На правах рукописи

Кухарский Михаил Сергеевич

Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук

Научные консультанты:
Скворцова Вероника Игоревна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель Федерального медико-биологического агентства России
Нинкина Наталья Николаевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук

Официальные опоненты:
Абрамов Андрей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной физиологии и патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»
Анохин Константин Владимирович, доктор медицинских наук, академик РАН, профессор, директор Института перспективных исследований мозга Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Ярыгин Константин Никитич, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится «____»_____ 2021 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.04 при ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова по адресу: 117997 Москва, ул. Островитянова, 1
С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова по адресу: 117997 Москва, ул. Островитянова, 1 и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «____»_____ 2021 г.
Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук Леонова Людмила Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования, степень ее разработанности

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание (НДЗ), при котором селективно повреждаются двигательные нейроны. Основными клиническими проявлениями являются прогрессирующая мышечная слабость и параличи, что в конечном итоге приводит к гибели больного в среднем через 3-5 лет после дебюта симптоматической стадии заболевания. Распространенность БАС в Европе и Америке составляет примерно 1.5-3 случая на 100 000 населения. В России этот показатель несколько ниже – 1.1-1.3 на 100 000 населения. Большинство случаев БАС являются спорадическими формами с неизвестной этиологией, а около 5-10% случаев составляют семейные формы, для многих из которых выявлены мутации, в большинстве случаев имеющие аутосомно-доминантное наследование. К настоящему времени выявлено уже более 40 генов, ассоциированных с БАС. Кодируемые ими белки и некодирующие РНК вовлечены в такие клеточные процессы как белковый гомеостаз, регуляция динамики цитоскелета, метаболизм РНК и др. На данный момент не существует эффективного лечения БАС. Лекарственные препараты, используемые в клинической практике, а таких рекомендовано всего два – рилузол и эдаравон, не способны существенно изменить течение заболевания или улучшить качество жизни больного. В качестве основных причин, замедляющих успешную разработку патогенетической терапии, выделяют недостаток фундаментальных знаний о патогенезе БАС и, как следствие, небольшое количество потенциальных мишеней, недостатки существующих модельных тест-систем, применяемых для тестирования соединений, а также нехватку хорошо валидированных биомаркеров для проведения клинических испытаний. С развитием новых методов анализа и моделирования патологических процессов, наблюдаемых при развитии БАС,

появляются новые обнадеживающие результаты, которые могут послужить основой для разработки терапевтических подходов для коррекции заболевания.

Точные механизмы, посредством которых различные белки при нарушении их функций могут приводить к гибели двигательных нейронов и развитию фенотипа БАС, до конца непонятны и, по-видимому, могут различаться в зависимости от типа белка. Кроме того, вовлеченность таких белков в различные метаболические каскады в клетке значительно усложняет картину патогенеза и установление механизмов, запускающих патологический процесс. Относительно недавно была охарактеризована новая группа РНК-связывающих белков, ассоциированных с БАС, к которым относятся TDP-43, FUS, TAF15, TIA-1 и др. Все эти белки участвуют в метаболизме РНК и в образовании различных рибонуклеопротеиновых комплексов, прежде всего параспеклов и стресс-гранул, которые играют важную роль в механизмах адаптации нейронов к стрессовым условиям. Эти данные значительно расширили современные представления о патогенезе БАС и привели к формированию новой концепции, согласно которой патологическая агрегация белков такого типа может приводить к формированию токсичных для клетки олигомерных и фибриллярных форм. Более того, эти белки теряют свою нормальную функцию, что приводит к недостаточности важных для метаболизма клетки молекул и даже к состоянию полной депривации, что в конечном итоге также ведет к гибели нейронов. Нервные клетки, в особенности двигательные нейроны, являются особо чувствительными к таким нарушениям. Большинство вопросов, связанных с этиологией, патогенезом и механизмом избирательной гибели двигательных нейронов при БАС остаются неразрешенными. В частности, не до конца понятен механизм патологического действия РНК-связывающих белков в двигательных нейронах и какое значение при этом имеют образующиеся РНК-содержащие белковые комплексы – защитное или патогенетическое. Поэтому исследование молекулярных патогенетических механизмов, связанных с формированием рибонуклеопротеиновых комплексов и

изменением метаболизма РНК, является исключительно актуальной научной задачей.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования являлось изучение роли нарушения формирования и функционирования рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза.

Были поставлены следующие задачи:

- Провести анализ аутопсийного материала спинного мозга больных со спорадическими и семейными формами БАС на наличие в нейронах внутриядерных рибонуклеопротеиновых комплексов – параспеклов.
- С использованием клеточных моделей определить взаимосвязь между патологией белка TDP-43 и образованием параспеклов, исследовать механизмы активации сборки параспеклов.
- Охарактеризовать роль параспеклов, которую они играют в нервных клетках при развитии TDP-43-протеинопатии.
- Провести патогистологическое, биохимическое и поведенческое исследование нервной системы мышей с генетическим нокаутом длинной некодирующей РНК Neat1 (линия *Neat1*$^{-/-}$).
- Выполнить анализ транскриптома (РНКсек) коры головного мозга *Neat1*$^{-/-}$ мышей, выявить гены с измененными уровнем экспрессии и альтернативным сплайсингом, описать их функциональное значение.
- Охарактеризовать агрегационные свойства БАС-ассоциированного белка CREST в клеточных культурах. Оценить влияние изменения уровня экспрессии нативного CREST и его мутантных форм на морфологию *in vitro* культивируемых нейронов.

- Выявить возможное участие белка CREST в механизмах формирования рибонуклеопротеиновых комплексов – параспеклов и стресс-гранул, исследовать взаимодействие CREST с белками TDP-43, FUS и TAF15, входящими в состав комплексов и проявляющими склонность к агрегации.

Научная новизна

В представленной работе обобщены данные масштабного оригинального исследования по выявлению патологических механизмов, в которые вовлечены белки, склонные к агрегации и ассоциированные с нейродегенеративными процессами, характерными для БАС. Впервые было показано, что в аутопсийном материале больных как со спорадическими, так и с семейными формами БАС в нейронах спинного мозга обнаруживаются внутриядерные структуры – параспеклы, которые формируются на основе длинной некодирующей РНК Neat1 в комплексе с белками. На основании полученных в диссертационном исследовании данных был предложен механизм, запускающий формирование параспеклов, в основе которого лежит нарушение компартментализации и потеря ядерной функции белка TDP-43 вследствие его агрегации, что приводит к нарушению биогенеза miRNA и активации сигнального пути интерферонов I типа. При этом образование параспеклов в нервных клетках играет протекторную роль и препятствует апоптотической гибели.

В данной работе впервые была исследована роль нарушения функции длинной некодирующей РНК Neat1 в нейропатологии с использованием линии мышей с генетическим нокаутом Neat1 и показано, что Neat1 может выступать в качестве независимого патогенетического фактора ряда НДЗ и психических расстройств. Было установлено, что отсутствие Neat1 у модельных животных изменяет возбудимость нейронов и ведет к нарушению адаптивного ответа на стрессовые стимулы на уровне целого организма. Впервые было выполнено исследование транскриптомов тканей коры головного мозга нокаутных по гену

Neat1 мышей и выявлены группы генов, экспрессия и сплайсинг которых изменяются при отсутствии Neat1. Биоинформатический анализ этих генов позволил определить метаболические пути, задействованные в клеточном ответе на нарушение функции Neat1 в нервной системе.

В диссертационном исследовании впервые была установлена роль другого БАС-ассоциированного белка – CREST – в формировании рибонуклеопротеиновых комплексов в клеточных культурах. Было показано, что при повышении уровня экспрессии CREST и накоплении белка в клетке он проявляет высокую склонность к агрегации и вовлекается в образующиеся параспеклы в ядре и стресс-гранулы в цитоплазме. При агрегации CREST взаимодействовал с другими белками параспеклов, в особенности с белком FUS, нарушая нормальный физиологический путь формирования параспеклов. Такой эффект был выявлен как для нативного белка, так и для мутантных форм CREST. Это были пионерские работы по исследованию участия CREST в механизмах формирования параспеклов и нарушения этого процесса при патологических состояниях.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные вносят значительный вклад в понимание патогенеза бокового амиотрофического склероза и родственных заболеваний. Описание механизмов, посредством которых белки, участвующие в метаболизме РНК и входящие в состав рибонуклеопротеиновых комплексов, оказывают свое патогенное действие, позволяет существенно расширить современные представления о развитии и прогрессии заболевания, а также выявить ключевые звенья этого процесса, воздействие на которые позволит подавить или остановить нейродегенеративный процесс. В патогенезе БАС, наряду с патологической белковой агрегацией, важное значение отводится нарушению функций РНК, с которыми взаимодействуют эти белки, в том числе некодирующим РНК, выполняющих функцию регуляции экспрессии генов. Изучение последствий

нарушений в функционировании некодирующих РНК в мозге, наряду с возможным влиянием на белки-партнеры, с которыми эти РНК взаимодействуют в клетке, позволило пролить свет на принципиально новые фундаментальные аспекты нейрофизиологии. Более того, результаты проведенных исследований позволяют наметить новые молекулярные мишени для воздействия на процессы регуляции функций нервной системы в норме и при патологии, которые могут быть использованы для разработки новых терапевтических подходов в лечении тяжелых и социально-значимых заболеваний человека.

