На правах рукописи

ХРИТАНКОВА ИННА ВЛАДИМИРОВНА

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ TDP43-ПРОТЕИНОПАТИИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

14.03.03 – Патологическая физиология

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

МОСКВА – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт физиологически активных веществ» РАН и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институте общей патологии и патофизиологии» РАМН

Научные руководители:
Доктор химическинских наук, профессор, член-корр. РАН
Сергей Олегович Бачурин
Доктор медицинских наук
Наталья Николаевна Нинкина

Официальные оппоненты:
Вадим Сергеевич Репин
Доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАМН
Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнитеольного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования Минздравсоцразвития»
Профессор кафедры общей патологии и патофизиологии

Георгиева Софья Георгиевна
Доктор биологических наук, профессор, в.н.с.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта» РАН, заведующая Лаборатории факторов транскрипции

Ведущая организация: Российский университет дружбы народов

Защита состоится «___»_____2013 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.001.003.01 Федерального государственного бюджетного учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН по адресу: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН.

Автореферат разослан «___»_____2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук **Скуратовская Лариса Николаевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Постоянный рост числа нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), связанный с увеличением продолжительности жизни в развитых странах, является серьезной проблемой. Различного рода деменции составляют основную группу НДЗ в категории старшего возраста. Ожидается, что в ближайшие 30 лет их количество удвоится. Эффективного лечения для подавляющего большинства заболеваний на сегодняшний день не разработано. Деменции неизлечимы и неизбежно прогрессируют, в результате чего качество жизни как самих больных, так и членов их семьи, на которых часто ложится основная нагрузка по уходу за больными, со временем ухудшается. Все используемые на данный момент подходы к лечению НДЗ относятся к симптоматическим.

Фронтотемпоральная лобная дегенерация (ФТЛД) является третьей по распространенности формой возрастных нейродегенеративных заболеваний после болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Перед современной биомедицинской наукой поставлена актуальная задача необходимости разработки методов ее ранней диагностики и эффективного лечения. Создание адекватных модельных систем для изучения молекулярных механизмов развития ФТЛД и воспроизведения наиболее важных аспектов патогенеза данного заболевания обеспечит существенный прогресс в данном направлении и позволит проводить направленный поиск соединений для создания патофизиологической терапии ФТЛД.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью данной работы являлось создание адекватной клеточной модели TDP43-протеинопатии, пригодной для отбора нейропротекторных препаратов, необходимых при разработке методов патогенетической терапии нейродегенеративных заболеваний, основным молекулярно-патологическим звеном которых является агрегация белка TDP43.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Сконструировать экспрессионные плазмиды, кодирующие патогенные формы белка TDP43 человека, способные формировать TDP43-реактивные включения в клеточных культурах.
2. Воспроизвести в цитоплазме культивируемых клеток образование TDP43-реактивных структур, аналогичных патогистологическим включениям, обнаруживаемым у больных с ФТЛД и БАС.
3. Применить разработанную клеточную модель для отбора соединений, способных ингибировать процессы формирования TDP43-реактивных включений – основного патофизиологического фактора TDP43-протеинопатий.
4. Исследовать действие Димебона (гамма-карболинового соединения) на компоненты метаболических путей, вовлеченных в регуляцию аутофагосомной системы с целью разработки патогенетической терапии TDP43-протеинопатий на основе гамма-карболинов.

Научная новизна работы. В основе многих распространенных НДЗ лежит нарушение метаболизма и функции определенных белков, обладающих повышенной склонностью к агрегации. Патологическая агрегация конформационно-нестабильных белков и накопление токсичных продуктов этого процесса приводит к дисфункции пораженных нейрональных и глиальных клеток и, в конечном итоге, к их гибели. Недавно было показано, что в патогенезе целого ряда протеинопатий, в частности, некоторых форм фронтотемпоральной дегенерации (ФТЛД), критическую роль играет нарушение нормального метаболизма и функции ДНК/РНК-связывающего белка TDP43, сопровождающееся образованием характерных цитоплазматических включений. В представленном диссертационном исследовании проведена работа по созданию оригинальных модельных систем,

воспроизводящих основные элементы молекулярного патогенеза TDP43 протеинопатии в клеточных культурах. Создана панель оригинальных экспрессионных плазмид для исследования способности различных форм белка TDP43 человека к образованию цитоплазматических включений, сходных с патогистологическими включениями, обнаруживаемыми у больных с наследственными формами ФТЛД и БАС. Проведенный сравнительный анализ патогенных свойств различных мутантных форм белка TDP43 человека позволил получить новые данные о роли различных доменных последовательностей молекулы TDP43 в механизме формирования цитоплазматических депозитов. Впервые была получена агрессивная мутантная форма белка TDP43 (T5), способная образовывать патогенные включения амилоидного типа, и установлено, что для получения подобных агрегатов необходимо одновременное нарушение белковой структуры двух областей молекулы: РНК-связывающего домена и сигнала ядерной локализации. Созданная на основе аберрантной T5 формы оригинальная клеточная модель TDP43-протеинопатии была впервые адаптирована для изучения и тестирования нейропротекторных препаратов, способных ингибировать прогрессию TDP43-протеинопатии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Созданная клеточная модель, воспроизводит ключевое звено молекулярного патогенеза TDP43-протеинопатий и позволяет оптимизировать разработку лекарственных препаратов патофизиологической терапии форм ФТЛД с нарушенным метаболизмом белка TDP43. Так, впервые показано, что соединения группы гамма-карболинов (Димебон и два его фторированных производных) способны эффективно подавлять формирование цитоплазматических включений амилоидного типа, сформированных укороченной патогенной формой T5. Это указывает на возможный механизм ингибирующего прогрессию протеинопатии эффекта Димебона. Впервые показано, что Димебон способен

активировать аутофагосомную систему, осуществляющую удаление продуктов поздних стадий каскада белковой агрегации, регулируя экспрессию генов atg5 и atg16. При этом Димебон стимулирует фосфорилирование ERK1/2 и p38 киназ, которые вовлечены в механизм регуляции аутофагосомной системы, что является первым указанием на непосредственные киназные пути, регулируемые гамма-карболинами при коррекции протеинопатий.

