R.E., Maciejewski A., Ostapchenko V.G., Marques-Lopes J., Choy W.-Y., Duennwald M.L., Prado V.F., Prado M. // Front. Neurosci. 2017. P. 11–254.
5. Outeiro T.F., Putcha P., Tetzlaff J.E., Spoelgen R., Koker M., Carvalho F., Hyman B.T., McLean P.J. // PLoS One. 2008. № 3. P. e1867.
6. Putcha P., Danzer K.M., Kranich L.R., Scott A., Silinski M., Mabbett S., Hicks C.D., Veal J.M., Steed P.M., Hyman B.T., McLean P.J. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010. № 332. P. 849–857.
7. Sittler A., Lurz R., Lueder G., Prüller J., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U., Lehrach H., Wanker E.E. // Hum. Mol. Genet. 2001. № 10. P. 1307–1315.
8. Bobkova N.V., Garbuz D.G., Nesterova I., Medvinskaya N., Samokhin A., Alexandrova I., Yashin V., Karpov V., Kukharsky M.S., Ninkina N.N., Smirnov A.A., Nudler E., Evgen'ev M.E. // J. Alzheimer's Dis. 2014. V. 2. № 38. P. 425–435.
9. Chen H.-J., Mitchell J.C., Novoselov S., Miller J., Nishimura A.L., Scotter E.L., Vance C.A., Cheetham M.E., Shaw C.E. // Brain J. Neurol. 2016. № 139. P. 1417–1432.
10. Gurskiy Y.G., Garbuz D.G., Soshnikova N.V., Krasnov A.N., Deikin A., Lazarev V.F., Sverchinskyi D., Margulis B.A., Zatssepina O.G., Karpov V.L., Belzhelarskaya S.N., Feoktistova E., Georgieva S.G., Evgen'ev M.B. // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. № 6. P. 1055–1064.
11. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание. / Пер. с англ. Под ред. Белозерцевой И.В., Блинова Д.В., Красильщиковой М.С. М.: ИРБИС, 2017. 336 с.
12. Funikov S.Y., Rezyukh F.P., Mazin P.V., Morozov A.V., Mal'tsev A.V., Chicheva M.M., Vikhareva E.A., Evgen'ev M.B., Ustyugov A.A. // Neurogenetics. 2018. V. 19(3). P. 189–204.

The Role of Heat Shock Proteins on Life Duration and Behavioral Functions of Mice with FUS-Proteinopathy

**E. A. Vikhareva^a, M. M. Chicheva^a, M. B. Evgen'ev^b, S. Yu. Funikov^b,
A. V. Deikin^c, S. O. Bachurin^a, and A. A. Ustyugov^a**

^a*Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russia*

^b*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^c*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

It is known that chaperones and heat shock proteins with molecular weight 70 kDa, in particular, are one of therapeutic targets for proteinopathy treatment. The new transgenic animal line with a simultaneous expression of HSP70 and the pathogenic aberrant form of FUS in the nerve tissues was investigated in order to evaluate a role of HSP70 protein in neurodegenerative process. The new hybrid mice are characterized by increased longevity as well as increased duration of symptomatic stage compared with control animals. In addition, based on physiological test, it can be concluded that human HSP70 has positive effect on muscle force at the symptomatic stage of model disease.

Keywords: transgenic animals, chaperons, proteinopathy