Методология и методы диссертационного исследования

В диссертационной работе использовались методы молекулярно-генетического, биохимического, электрофизиологического и гистологического анализа клеток и тканей. Основными объектами исследования являлись клетки, культивируемые *in vitro*, кроме этого использовался аутопсийный материал от больных БАС, а также ткани, полученные от генетически модифицированных и контрольных мышей. Для анализа транскриптома нервной ткани нокаутной линии мышей *Neat1*$^{-/-}$ использовался метод РНК секвенирования с последующим биоинформатическим анализом данных.

Положения, выносимые на защиту

1. В аутопсийном материале больных со спорадическими и семейными формами БАС выявлены внутриядерные включения – параспеклы, сформированные на основе длинной некодирующей РНК (днРНК) Neat1.

2. Показано, что агрегация белка TDP-43 в цитоплазме и, как следствие, потеря его функций в ядре приводят к активации сборки параспеклов в культивируемых клетках. При этом важной составляющей механизма молекулярного патогенеза TDP43-протеинопатии является нарушение биогенеза микроРНК и активация сигнального пути интерферонов I типа.

3. Подробная характеристика линии мышей с генетическим нокаутом Neat1 показала, что нарушение функции данной днРНК приводит к изменению поведенческих реакций в ответ на внешние стрессовые стимулы и сопровождается повышенной возбудимостью нейронов.
4. Потеря функции Neat1 влияет на экспрессию и альтернативный сплайсинг ряда генов, связанных, в частности, с работой синапсов и процессингом РНК.
5. Вовлеченный в патогенез БАС и обладающий высокой склонностью к агрегации белок CREST участвует в образовании стресс-гранул и влияет на механизмы формирования параспеклов. Показано, что CREST напрямую взаимодействует с белком FUS, также ассоциированным с БАС.
6. Повышение уровня как нативного CREST, так и его мутантных форм подавляет рост и ветвление нейритов в первично-культивируемых нейронах гиппокампа.

Личный вклад соискателя

Планирование общей концепции исследования и постановка целей и задач выполнена автором в совместной работе с научными консультантами. Ключевая экспериментальная работа и анализ полученных результатов были выполнены автором или под его руководством. Работы по анализу аутопсийного материала, полученного от пациентов с БАС, а также исследования, связанные с получением генетических конструктов, кодирующих целевые белки, проводились совместно с Т.А. Шелковниковой (лаборатория проф. В.Л. Бухмана, Кардифф, Великобритания).

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: XXVI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2020» (Санкт-

Петербург, Россия, 2020); Школа молодых ученых ИМБ РАН (Москва, Россия, 2020); II Объединенный научный форум. VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи–Дагомыс, Россия, 2019); Международная конференция «Инновационные исследования в области биомедицины» памяти академика В.Н. Ярыгина. (Москва, Россия, 2019); I Международная (II Всероссийская) конференция «Реальный путь от научных разработок до лекарственных средств». (Москва, Россия, 2018); XIII Международная (XXII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. (Москва, Россия, 2018); 28th International symposium on ALS/MND, (Boston, USA, 2017); 2nd International symposium on stress-associated RNA granules in human disease and viral infection, (Heidelberg, Germany, 2017); Neurotoxicity society and International neurotoxicilogy association, (Florianopolis, Brazil, 2017); European Network for the Cure of ALS meeting, (Milan, Italy, 2016).

Реализация и внедрение полученных результатов в практику

Материалы диссертации используются в учебном процессе на кафедре общей и клеточной биологии медико-биологического факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 40 научных работ, из них 23 научные статьи, в том числе 10 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации материалов диссертационных работ, 12 статей в зарубежных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных

реферативных базах данных Scopus и Web of Science, 14 тезисов докладов научных конференций, 3 патента.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методов и материалов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 311 страницах, содержит 5 таблиц и 65 рисунков. Список цитируемой литературы включает 781 наименование, из них 11 в отечественных и 770 в зарубежных научных изданиях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Культуры клеток SH-SY5Y, HEK293, COS7 и MCF7 велись на среде DMEM или смеси DMEM и F12 (1:1), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Для дифференцировки в нейрон-подобные клетки SH-SY5Y культуры выращивали на круглых покровных стеклах, покрытых поли-L-лизином (Sigma, США), в расширенной среде DMEM/F12 (ADF)/Neurobasal A, содержащей 10 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma, США), B27 (Life Technologies, США) и 10 нг/мл BDNF (Miltenyi, Германия) в течение 6 дней.

Для получения первичных культур проводили диссекцию гиппокампов мышей на 3 постнатальный день, инкубировали в растворе 0.1% трипсина в солевом растворе Хенкса (HBSS) с 10 мМ HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) и 1мМ пирувата в течение 40 минут. Механическую диссоциацию проводили в растворе среды Neurobasal A, содержащей 50 ед/мл пенецилина/стрептомицина, 0.2% бета-меркаптоэтанола, 500 мкМ L-глютамина и 10% лошадиной сыворотки, далее центрифугировали 5 минут при 15000 об/мин. Осадок ресуспендировали в свежеприготовленной среде и наносили на покровные стекла, покрытые поли-L-лизином. На следующий день среду меняли на новую без

сыворотки и с добавлением B27. Полученную культуру трансфецировали на 5 день *in vitro* (DIV) с использованием Lipofectamine2000, согласно инструкции производителя, за исключением того, что время инкубации было снижено до 1 ч. Клетки фиксировали и окрашивали через 48 часов после трансфекции. Все используемые реагенты были произведены компанией Invitrogen, Life Technologies, США.

Исследования образцов тканей, полученных от пациентов, проводились в сотрудничестве с лабораторий проф. В.Л. Бухмана (Кардифф, Великобритания). Образцы спинного мозга в виде парафиновых срезов толщиной 7 мкм от пациентов с клинически и патогистологически подтвержденным БАС, а также неврологически здоровых индивидуумов были получены из Sheffield Brain Tissue Bank и MRC London Neurodegenerative Diseases Brain Bank (Institute of Psychiatry, King's College London). У всех участников было получено согласие на взятие аутопсийного материала. Патогистологические исследования были выполнены в согласии с локальными и национальными правилами этического комитета. Для *in situ* гибридизации (RNA-FISH) срезы кипятили в цитратном буфере 10 минут, отмывали в 2xSSC (Saline Sodium Citrate), приготовленом на воде, обработанной DEPC (diethylpyrocarbonate), далее инкубировали с пробой NEAT1 (Stellaris® FISH, Biosearch Technologies), растворенной в гибридизационном буфере (10% формамид/2xSSC, 5 мкл пробы в 200 мкл буфера на слайд под покровное стекло 24 × 60 мм), во влажной камере при 37°C в течение ночи. Ядра окрашивали DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindole). Тотальную РНК выделяли из замороженных толстых срезов и проводили синтез кДНК набором Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, США).

Получение линии нокаутных мышей *Neat1*$^{-/-}$ было описано ранее Nakagawa S. с соавт. Для перевода данной линии на генетический фон C57BL/6J (получены из Charles River, Великобритания) проводили шесть раундов возвратного

скрещивания. Гомозиготных мышей (*Neat1*$^{-/-}$ и *Neat1*$^{+/+}$) получали путем интеркросса гетерозигот (*Neat1*$^{+/-}$). Животные содержались в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 часов светлого, 12 часов темного времени) со свободным доступом к воде и корму. Генотипирование проводили методом ПЦР и кПЦР. Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Министерства здравоохранения №199н от 1.04.2016 г. При заборе тканей животных подвергали медикаментозной эвтаназии путем внутрибрюшинного введения авертина в дозе 0,3 мг/г, после чего проводили транскардиальную перфузию ФСБ, затем 4% раствором ПФА. Образцы тканей или органы фиксировали и далее получали гистологичские препараты по стандартной методике.

Для выделения тотальной РНК из образцов тканей или культур клеток использовали набор RNeasy mimi kit (Qiagen, Германия) или GenElute total RNA kit (Sigma, США). 500 нг тотальной РНК использовали для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью обратной транскриптазы SuperScript® III или SuperScript® IV (Invitrogen, Life Technologies, США) и гексамерного рандом-праймера (Promega, США) согласно протоколу производителя. Для анализа miRNA выделение проводили с помощью QIAzol (Qiagen, Германия), обратную транскрипцию – набором Qiagen miScript II RT Kit. Количественную ПЦР (кПЦР) в реальном времени проводили с использованием полученной кДНК на амплификаторе ABI StepOne™, результаты анализировали программным обеспечением StepOne™ Software v2.0 (Applied Biosystems, Life Technologies, США). В качестве внутреннего контроля использовали ген GAPDH мыши. Условия реакции: 95°С 30 сек, 60 °С 30 сек, и 72°С 30 сек, 35 циклов.