Таким образом, полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные по изучению механизма нейропротекторного действия производных гамма-карболинов открывают новое направление в биомедицинской химии по оптимизации соединений этого класса для нужд патофизиологической терапии TDP43-протеинопатий. Созданная клеточная модель является простой и удобной для тестирования и отбора разрабатываемых лекарственных препаратов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Модифицирована структура белка TDP43 и получена его патогенная форма с высокими агрегационными свойствами, формирующая цитоплазматические депозиты, аналогичные патогистологическим включениям, обнаруживаемых у больных с ФТЛД и БАС.
2. В клеточной модели TDP43-протеинопатии нейропротекторный препарат Димебон и два его новых производных способны эффективно ингибировать агрегацию патогенной формы TDP43 – важную составляющую патогенеза ФТЛД и БАС.
3. Ингибирующее TDP43-протеинопатию действие Димебона осуществляется через активацию аутофагосомной системы.
4. Гамма-карболины (Димебон и его исследованные производные) могут рассматриваться в качестве перспективных соединений для разработки на их основе методов патофизиологической терапии TDP43-протеинопатий.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях и конгрессах: The EMBO Meeting 2010, September 3-7, 2010, Barcelona, Spain; Ежегодных конференциях «Фундаментальные науки – медицине», Россия, Москва 2010 и 2012; 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases 2011, March 6-10, Barcelona, Spain); 8th IBRO World Congress of Neuroscience 2011, July 14-18, Florence, Italy; Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» 2011, 18-22 апреля, Пущино, Россия; Международной конференции «Эффективные инструменты современной науки - 2012», April 27 – May 5, Prague, Czech Republic; XIX Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2013» 10-11 апреля, Санкт-Петербург, Россия, С. 128-130.

Объем и структура диссертации. Диссертация содержит: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, выводы и библиографический указатель, включающий работы на русском (11) и иностранных языках (124). Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит 4 таблицы и 25 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соединения.

Димебон: 3,6-диметил-9-(2-метил-пиридил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-гамма-карболин дигидрохлорид (производство ОАО «Органика», г. Новокузнецк); DF-203: фтор-производное димебона 3,6-диметил-9-(3-фторпиридил-5)-этил-1,2,3,4-тетрагидро-карболин дигидрохлорид; DF-213: фтор-производное димебона с дополнительной метильной группой в карболиновой группе (2-этил-9-(3фторпиридил-5)-этил-8-метил-2,3,4,5-тетрагидро-карболин дигидрохлорид.

Молекулярно-биологические и биохимические методы анализа. Для конструирования экспрессионных плазмид, кодирующих мутантные формы белка TDP43 человека, использовали стандартные методы клонирования. При клонировании последовательностей, полученных с помощью ПЦР, применяли Zero Blunt-TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen); конструкции для трансфекции получали переклонированием в pEGFP Vector. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора ZR Plasmid Miniprep Kit-classic (Zymo Research), анализ ДНК-фрагментов после расщепления рестрикционными эндонуклеазами (Fermentas) осуществляли в агарозном TAE геле.

Тотальную РНК выделяли при помощи набора RNeasy Plus Kit (Qiagen) и использовали в реакции обратной транскрипции для синтеза комплементарной цепи с помощью обратной транскриптазы SuperScript® III (Invitrogen) и гексамерного рандом-праймера (Promega). кДНК затем использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени, который выполняли в амплификаторе StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) с использованием набора DyNAmo HS SYBR Green supermix (Finnzymes).

Для белкового анализа методом иммуноблотинга проводили лизис клеточных культур прямо на чашках и разделяли осветленные лизаты в денатурирующем полиакриламидном геле после чего осуществляли перенос белков на поливинилиденфторидную мембрану Hybond-P (Amersham) методом полусухого электроблоттинга. Блокирование мембраны и инкубирование с антителами проводили в 4% растворе обезжиренного сухого молока в ТТБ. Детекцию специфического связывания антител проводили с помощью реагентов ECL Plus (Amersham).

Последовательную экстракцию белков проводили из осветленного супернатанта после лизирования клеток в высокосолевом буфере методом последовательного высокоскоростного центрифугирования при

48 000 об/мин (ультрацентрифуга Optima TLX-120, ротор TLA.100.4, Beckman Coulter). Осадки ресуспендировали в буферах с различным содержанием детергентов: Тритон X-100, RIPA, белок из детергент-нерастворимых фракций высвобождали кипячением в 10% SDS.

Клеточные культуры и модельные системы. Мутантные формы белка TDP43 человека получали в стабильно перевиваемой культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y (European Collection of Cell Cultures - ECACC), после их транзиентной трансфекции с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США).

Дифференцировку клеточных культур по нейрональному типу проводили добавлением ретиноевой кислоты в концентрации 10 мкМ (All-trans retinoic acid, Sigma). Для оценки цитотоксичности использовали CellTiter-Blue test (Promega). Для микроскопического и иммуноцитохимического анализов клетки выращивали на обработанных коллагеном (Collagen Type IV Sigma) покровных стеклах Ø 10 мм и фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в ФСБ. Блокировку стекол проводили в 10% сыворотке козы (Sigma) в ФСБ.

Антитела: Первичные антитела против: TDP43 поликлональные (в кролике), BD Transduction Laboratories (1:1000); β–тубулина моноклональные (в мыши), Sigma, (1:10000); GAPDH моноклональные (в мыши), Santa Cruz Biotechnology (1:1000); убиквитина N-19 (Santa Cruz Biotechnology (1:1000); GFAP поликлональные (в кролике), Sigma; нейрофиламента H поликлональные (в кролике), Sigma (1:500); фосфо-p38 MAPK, Cell Signaling (1:1000); фосфо-p44/42 MAPK (Erk1/2), Cell Signaling (1:1000).