Секвенирование РНК (РНКсек) проводилось на базе School of Biosciences Genomics Research Hub (Кардифф, Великобритания). Библиотеки для РНКсек были

приготовлены с использованием TruSeq stranded total kit (Illumina, США). Секвенирование проводилось на приборе Illumina NextSeq500 (длинна чтения: 75 bp; покрытие ~50 million чтений/образец). Прочтения были выровнены относительно мышиного референсного генома (GRCm38) с использованием STAR. Значение FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) было получено с помощью DESeq2. Для визуализации данных использовали IGV browser. Идентификационные номера генов Ensembl IDs были определены с помощью DESeq2 и протестированы на обогащение генетических онтологий (GO) с использованием инструмента DAVID6.8 (https://david.ncifcrf.gov/). Дифференциальный сплайсинг анализировали с использованием Leafcutter pipeline. Обогащение GO и метаболических путей дифференциально сплайсируемыми генами определяли, используя инструмент Enrichr (https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США) и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1 Потеря функции TDP-43 активирует NEAT1 и сборку параспеклов

Параспеклы (paraspeckles) наряду с другими внутриядерными структурами играют важную роль в регуляции разнообразных клеточных процессов. Большой интерес к параспеклам в последнее время появился со стороны исследователей, занимающихся изучением БАС, в связи с тем, что параспеклы содержат белки, вовлеченные в патогенез данного заболевания. Было обнаружено, что у пациентов со спорадическими формами БАС (сБАС, sALS) в двигательных нейронах спинного мозга образуются параспеклы. Мы подтвердили эти результаты, а также дополнительно провели анализ образцов аутопсийного материала, полученного от пациентов с семейными формами БАС. Всего было проанализировано 7 образцов от пациентов с сБАС, 2 с мутациями в гене *TARDBP* (БАС-TDP), 4 случая с

мутациями в локусе *C9ORF72* (БАС-С9) и 6 контрольных образца от здоровых людей (Рисунок 1). Детекция NEAT1 проводилась путем in situ гибридизации РНК (RNA-FISH). В контрольных образцах отсутствовала специфическая окраска на NEAT1 (всего было проанализировано 97 нейронов), тогда как до 40% нейронов в спинном мозге пациентов с разными формами БАС содержали параспеклы (Рисунок 2).

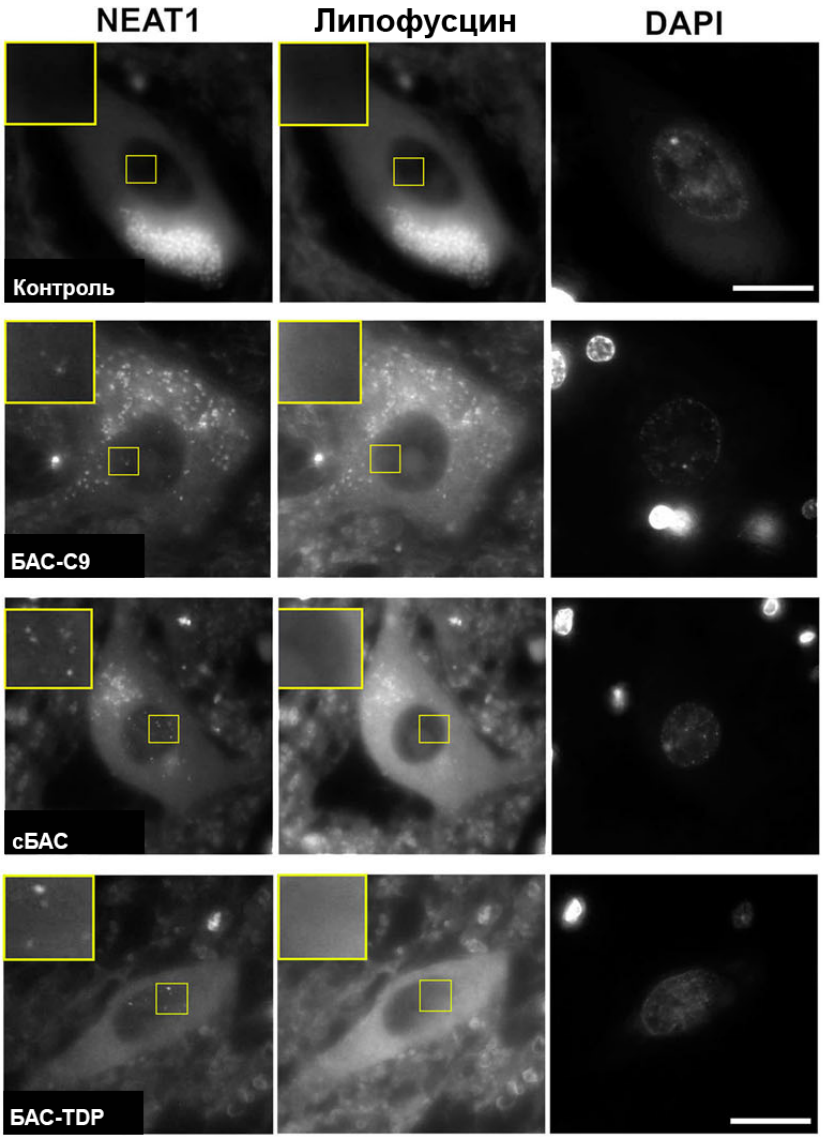

Рисунок 1 – Параспеклы в двигательных нейронах спинного мозга пациентов с различными формами БАС. Окраска методом RNA-FISH гибридизации. Шкала 10 мкм.

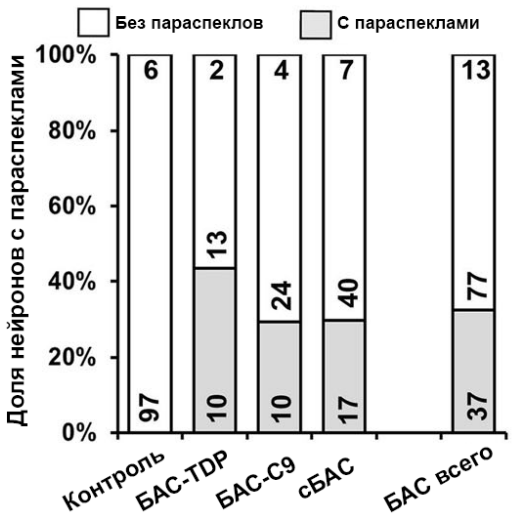

Рисунок 2 – Количество нейронов передних рогов спинного мозга, содержащих параспеклы, у пациентов с разными формами БАС и здорового контроля. Верхняя цифра в столбике соответствует числу проанализированных пациентов, нижняя цифра в каждом секторе столбика соответствует числу нейронов.

Количественный анализ РНК, выделенной из образцов спинного мозга методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (кОТ-ПЦР или qRT-PCR), показал повышение уровня NEAT1 в группе больных в сравнении со здоровым контролем (Рисунок 3А). Далее мы провели лазерную микродиссекцию нейронов передних рогов спинного мозга и проанализировали уровень NEAT1_2 РНК методом кОТ-ПЦР, в результате чего подтвердили более высокую экспрессию данной изоформы в нейронах из аутопсийного материала от пациентов с БАС (Рисунок 3Б). Помимо нейронов у таких пациентов параспеклы также детектировались в большом количестве в клетках глии спинного мозга. Таким образом, формирование параспеклов *de novo* является отличительным признаком развития БАС патологии с первичной или вторичной TDP-43 протеинопатией.

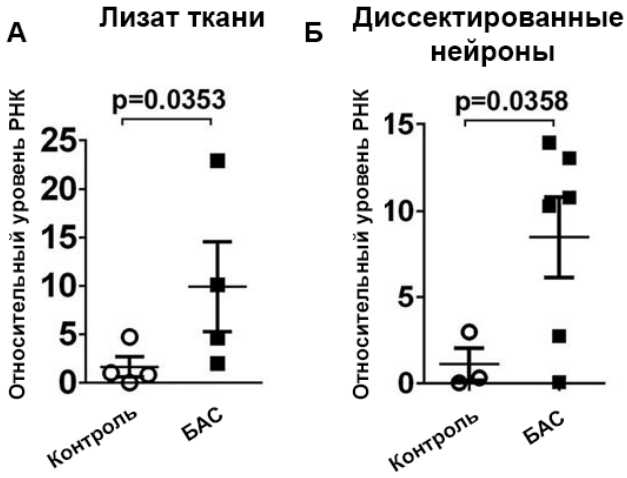

Рисунок 3 – Анализ уровня NEAT1 в спинном мозге (А) и в диссектированных нейронах (Б) методом кОТ-ПЦР. p – уровень значимости при сравнении двух групп.

Для того, чтобы прояснить возможный механизм активации сборки параспеклов при БАС, мы оценили влияние нарушения функции белка TDP-43 на образование параспеклов. Патология этого белка является общим признаком большинства случаев БАС, в том числе ассоциированных с мутациями в белке TDP-43 и с динамической мутацией в локусе *C9ORF72*. Более того, TDP-43 был идентифицирован в качестве одного из белков, входящих в состав параспеклов. При развитии TDP-43-протеинопатии наблюдается перераспределение белка из ядра в цитоплазму, где он накапливается и агрегирует. Поэтому в качестве возможных механизмов развития патологии рассматривается снижение уровня белка в ядре (потеря нормальной функции), а также его токсическое действие в цитоплазме в результате его накопления и агрегации (приобретение функции).

Для моделирования потери функции проводился нокдаун TDP-43 в клеточной культуре с помощью специфической siRNA. Данный метод позволил достичь 90 и 50% снижения уровня TDP-43 в культуре клеток MCF7 и SH-SY5Y соответственно (Рисунок 4А). В результате снижение уровня TDP-43 приводило к значительному увеличению числа параспеклов в ядрах клеток (Рисунок 4Б). Соответственно, в трансфецированных клетках увеличивался и уровень изоформы Neat1_2 необходимой для сборки параспеклов.

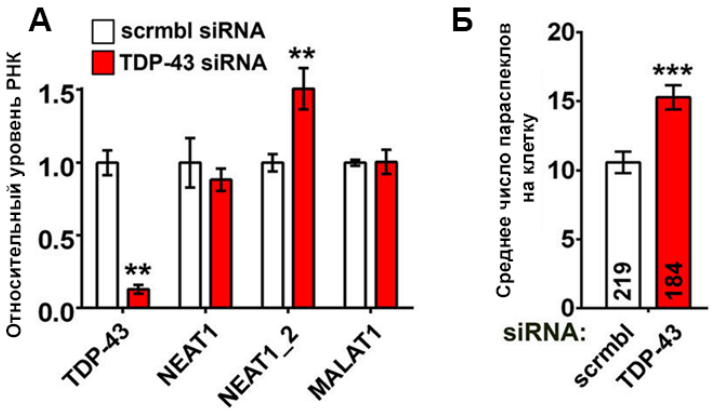

Рисунок 4 – Влияние снижения уровня TDP-43 на экспрессию NEAT1 и MALAT1 в клетках MCF (А), а также число параспеклов (Б). ** - $p<0.01$; *** - $p<0.001$. siRNA – малая интерферирующая РНК, scrmbl siRNA – малая интерферирующая РНК случайной последовательности.

Для сравнения мы измерили уровень другой днРНК MALAT1 (Рисунок 4А), являющейся компонентом ядерных структур спеклов. Уровень данной РНК не менялся при нокдауне TDP-43. На следующем этапе мы оценили эффект цитоплазматического накопления TDP-43 на образование параспеклов. Для этого клетки были трансфецированы плазмидами, кодирующими TDP-43 с удаленным сигналом ядерной локализации (TDP-43 dNLS), а также С-концевой фрагмент белка (TDP-43 CT, aa. 191–414). Для обеих форм характерно цитоплазматическое распределение. Транзиентная экспрессия данных конструктов в культуре клеток не привела к увеличению уровня NEAT1 и сборке параспеклов. TDP-43 dNLS форма образовывала агрегаты в части клеток, однако и это не влияло на NEAT1.

В заключении была смоделирована ситуация одновременного снижения уровня TDP-43 в ядре и его повышения в цитоплазме. Для этого ген *TARDBP* в клетках был редактирован при помощи технологии CRISPR/Cas9. Клетки были трансфецированы плазмидами, кодирующими две независимые пары gRNA, распознающие последовательности с обеих сторон от сигнала ядерной локализации. В результате около 15-20% клеток демонстрировали перераспределение белка TDP-43 в цитоплазму, что, однако, не приводило к усилению сборки параспеклов. Это свидетельствует в пользу того, что для активации сборки парспеклов требуется существенное снижение уровня TDP-43 в ядре.

TDP-43 принимает участие в биогенезе miRNA, поддерживая активность белкового комплекса Микропроцессор (Microprocessor), который в ядре обеспечивает начальные стадии формирования miRNA, тогда как в цитоплазме TDP-43 активирует работу комплекса Dicer, который разрезает pre-miRNA с образованием miRNA дуплекса и далее зрелой miRNA. Более того было показано, что процессинг pri-miRNA в ядре происходит при участии параспеклов путем пространственной организации комплекса Микропроцессор. Мы предположили,

что усиление сборки параспеклов при снижении уровня TDP-43 является компенсаторным механизмом, направленным на поддержание образования miRNA при нарушенной функции TDP-43. Если данная гипотеза верна, сборка параспеклов должна также активироваться в клетках при других нарушениях в образовании miRNA. Для того, чтобы это проверить, мы провели нокдаун в клетках нейробластомы человека (SH-SY5Y) основных ферментов биогенеза miRNA: Drosha, который входит в комплекс Микропроцессор, Dicer, рибонуклеазы pre-miRNA и Ago2, эндонуклеазы комплекса RISC. Мы также проанализировали белок ADAR1, который усиливает образование miRNA. Используемые нами специфические siRNA позволили достичь как минимум 40% снижения уровня экспрессии данных генов. Анализ с помощью RNA-FISH и подсчет числа параспеклов показал, что при снижении уровня каждого из выше приведенных белков сборка параспеклов усиливается (Рисунок 5, Рисунок 6А), что сопровождается повышением уровня общего NEAT1 и в отдельности его длинной изоформы NEAT1_2 (Рисунок 6Б).

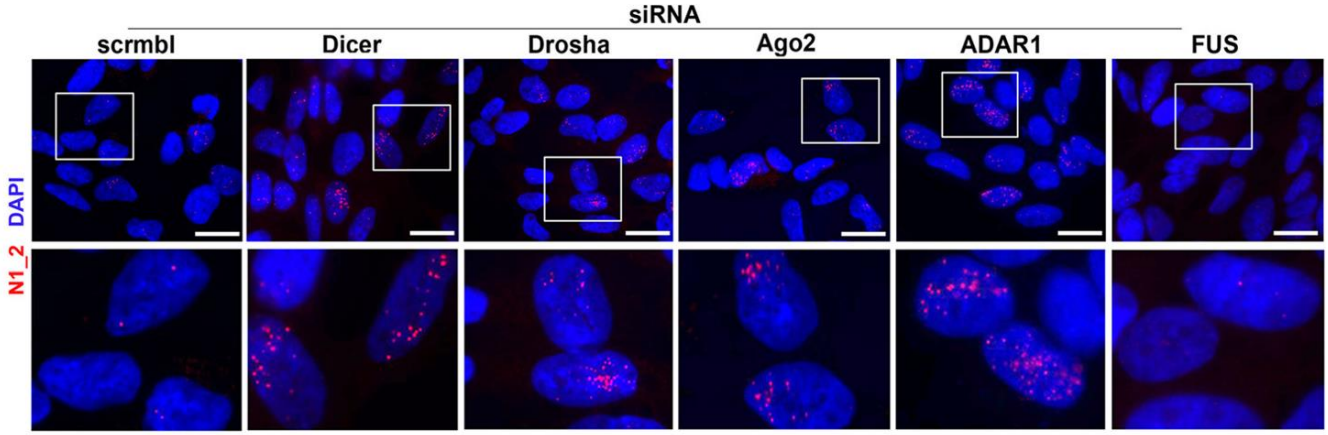

Рисунок 5 – Образование параспеклов в клетках нейробластомы при нокдауне генов участников биогенеза miRNA. FISH окраска на NEAT1_2. Шкала 10 мкм.

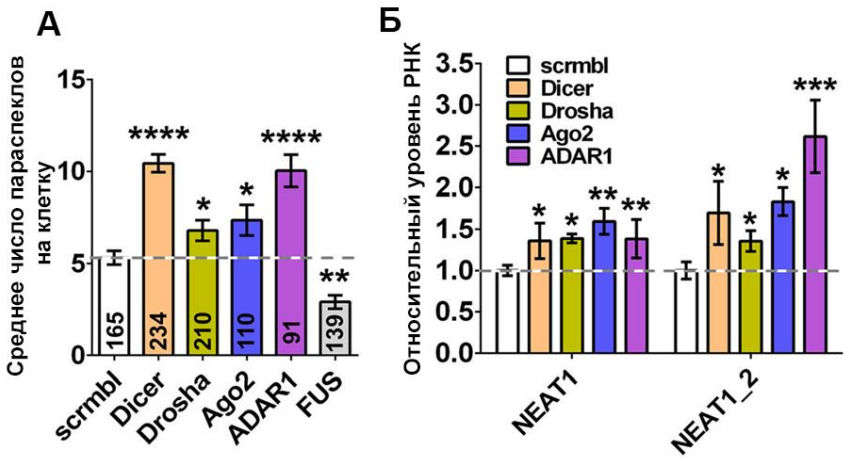

Рисунок 6 – Количественный анализ параспеклов (А) и экспрессии NEAT1 (Б) в клетках нейробластомы при нокдауне генов участников биогенеза miRNA. * - p<0.05; ** - p<0.01; *** - p<0.001; **** - p<0.0001.

Еще один белок, вовлеченный в патогенез БАС – FUS, структурно и функционально близок к TDP-43 и также играет роль в биогенезе miRNA. В то же время FUS является коровым белком параспеклов и необходим для их образования и стабильности. Нокдаун FUS, как и ожидалось, привел к уменьшению числа параспеклов (Рисунок 5, Рисунок 6А). Таким образом, нарушения в биогенезе miRNA приводят к повышению уровня NEAT1 и усилению образования параспеклов в культуре клеток. Это может представлять собой один из возможных механизмов эффекта, который оказывает потеря функции TDP-43 на параспеклы.