Вторичные антитела: против IgG мыши или кролика, конъюгированные с флуорохромами Alexa546 или Alexa488, Molecular Probes, Invitrogen; вторичные антитела против IgG мыши или кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена; Amersham (1:3000).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование TDP43 протеинопатии в культуре клеток нейробластомы человека. Важным патогенетическим фактором развития молекулярной дисфункции при TDP43-протеинопатиях является изменение компартментализации белка TDP43: потеря им ядерной локализации и агрегация в цитоплазме. Для того, чтобы получить клеточную модель TDP43-протеинопатии, были созданы плазмидные конструкции, кодирующие мутантные патогенные формы белка TDP43 человека (Рис.1). В конструкции T1 [TDP43ΔNLS&187-192] удален сигнал ядерной локализации и область молекулы, в которой локализован ряд мутаций (с 187 по 192 аминокислоты), выявленных у пациентов с наследственными формами ФТЛД (Michael et. al. 2008). В конструкции TC была удалена вся N-концевая область. В конструкции T5 молекула белка TDP43 теряет функционально значимые домены, включая сигнал ядерной локализации, весь первый РНК-связывающий домен, линкерную часть и несколько аминокислот второго РНК-связывающего домен [Δ3-192]. По своей структуре эта суперукороченная молекула напоминает короткие аберрантные формы белка TDP43 размером 25 кДа, которые были детектированы различными методами в биологическом материале больных с ФТЛД, в составе патогистологических включений в агрегированном состоянии (Kadokura et al., 2009). Патогенные свойства созданных нами аберрантных вариантов белка TDP43 человека были исследованы в культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, которая широко используется для экспрессии нейроспецифичных белков и анализа их амилоидогенности.

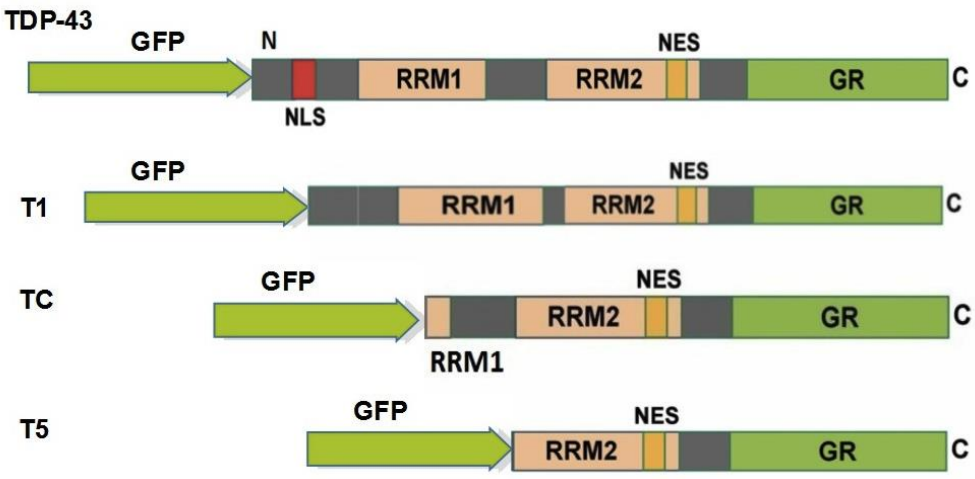

Рис. 1. Структурная организация белка TDP43 человека и его мутантных форм, кодируемых экспрессионными плазмидными конструкциями.
Полноразмерный TDP43 и его мутантные формы слиты на N-конце с маркерным флуоресцентным белком в составе экспрессионного вектора pEGFP-C1.
NLS – сигнал ядерной локализации; RRM1 и RRM2 – домены распознавания РНК; NES — сигнал ядерного экспорта; GR – глицин-богатый участок.

Плазмидная ДНК конструктов была введена в недифференцированные клетки SH-SY5Y методом транзиентной трансфекции. Высокий уровень экзогенной экспрессии обеспечивал активный синтез исследуемых форм белка, что было подтверждено методом иммуноблотинга в лизатах, полученных из трансфецированых клеточных культур. На Рис. 2 приведен пример анализа содержания патогенной формы белка T5 в клетках SH-SY5Y через различное время после их трансфекции. Интересно отметить, что достаточно хорошо детектируемое количество этого белка наблюдалось уже через 4 часа после трансфекции, однако существенного его накопления не происходило (Рис. 2).

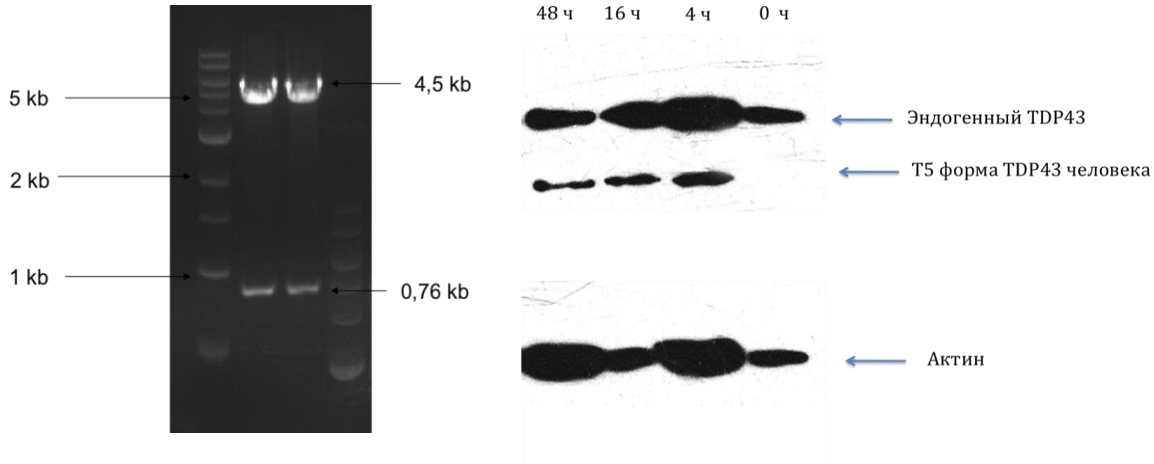

Рис. 2. Патогенная T5 форма TDP43 человека.
А*: Визуализация в агарозном геле мутантной формы кДНК гена TDP43 – T5, вектор pEGFP-C1. Размер фрагмента XhoI/BamHI (T5 форма) - 760 kb. Слева указан размер маркерных полос.* ***Б****: Анализ синтеза экзогенного укороченного белка TDP43 (T5) в культуре клеток SH-SY5Y через 4, 16 и 48 часов после трансфекции, метод иммуноблотинга. На нижней панели- содержание актина, использованного в качестве внутреннего контроля.*

Сравнительный микроскопический и биохимический анализ трансфецированных культур показал, что аберрантные формы TC и T5 способны агрегировать *in vivo* и формировать нерастворимые патогистологические включения, как это было показано ранее для ряда других мутантных форм, включая T1 (M.Yamashita et al. 2009). Таким образом, удаление N-концевых доменов в белке TDP43 существенно повышает его склонность к агрегации. Из всех проанализированных мутантных вариантов белка TDP43 именно T5 форма наиболее адекватно воспроизводила молекулярно-клеточную составляющую патогенеза ФТЛД с нарушенным метаболизмом TDP43. Цитоплазматические включения формируются белком T5 уже через 4 часа после трансфекции, что совпадает с результами иммуногистохимичекого анализа, и выявляются в виде дисперсных многочисленных агрегатов, которые транспортируются в перикариальную область, где сливаются, формируя крупные включения (Рис.3). Агрегаты T5 TDP43 белка человека формируются быстро, они

крупные, включения легко анализировать и считать, что делает разработанную нами модельную систему удобной при использовании для тестирования соединений, действие которых направлено на блокаду прогрессии протеинопатии.

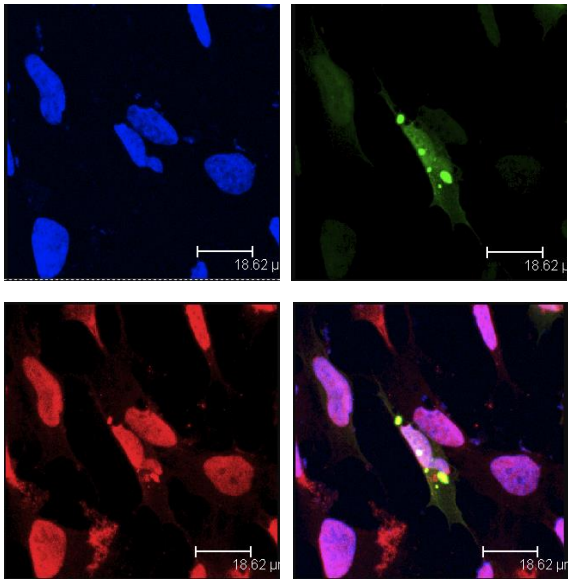

Рис. 3. Цитоплазматические включения, образуемые T5 формой белка TDP43 человека в культуре клеток SH-SY5Y.

16 часов после трансфекции. Зеленым флюоресценцирует T5 форма;синим окрашены ядра клеток (DAPI); красным - иммуногистохимическое окрашивание антителами против актина.

Сконструированная нами патогенная форма T5 оказалась высоко токсичной для клеток, как и большинство мутантных форм с модифицированным N-концом белковой молекулы TDP43 (Jonson et al., 2008; Brian et al., 2008; Wang et al., 2012). Мы показали, что уже через 12 часов после трансфекции наблюдалась гибель клеток, экспрессирующих патогенную форму T5, а через 48 часов после трансфекции их число снижалось почти в 10 раз, что определно подсчетом числа живых клеток, содержащих флюоресцентный белок, обнаруживаемых на площади 10 000 мкм^2 (Табл. 1).

Плазмиды	4 часа	12 часов	24 часа	48 часов
T5 форма	79,8±9,5	51,0±5,8	23,1±6,6	9,8±2,10
pEGFP-C1 вектор	70,4±8,7	89,0±10,8	79,0±12,8	51,8±5,7

Таблица 1. Число живых клеток, содержащих флюоресцентный белок, на площади 10 000 мкм^2

В качестве контроля паралельно проводили трансфекцию клеточной культуры плазмидной ДНК, кодирующей пустой pEGFP-C1 вектор, не содержащий последовательностей TDP43 (Табл. 1). Патофизиологическая картина TDP43 токсичности в клеточной модельной системе по этим основным параметрам соответствует картине, описанной для ряда форм ФТЛД и БАС, при которых гибель нейронов сопровождается потерей белком TDP43 ядерной локализации и накоплением TDP43-реактивных включений в дегенерирующих нейронах (Janssens et al., 2011).

В норме, TDP43 является растворимым ядерным белком. Однако при изменении конформации он активно агрегирует и образует нерастворимые фибриллярные структуры как в модельных трансгенных системах (Tong et al.,), так и в аутопсийном материале больных (Gendron et al., 2012). Нами было показано, что T5 TDP43 форма также способна фромировать детергент-нерастворимые агрегаты, что является важным признаком прогрессии протеинопатии (Рис. 4).