Известно, что TDP-43 связывается с длинными РНК транскриптами и регулирует их процессинг. Следовательно, нарушение его функции ведет к накоплению транскриптов, склонных формировать двухцепочечные РНК (dsRNA). В тоже время одной из хорошо охарактеризованной функцией параспеклов является регуляция клеточного ответа на вирусную двухцепочечную РНК. Таким образом, в качестве одного из возможных механизмов влияния потери функции TDP-43 на параспеклы можно рассматривать накопление dsRNA. Процессы биогенеза miRNA сами по себе являются важным источником dsRNA в клетке, и их белковые участники (Dicer, Drosha, ADAR1) ограничивают накопление транскриптов с выраженной вторичной структурой. Для детекции dsRNA нами были использованы широко применяемые для этих целей антитела J2. Нокдаун

TDP-43, Drosha, Dicer или ADAR1 приводил к значительному увеличению числа J2-позитивных клеток (Рисунок 7).

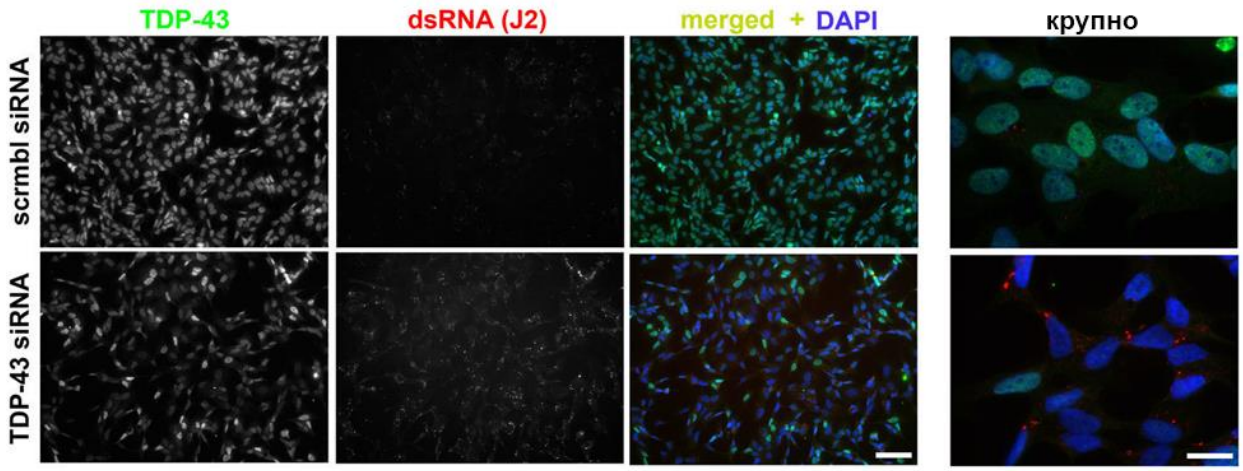

Рисунок 7 – Нокдаун TDP-43 приводит к накоплению dsRNA. Шкала 10 мкм.

Так как клеточный ответ на dsRNA в конечном итоге сходится на I IFN, мы проверили, может ли данный цитокин вносить вклад в процесс активации сборки параспеклов при нарушении функции TDP-43. Сначала мы показали, что интерферон бета (IFNb) – это основной тип I IFN, который индуцируется к культуре клеток нейробластомы при воздействии dsRNA. Далее эксперименты показали, что обработки клеток IFNb самой по себе достаточно, чтобы стимулировать образование параспеклов, хотя эффект носил временный характер (Рисунок 8А, Б). В подтверждение этих результатов, стимуляторы IFNb, такие как синтетический аналог dsRNA Poly(I:C) (polyinosine-polycytidylic acid), который является лигандом TLR3 (Toll Like Receptor 3) рецепторов и бактериальные липополисахариды (LPS), действующие через TLR4 рецепторы, были способны повышать экспрессию NEAT1 и сборку параспеклов. В то же время воздействие через TLR2 рецепторы (обработка зимосаном), которые не влияют на IFNb, не оказывало такого эффекта (данные не представлены). И, наконец, совместная трансфекция клеток siRNA к IFNb и TDP-43 приводила к снижению числа образующихся параспеклов, хотя и не отменяла его совсем (Рисунок 9).

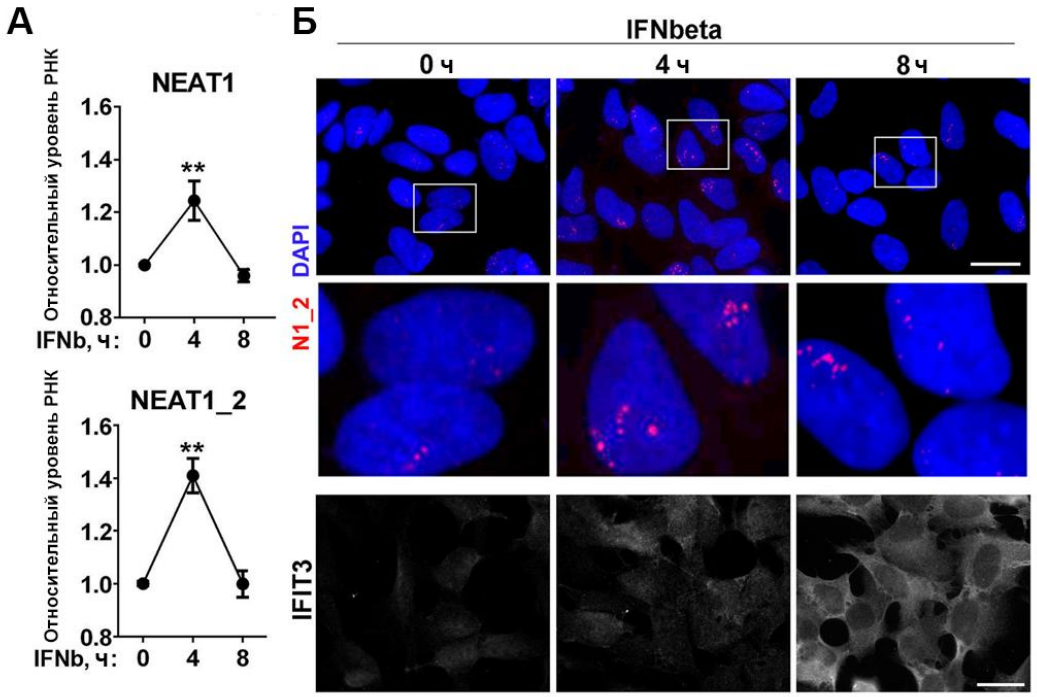

Рисунок 8 – Обработка клеток IFNbeta стимулирует экспрессию NEAT1 (А) и формирование параспеклов (Б). В качестве контроля эффективности действия интерферона использовали активируемый им белок IFIT3. ** - p<0.01. Шкала 10 мкм.

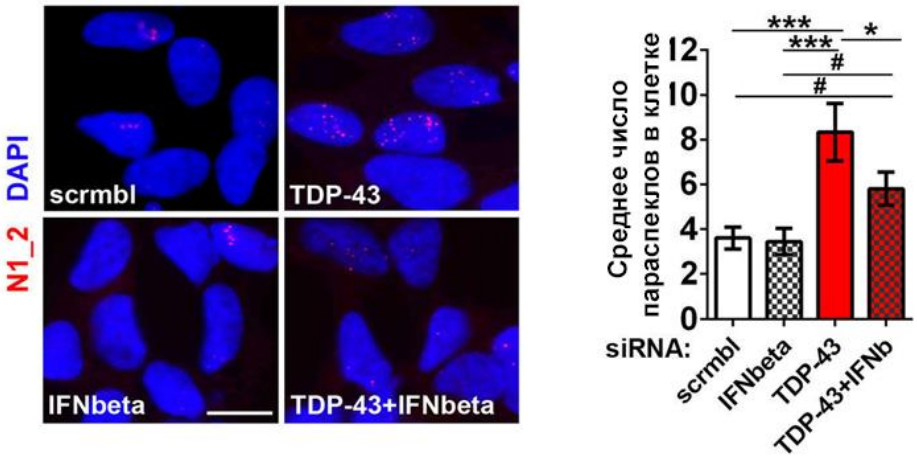

Рисунок 9 – Одновременный нокдаун TDP-43 и IFNbeta частично отменяет эффект нокдауна только TDP-43 на сборку параспеклов. Шкала 10 мкм. * и # - p<0.05; *** - p<0.001.

Можно заключить, что накопление в клетке dsRNA и связанная с этим активация интерферонового ответа (I IFN) представляет собой еще один механизм, посредством которого запускается сборка параспеклов при потере функции TDP-43. Следующей задачей исследования было выяснить, выполняют ли параспеклы защитную роль в клетках при снижении TDP-43. Клетки нейробластомы были трансфецированы siRNA к TDP-43 или Drosha, а также комбинацией siRNA к одному из перечисленных генов и NEAT1. Через 36 часов после трансфекции была проведена оценка цитотоксичности с использованием в качестве маркера апоптотической гибели клеток активированной каспазы-3 (CC3, cleaved caspase-3), а также проапоптотического транскрипционного фактора CHOP (C/EBP homologous protein). В результате нокдауна NEAT1 уровень изоформы NEAT1_2 снижался на 60%, и в большинстве клеток отсутствовали параспеклы. Сам по себе нокдаун TDP-43 или Drosha не приводил к выраженной апоптотической гибели, однако при совместном нокдауне с NEAT1 уровень экспрессии CHOP (Рисунок 10А) и доля гибнущих (положительных на CC3, cleaved caspase-3) клеток резко возрастала (Рисунок 10Б). Эти данные говорят о защитной функции параспеклов против апоптотической гибели клеток при нарушении биогенеза miRNA.