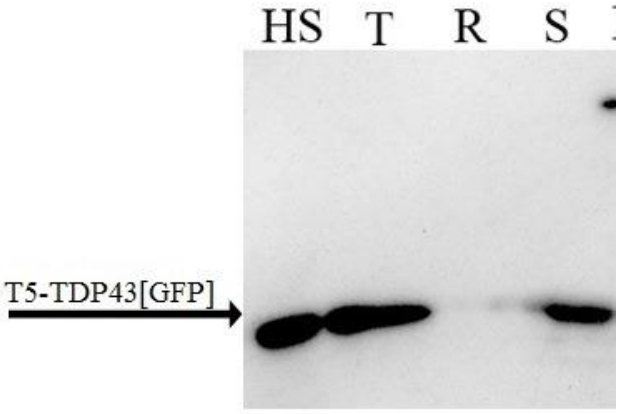

Рис. 4. Анализ содержания T5 TDP43 в детергент-нерастворимых фракциях препаратов тотального белка из культуры клеток SH-SY5Y. *Иммуноблотинг. HS - фракция растворимых белков; HS/T - фракция белков, растворимых в присутствии Тритон X100; SDS - фракция детергент-нерастворимых белков.*

Таким образом, разработанная нами клеточная модель TDP43-протеинопатии может быть использована для оценки и этого парамента при тестировании новых препаратов.

Использование клеточной модели для исследования действия Димебона и его производных на прогрессию TDP43-протеинопатии. В работах Hasegawa et al. (2009) впервые было показано, что Димебон способен ингибировать образование цитоплазматических агрегатов белка TDP43 в модельной системе. Позже это было подтверждено другими группами на различных модельных протеинопатиях (Bachurin et al., 2009; Steel et. Al., 201; Peters et al., 2013). В молекулярном патогенезе ФТЛД особая роль отводится укороченным аберантным формам TDP43 и, в частности, 25 кДа форме, которая присутствует в агрегированном состоянии в аутопсийном материале больных (Kadokura et al., 2009). Поэтому созданная нами модельная система оптимизирована для поиска и тестирования соединений, способных ингибировать процесс образования TDP43-реактивных включений.

Поскольку наша тестовая система включает транзиторную трансфекцию культивируемых клеток патогенными формами TDP43, особенно актуальной является возможность проводить трансфекции на недифференцированных культурах, а затем, стимулируя дифференцировку по нейрональному типу, моделировать протеинопатию уже в дифференцированных нейрональных клетках, так как эффективность трансфекции дифференцированных клеток крайне низкая. С другой стороны, соединения, особенно обладающие нейроспецифичностью, могут оказавать цитотоксичный эффект на нейрональные клетки (Moser et al., 2012). Нами было проведено сравнение чувствительности дифференцированных и недифференцированных клеток культуры SH-SY5Y к высоким концентрациям Димебона и двух его фторированных производных. Все три соединения оказались менее токсичны для дифференцированных, чем для недифференцированных культур. На Рис. 5 приведен пример стандартного теста определения цитотоксичности соединения DF-203, из которого следует, что даже при 250 мкМ концетрации соединения не

отмечается гибель дифференцированных клеток, в то время, как в недифференцированных культурах гибель начинается уже при 70 мкМ. Таким образом, мы показали, что исследуемые нами производные Димебона обладают низкой токсичестью на дифференцированных по нейрональному типу культурах (Рис. 5).

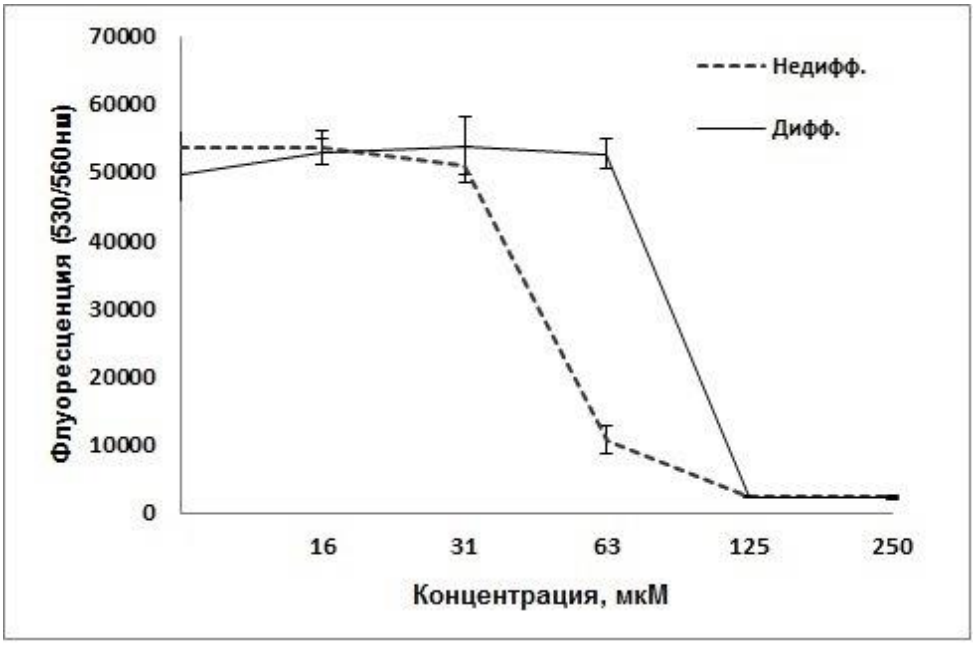

Рис. 5. Различия в цитотоксичности высоких концентраций соединения DF-203 на дифференцированных по нейрональному типу и недифференцированных культурах SH-SY5Y.

Для выявления ингибирующих протеинопатию свойств исследуемых препаратов их добавляли в культуральную среду и через различные промежутки времени проводили анализ прогрессии T5 TDP43-протеинопатии. Было исследовано действие двух новых его производных – DF-203 и DF-213 на количество, морфологию и кинетику формирования депозитов в недеференцированных SH-SY5Y клетках. После трансфекции в питательную среду добавляли либо Димебон, либо DF-203, либо DF-213 до конечной концентрации 10 мкМ; в контрольные образцы добавляли среду без препаратов. Через 16 часов клеточные культуры фиксировали и подсчитывали число флюоресцентных включений, рамер которых был не менее пяти микрон. Число включений

в образцах, культивируемых с добавлением Димебона, DF-203 или DF-213, выражали в процентном отношении к контрольным (рис. 6). Полученные нами данные по ингибированию Димебоном агрегации патогенных форм TDP43 хорошо согласуются с данными лаборатории M.Hasegava et. Al. (2009), где показано, что Димебон способен ингибировать агрегацию мутантной формы белка TC TDP43, при этом число клеток, содержащих агрегаты, уменьшается более чем в два раза. В случае сконструированной нами мутантной формы T5 этого белка уменьшение общего числа агрегатов в присутствие Димебона в объединенном пуле трансфецированных клеток также составляет порядка 55% от контрольных культур. Новые производные Димебона так же обладают ингибирующей TDP43-протеинопатию активностью и способны снижать число образуемых формой T5 агрегатов в нашей модельной клеточной системе с такой же эффективностью, как и Димебон (Рис. 6).

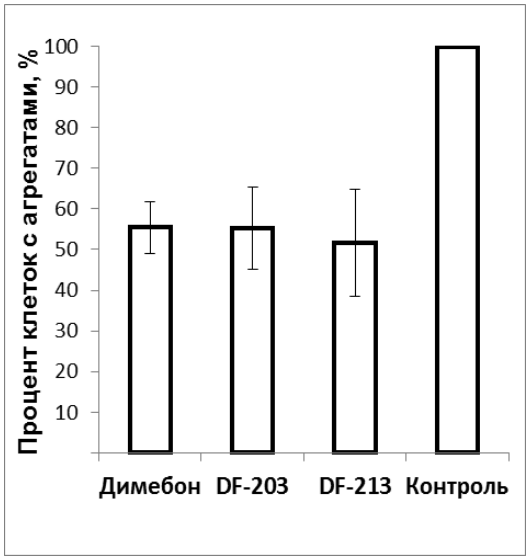

Рис.6. Содержание 5T TDP43 цитоплазматических включений в присутствии Димебона и его производных в недифференцированных культурах SH-SY5Y после трансфекции.

Конечная концентрация Димебона, DF-203 и DF-213 10 мкМ.

Важной научно-практической задачей является исследование действия препаратов на культуры зрелых нейронов, которые считаются более адекватными модельными системами, чем недифференцированные культуры даже если они обладают многими важными свойствами нейронов. Нами было изучено влияние

исследуемых производных Димебона на формирование включений в дифференцированной по нейрональному типу на разработанной клеточной модели и показано, что Димебон способен ингибировать агрегацию мутантной формы белка TDP43 (T5) в дифференцированных культурах не менее эффективно, чем в недифференцированных (Рис. 7).

Таким образом, мы показали, что введение атомов фтора в пиридиновый фрагмент структуры Димебона, обеспечивающее лучшие показатели фармакокинетики, не снижают ингибирующие протеинопатию свойства, по крайней мере, по критерию числа TDP43 цитоплазматических включений, формируемых в клеточных культурах.

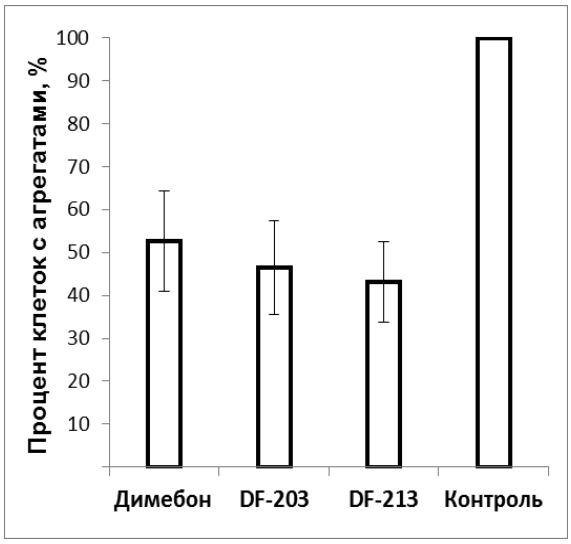

Рис. 7. Содержание 5T TDP43 цитоплазматических включений в присутствии Димебона и его производных в дифференцированных по нейрональному типу культурах SH-SY5Y после трансфекции.

Конечная концентрация Димебона, DF-203 и DF-21 - 25 мкМ.

Исследование молекулярно-клеточного механизма ингибирующего действия Димебона. К настоящему времени получено уже достаточно много данных, подтверждающих нейропротекторный эффект Димебона и ряда других соединений группы карболинов. В последнее время получены доказательства, что Димебон способен активировать компоненты внутриклеточных систем контролируемой деградации белков, в частности, аутофагосомной системы (Steel et al, 2012; Prashant et al., 2012). Аутофагия регулируется различными сигнальными путями: через каскад митоген-активируемых протеинкиназ (МАП), PI3K-Akt-mTOR и др. (Sridharan et al., 2011). В ряде случаев причиной развития протеинопатии с последующей нейродегенерацией

является именно утрата клеткой способности удалять из функционального пространства изменившие конформацию и приобредшие патогенные свойства белки и формируемые ими нерастворимые белковые включения (Hara et al., 2006).

Нами был исследован эффект Димебона на уровень транскрипции гена *ATG5*, кодируещего белок Atg5, который сначала ковалентно связывается с Atg12, затем к комплексу присоединяется Atg16 и, таким образом, формируется убиквитин-подобная конъюгированная структура, имеющая высокий тропизм к аутофагосомной мембране. Согласованные изменения уровня экспрессии всех трех составляющих комплекса могут служить достоверным индикатором активации программы аутофагии, поэтому нами было проанализировано действие Димебона и на другие два элемента комплекса – ATG12 и ATG16. На Рис. 8 представлены результаты анализа относительных уровней экспрессии генов ATG5, ATG12 и ATG16, указывающие на то, что Димебон модулирует экспрессию всех трех этих генов в SH SY5Y культуре, и выявленный нами синхронный рост в уровнях транскрипции ATG5, ATG12 и ATG16 может являться свидетельством стимуляции аутофагии.