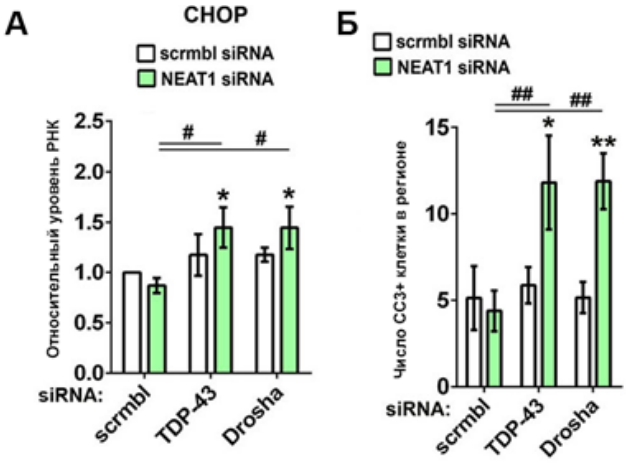

Рисунок 10 – Нокдаун TDP-43, Drosha совместно с NEAT1 приводит к повышению уровня проапоптотического фактора CHOP (А) и, как следствие, к апоптотической гибели клеток (Б). * и # - $p<0.05$; **и ## - $p<0.01$.

2 Характеристика линии мышей нокаутной по гену *Neat1*

Исследования, проведённые ранее, показали, что у мышей уровень Neat1 варьирует в разных тканях и органах, и наибольшее его количество обнаруживается

в желудочно-кишечном тракте, среднее – в легких и почках и наименьшее – в скелетной мускулатуре и мозге. Однако характеристики распределения Neat1 в структурах мозга и его экспрессии в разных типах клеток в пределах ЦНС ранее не проводилось. Для детекции Neat1 мы использовали RNAscope® *in situ* гибридизацию (ISH) с зондом к 5’ концу молекулы. Для исследования использовались образцы головного и спинного мозга, полученные от мышей дикого типа (WT или *Neat1*$^{+/+}$) в возрасте 2 месяцев. В качестве отрицательного контроля использовались образцы от нокаутных мышей такого же возраста (*Neat1*$^{-/-}$). Было обнаружено, что Neat1 распределен более или менее равномерно в головном и спинном мозге мышей, при этом в отдельных клетках наблюдалась более выраженная экспрессия. Основываясь на морфологии и размерах этих клеток, был сделан вывод об их глиальной природе (Рисунок 11А, В). Анатомически наибольший уровень Neat1 обнаруживался в структурах, образованных, главным образом, клетками глии: *corpus callosum*, *fornix* и *glia limitans*. В областях с высокой плотностью нейронов, таких как гиппокамп и гранулярный слой клеток в мозжечке, окраска была значительно менее выраженная в виде небольших точек в ядре. Во многих же клетках ненейрональной морфологии ядро окрашивалось плотно и целиком, что особенно явно наблюдалось в *corpus callosum* (Рисунок 11А, вставка cc). В ряде клеток с очень высокой экспрессией Neat1 наблюдалось также перенуклеарное окрашивание цитоплазмы, что очевидно является артефактом окраски. В нервной ткани *Neat1*$^{-/-}$ мышей обнаруживалась следовая окраска во всех регионах мозга кроме мозжечка, где клетки гранулярного слоя экспрессировали Neat1 (Рисунок 11Б). Совместное окрашивание по Нисслю после проведения *in situ* гибридизации позволило визуализировать крупные светлоокрашенные ядра нейронов, в которых обнаруживалась точечная окраска на Neat1. Плотная окраска обнаруживалась у клеток с небольшими ядрами, часто находящихся вблизи нейронов, т.е. являющихся сателлитными клетками, что типично для астроцитов и олигодендроцитов (Рисунок 11Г).

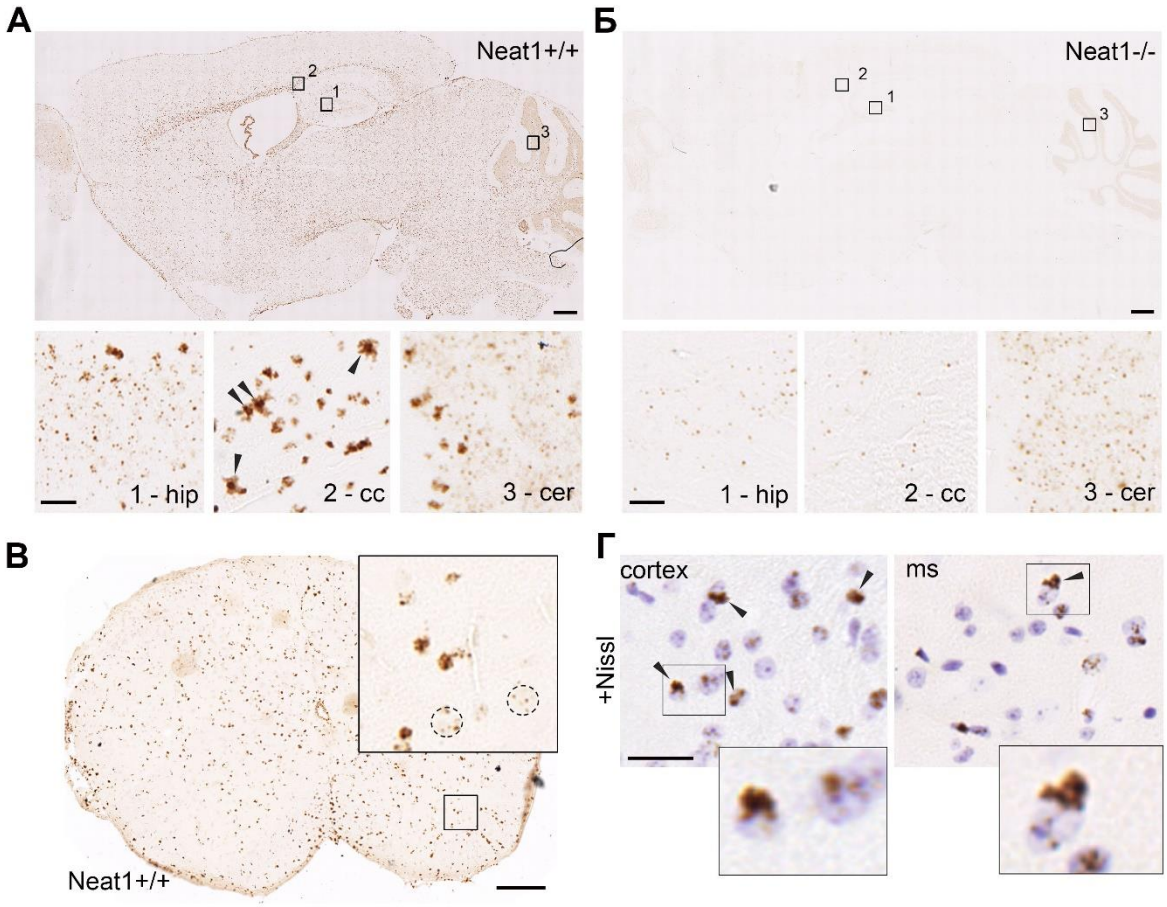

Рисунок 11 – Экспрессия Neat1 (окраска с помощью *in situ* гибридизации) в головном (А) и спинном (В) мозге диких (*Neat1*$^{+/+}$) и в головном мозге нокаутных мышей (*Neat1*$^{-/-}$) (Б). Вставки с большим увеличением соответствуют выделенным участкам на снимке. Стрелками отмечены клетки с избыточным окрашиванием перинуклеарного пространства. Ядра двигательных нейронов в спинном мозге обведены пунктирной линией. Совместное окрашивание по Нисслю и *in situ* гибридизация (Г) в коре (cortex) головного мозга и в спинном мозге (ms). Стрелками обозначены сателлитные клетки. Шкала: на А и Б 200 мкм на основных снимках и 20 мкм на вставках; на В – 100 мкм; на Г – 35 мкм.

В данной работе мы впервые провели анализ экспрессии и распределения Neat1 в ЦНС млекопитающих с использованием *in situ* гибридизации. В результате было показано, что в головном и спинном мозге мышей Neat1 экспрессируется в

большом количестве клеток, и в большей степени – в глиальных клетках. Также, как и в оригинальном исследовании, мы не обнаружили у мышей *Neat1*$^{-/-}$ никаких отклонений в общем состоянии здоровья, физических способностях или основных сенсомоторных функциях в сравнении с дикими мышами, за исключением небольшого снижения массы тела (Рисунок 12А). Однако мы заметили, что несмотря на нормальное поведение при наблюдении мыши в клетке в отсутствии сторонних раздражителей, при контакте с экспериментатором, например, при попытке взять животное в руки, они проявляют признаки панической реакции, гиперподвижности (быстрое передвижение по клетке, прыжки). Данный фенотип постепенно развивался после окончания периода молочного вскармливания и был уже очевиден ко 2-му месяцу жизни.