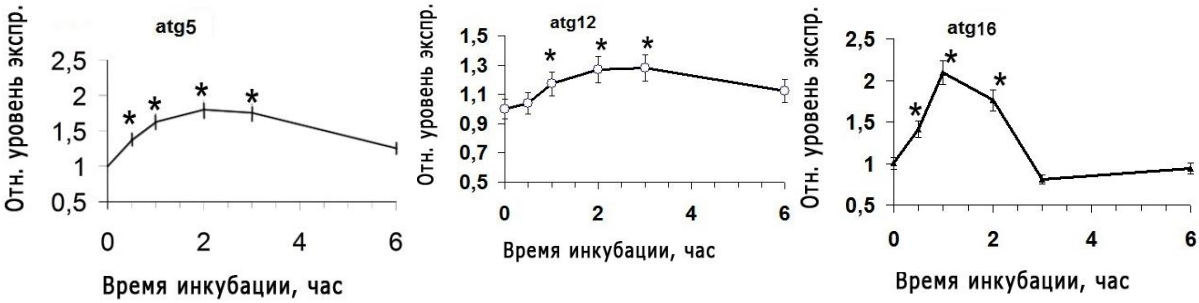

Рис. 8. Активация экспрессии генов ATG5, ATG12 и ATG16 в культуре клеток SH SY5Y **под действием Димебона.**
Результаты количественной ПЦР в реальном времени с матриц кДНК, полученных методом обратной транскрипции тотальных РНК.
**Достоверные различия в сравнении с базовым уровнем, $p<0.05$, применяемые критерии: критерий Стьюдента (t-тест).*

Важным элементом механизма нейропротекторного действия Димебона является его влияние на функциональное состояние митохондрий (Zhang et al., 2010). Нами была исследована экспрессия

гена IRGM. Кодируемый им белок обладает ГТФ-азой активностью, активирует деление митохондрий, и участвует в процессах активации аутофагии (Singh et al., 2010). Мы показали, что Димебон стимулирует экспрессию IRGM и это хорошо согласуется с пиком фосфорилирования киназы p38 (Рис.9).

Рис. 9. **Активация экспрессии гена IRGM в культуре клеток SH SY5Y под действием Димебона.**

*Результаты количественной ПЦР в реальном времени. *Достоверные различия в сравнении с базовым уровнем, уровень значимости $p<0.05$, применяемые критерии: критерий Стьюдента (t-тест).*

Киназы p38 и ERK1/2 могут быть активированы одновременно, при этом p38 способна ингибировать аутофагию, вызванную активацией ERK1/2 (Corcelle et al., 2007). В нашей клеточной системе Димебон вызывает быстрое повышение содержания фосфорилированнных форм киназ ERK1/2 и p38 (Рис. 10) и имеет не только кратковременный стимулирующий эффект, но также может стимулировать длительные эффекты.

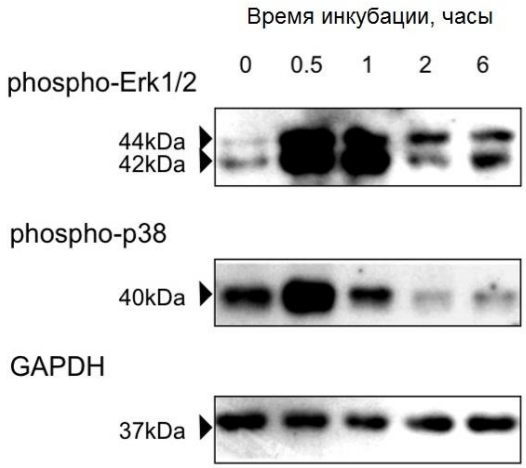

Рис. 10. Анализ уровня фосфорилирования Erk1/2 и p38 в клеточной линии SH-SY5Y методом иммуноблоттинга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе представлены данные по созданию клеточной модельной системы, воспроизводящей основные элементы молекулярного патогенеза TDP43-протеинопатии и использованию ее для отбора нейропротекторных препаратов, необходимых при разработке методов патогенетической терапии НДЗ, основным молекулярно-патологическим звеном которых является агрегация белка TDP43. В ходе исследования были созданы генетические конструкции, кодирующие патогенные формы белка TDP43 человека и отобрана T5 TDP43 форма, наиболее адекватно воспроизводящая в клеточной культуре нейробластомы человека SH-SY5Y образование TDP43-реактивных структур, имитирующих патогистологические включения выявляемые в аутопсиях у больных с рядом форм ФТЛД и БАС.

В созданной модельной системе исследован ингибирующий прогрессию протеинопатии эффект Димебона и двух его производных на процессы формирования TDP43-реактивных включений и показано, что как в недифференцированных, так и в дифференцированных по нейрональному типу клетках SH-SY5Y, все три исследованных соединения снижают количество TDP43-реактивных включений с одинаковой эффективностью. Получены данные, свидетельствующие об активации Димебоном аутофагосомной системы: повышение экспрессии генов, кодирующих маркерные белки аутофагии ATG5, ATG12 и ATG16 в присутствии Димебона и стимуляция фосфорилирования ERK1/2 и p38 киназ, вовлеченых в механизм регуляции аутофагосомной системы.

Создание адекватных модельных систем для изучения молекулярных механизмов развития ФТЛД и воспроизведения наиболее важных аспектов патогенеза данного заболевания является необходимым условием прогресса в данном направлении и оптимизации направленного поиска соединений для разработки патофизиологической терапии ФТЛД.