Для более детального поведенческого анализа нами были подготовлены экспериментальная *Neat1*$^{-/-}$ (n=9) и контрольная *Neat1*$^{+/+}$ (n=11) группы самцов. В течение периода от 3 до 7 месяцев данные животные были протестированы в сформированной батарее поведенческих тестов. Для того, чтобы оценить уровень тревожности, нами был использован тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ или EPM, elevated plus maze). В данном тесте *Neat1*$^{-/-}$ мыши продемонстрировали признаки снижения тревожного поведения, а именно большее число заходов и время, проведенное в открытых рукавах лабиринта (Рисунок 12Б и В соответственно). В то же время повышение данных показателей может быть интерпретировано как импульсивная реакция и/или мотивация избегания. В пользу этой идеи также говорит увеличенное число выглядываний с открытого рукава, когда животное направляет голову к полу и опускает ее ниже уровня поверхности лабиринта, а также снижение числа стоек вытягивания, когда животное вытягивает тело вперед и остается неподвижной некоторое время, оценивая обстановку перед собой, риски и опасности (Рисунок 12Г, Д).

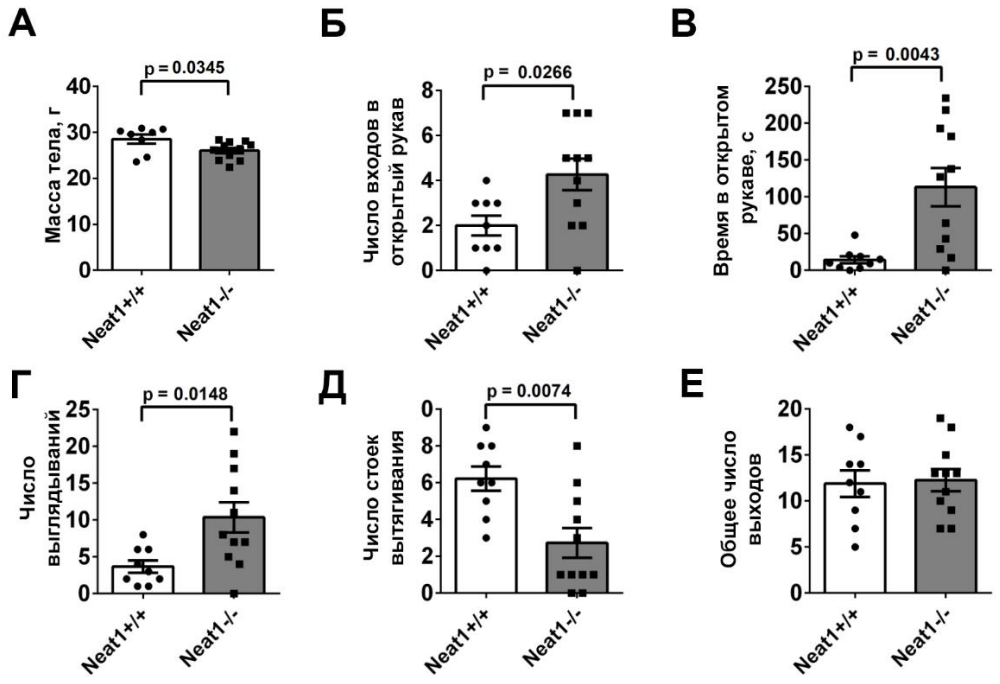

Рисунок 12 – Сравнение массы тела (А), а также параметров поведения в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» между нокаутными (*Neat1*$^{-/-}$) и контрольными (*Neat1*$^{+/+}$) мышами.

Таким образом, эти паттерны поведения показывают попытки животного покинуть место, в котором оно находиться, и при этом происходит неадекватная оценка рисков. В качестве меры общей двигательной активности использовался показатель «общее число входов в рукава». Различий между генотипами зарегистрировано не было, что свидетельствует о неизмененных моторных функциях у нокаутных мышей (Рисунок 12Е). Для более детального анализа локомоторной активности был проведен тест «домашняя клетка» (ДК), при котором животное помещается в клетку с неограниченным доступом к пище и воде, и на протяжении 24 часов проводиться запись его подвижности (Рисунок 13А, Б). Общая активность за все время теста была ниже у нокаутных мышей (Рисунок 13Б). Снижение двигательной активности при отсутствии моторных нарушений может свидетельствовать о депрессивно-подобном поведении.

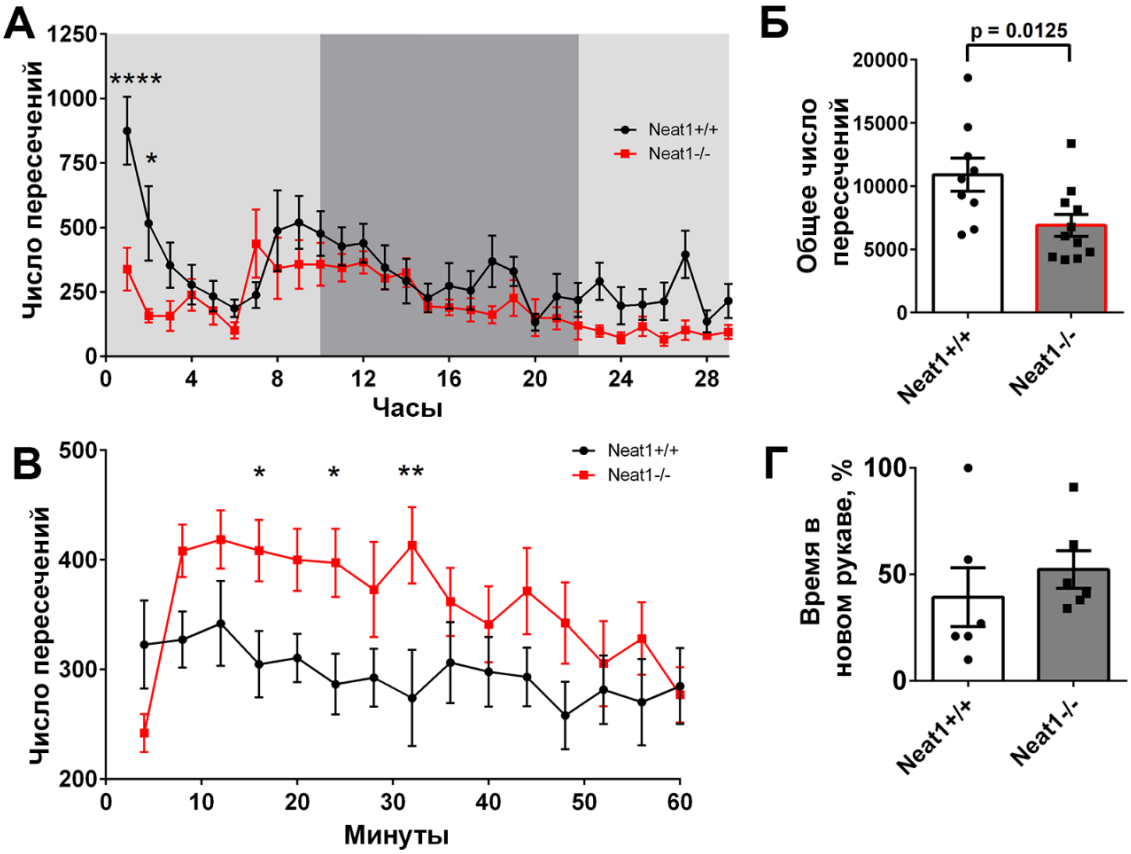

Рисунок 13 – Активность нокаутных (Neat1-/-) и контрольных (Neat1+/+) мышей в тесте «Домашняя клетка» с распределением по часам (А) и за все время тестирования (Б), а также измерение активности при ярком освещении (В). Показатель, отражающий состояние рабочей памяти в тесте «Y-образный лабиринт» (Г). * - $p<0.05$; ** - $p<0.01$; **** - $p<0.0001$.

Неожиданно, особенно гипоактивными животные были в первые два часа теста (Рисунок 13А), т.е. время, когда животное испытывает стресс новизны новых условий (после перемещения в тестовую клетку), что в противоположность предыдущему тесту говорит в пользу повышенной тревожности. У молодых *Neat*$^{-/-}$ мышей также наблюдалось сглаженная кривая активности после периода габитуации (после 8 часов теста), отсутствие чередования всплесков активности и более спокойного состояния, которые типичны для мышей дикого типа (Рисунок 13А). Таким образом, наблюдались противоречия в результатах двух тестов ПКЛ и

ДК. Важным различием между этими тестами является освещенность, при которой они проводятся. Так в тесте ДК животные находились в условиях близких к условиям обычного содержания при освещенности в 30-40 люкс, тогда как тест ПКЛ проводился при ярком освещении порядка 400 люкс. Сочетание яркого света и новизны обстановки представляет собой сильную аверсивную стимуляцию для мышей, и этим может объясняться повышение активности и выраженная реакция избегания в тесте ПКЛ. Для того, чтобы проверить это предположение, мы измерили локомоторную активность в условиях яркой освещенности (600 люкс) на протяжении 1 часа в специальном аппарате «клетка для измерения активности» (activity cage). В данных условиях *Neat1*$^{-/-}$ мыши оказались действительно гиперактивными (Рисунок 13В).