ВЫВОДЫ:

1. Создана панель экспрессионных плазмид для исследования способности различных форм белка TDP43 человека к образованию в культивируемых клетках цитоплазматических включений, сходных с включениями, обнаруживаемыми у больных с наследственными формами ФТЛД и БАС.
2. В созданной клеточной модели TDP43-протеинопатии исследован эффект Димебона и двух его производных, DF-203 и DF-213, на процессы формирования и стабильности TDP43-реактивных включений. Показано, что как в недифференцированных, так и в дифференцированных по нейрональному типу клетках SH-SY5Y, все три исследованных соединения снижают количество TDP43-реактивных включений с одинаковой эффективностью.
3. Показано, что в присутствие Димебона в клеточной культуре SH-SY5Y активируется экспрессия генов, кодирующих маркерные белки аутофагии ATG5, ATG12 и ATG16.
4. Показано, что Димебон стимулирует фосфорилирование ERK1/2 и p38 киназ, которые вовлечены в механизм регуляции аутофагосомной системы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., **Khritankova I.V**., Afanasieva M.A., Tarasova T.V., Alentov I.I., Buchman V.L., Ninkina N. Dimebon slows progression of proteinopathy in γ-synuclein transgenic mice. Neurotoxisity Research. - 2011. - P.33-42.
2. Устюгов А.А., Шелковникова Т.А, Кохан В.С., **Хританкова И.В.,** Петерс О., Бухман В.Л., Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. Димебон снижает содержание агрегированных форм амилоидогенного белка в детергент-нерастворимых фракциях *in vivo*. Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. - 2011. - Т. 152(12). - С. 675-679.
3. **Хританкова И.В**., Кухарский М.С., Лыткина О.А., Бачурин С.О., Шоринг Б.Ю. Активация компонентов аутофагосомной системы под действием димебона в культуре клеток нейробластомы человека. Доклады академии наук. - 2012. – № 4. - С. 471-473.
4. Т.А.Шелковникова, А.А.Устюгов, В.С.Кохан, Т.В.Тарасова, В.К.Медведева, И.В.Хританкова, С.О.Бачурин, Н.Н.Нинкина Исследование молекулярных мишеней Димебона с использованием линии трансгенных мышей, Ж.Биомедицинской химии, Supplement Series B Biomedical Chemistry (eng). - 2013. - Т.7, №.1. - С. 153-158.

Тезисы

1. Нинкина Н.Н, Шелковникова Т.А., **Хританкова И.В.,** Устюгов А.А. Направленный поиск инновационных лекарственных препаратов и эффективной терапии форм фронтотемпоральной деменции с нарушенным метаболизмом TDP43 на основе оригинальной генетической модели – линии трансгенных мышей с повышенной экспрессией мутантной формы TDP43 белка человека. Сборник тезисов докладов конференции «Фундаментальные науки – медицине», Россия, Москва, 2010. – Москва. - С.156.
2. Shelkovnikova TA, **Khritankova IV**, Buchman VL, Bachurin SO, Ninkina NN Effects of ALS-associated mutations on the in vivo aggregation and toxicity of human FUS/TLS protein. Book of abstracts of The EMBO Meeting, September 3-7, 2010. - Barcelona, Spain. - P.171.
3. Шелковникова Т.А., **Хританкова И.В**., Нинкина Н.Н, Бухман В.Л., Бачурин С.О. Свойства мутантных вариантов белков FUS и TDP43. Сборник тезисов Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино, Россия, 18-22 апреля 2011. – Пущино. - С.10.
4. Ustyugov A., Ninkina N., Shelkovnikova T., **Khritankova I.,** Bachurin S. Dimebon prevents proteinopathy-induced neurodegeneration in gamma-synuclein transgenic mice. 10th International Conference on Alzheimer's

and Parkinson's Diseases (AD/PD 2011), March 6-10, 2011. - Barcelona, Spain. - P.79.

5. Shelkovnikova T.A., **Khritankova I.V**., Ustyugov A.A., Buchman V.L., Ninkina N.N., Bachurin S.O. Transgenic and cellular models of neurodegeneration associated with protein aggregation in the studies of potential neuroprotectors. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 14 - 18, 2011. Abstract number A-364-0015-00069.
6. **I.V. Khritankova,** O.A. Lytkina, M.S. Kukharskiy Dimebon stimulates activation of autophagy-related events in cell culture. «Эффективные инструменты современной науки - 2012», 27 апреля – 5 мая 2012 года. - г. Прага, Чехия. – Прага. - С.17-20.
7. С.О. Бачурин, И.В. **Хританкова**, М.С. Кухарский, А.А. Устюгов Направленный поиск инновационных лекарственных препаратов, препятствующих развитию протеинопатий в мозге. Конференция по Программе «Фундаментальные науки – медицине», раздел «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы», 1-2 ноября 2012 года. - г. Москва. – Москва, 2012. - С.85-86.
8. **И.В.Хританкова** Патофизиология И.В.Хританкова Исследование влияния Димебона и на активацию киназных каскадов в культуре клеток нейробластомы человека, «Актуальные проблемы патофизологии-2013», апрель 2013 года. – г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург. - С.128-130.

Developing of a model of TDP43-proteinopathy and its application for studies of the mechanism of action of neuroprotective drugs

This thesis presents data on the development of the cell model system reproducing the main elements of the molecular pathogenesis of TDP43-proteinopathy and its use for selection of neuroprotective drugs that can be employed for developing methods of pathogenetic therapy of neurodegeneration with aggregation of the TDP43 protein as a basic molecular element of pathology. The study created genetic constructs encoding a pathogenic form of human TDP43-protein, a T5 variant, that most accurately reproduces pathology in patients with different forms of FTLD and ALS.

This model was used for studying the inhibitory effect of Dimebon and its two derivatives on proteinopathy progression by the aggregation of mutant TDP43 and showed that all three compounds reduce the number of TDP43-inclusions with equal efficiency. Obtained data demonstrated the activation of autophagosome system by Dimebon: increased expression of genes, encoding autophagy marker proteins ATG5, ATG12 and ATG16 and stimulation phosphorylation of ERK1/2 and p38 kinases, involved in the mechanism of autophagosome system regulation.

The development of adequate model systems for studying molecular mechanisms of FTLD and recapitulating the most important aspects of the pathogenesis of this disease is a necessary condition for progress in this direction, and optimization of compounds search for developing pathophysiological therapy of FTLD.