Таким образом, при отсутствии сильных стрессовых стимулов *Neat1*$^{-/-}$ мыши демонстрируют сниженную или сравнимую (после адаптации к новой обстановке) активность в сравнении с *Neat*$^{+/+}$ мышами. Тогда как стрессовое воздействие, такое как яркий свет, приводит к развитию гиперактивности, импульсивности и, возможно, повышению тревожности у нокаутных мышей, при этом происходит переход от гипоактивности к гиперактивности. Для того, чтобы исключить возможные нарушения памяти, которые могли бы повлиять на выполнение теста ПКЛ, мы протестировали рабочую память экспериментальных животных с использованием Y-образного лабиринта и парадигмы «вынужденное чередование рукавов». В результате было показано, что *Neat1*$^{-/-}$ мыши обладают интактной пространственной рабочей памятью (Рисунок 13Г).

Далее была проведена оценка социального поведения экспериментальных животных с использованием теста «резидент-интрудер» (РИТ). В данном тесте *Neat1*$^{+/+}$ мыши проявляют нормальный уровень агрессивного поведения, связанного с защитой территории, что проявляется в виде реакций боковых угроз, преследования и клинч-атак. В противоположность этому *Neat1*$^{-/-}$ мыши

демонстрировали практически полное отсутствие агрессивного поведения (Рисунок 14А). Более того, у нокаутных мышей наблюдалось меньшее физических контактов с интрудером (Рисунок 14Б).

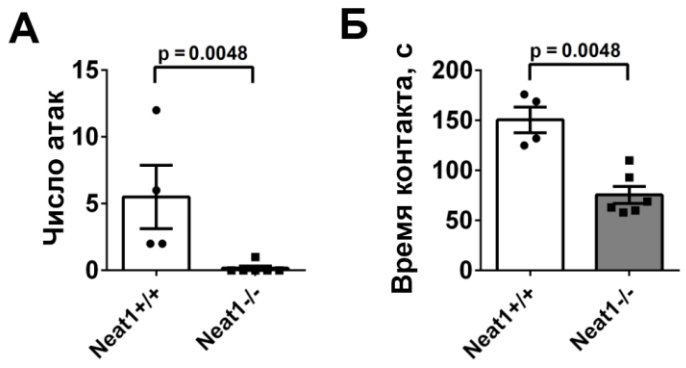

Рисунок 14 – Показатели социального поведения нокаутных (Neat1-/-) и контрольных (Neat1+/+) мышей в тесте «Резидент-интрудер».

Подводя итог этой серии тестов, можно сказать, что *Neat1*$^{-/-}$ мыши характеризуются определенным поведенческим фенотипом, проявляющимся как стресс-индуцируемая гиперактивность, изменение тревожноси, дизингибирование, изменение ритмов активности и нарушение социального поведения, при этом животные имели сохранные моторные функции. Мы предположили, что поведенческий фенотип *Neat1*$^{-/-}$ мышей может определяться внутренними изменениями в физиологии нейронов, например, их возбудимости. Для анализа единичных неврных клеток из гиппокампов, выделенных от новорождённых мышей, были получены первичные культуры. После 5-7 дней культивирования для целей визуализации нейроны трансфецировали плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP). Морфологический анализ не выявил видимых различий в росте нейритов и разветвленности отростков между генотипами (Рисунок 15А). После этого была проведена оценка возбудимости нейронов из первичных культур, включая трансмембранные токи и способность генерировать индуцированные потенциалы действия (иПД или iAP), для чего использовался метод локальной фиксации потенциала целой клетки (patch-clamp). При фиксации токов 50% нейронов от *Neat1*$^{-/-}$ мышей генерировали спонтанные потенциалы действия, тогда как для культур, полученных от *Neat1*$^{+/+}$ мышей, этот

показатель составил 36%. Все исследованные нейроны от *Neat1*$^{-/-}$ мышей генерировали повторяющиеся индуцированные потенциалы действия (iAPs “trains”) среди *Neat1*$^{+/+}$ нейронов таких было только 40% (Рисунок 15Б).

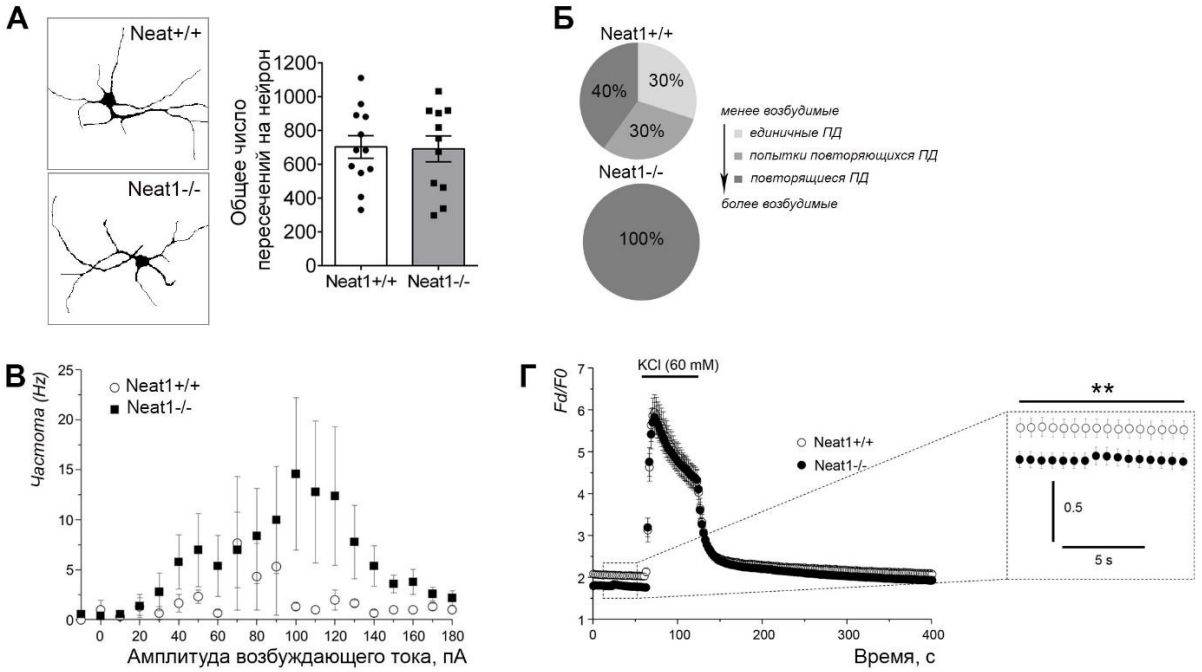

Рисунок 15 – Оценка морфологии нейронов (А) из первичных культур, полученных от нокаутных (Neat1-/-) и контрольных (Neat1+/+) мышей, с анализом разветвленности нейритов (Sholl анализ, гистограмма слева). Распределение нейронов (Б) по способности генерировать повторяющиеся потенциалы действия (ПД). Частота (В) генерируемых потенциалов действия. Результаты кальциевого имиджинга после воздействия KCl (Г). ** - $p<0.01$.

Еще одним признаком повышенной активности нейронов от *Neat1*$^{-/-}$ мышей являлась большая частота генерации ПД в сравнении с *Neat1*$^{+/+}$ нейронами (Рисунок 15В). Чтобы определить, как изменения возбудимости *Neat1*$^{-/-}$ нейронов согласуются с регуляцией кальциевого (Ca^{2+}) гомеостаза, мы измерили выброс кальция в клетки при деполяризации с использованием кальций-чувствительного краситель Fura-2 AM (метод кальциевого имиджинга). Для деполяризации мембран

клеток в культуру добавляли KCl (60 mM). Кальциевый ответ клеток обоих генотипов оказался схожим, однако базовый уровень Ca^{2+} был значительно ниже у *Neat1*$^{-/-}$ нейронов (Рисунок 15Г). Приведенные результаты свидетельствуют о том, что *Neat1*$^{-/-}$ нейроны гипервозбудимы и имеют отклонения в кальциевом гомеостазе.

Отсутствие явных изменений по ключевым гистологическим маркерам, связанным с функционированием ЦНС, говорит о существовании менее заметных молекулярных изменений, которые приводят к повышению возбудимости нейронов и поведенческим нарушениям у *Neat1*$^{-/-}$ мышей. Чтобы обнаружить возможные изменения профиля экспрессии генов в ЦНС, был проведен транскриптомный анализ (РНК-Сек, RNA-Seq) тканей коры головного мозга. Анализ дифференциальной экспрессии генов показал незначительные изменения в экспрессии генов у мышей *Neat1*$^{-/-}$. Только для 14 генов были обнаружены достоверные изменения (adjusted p-value, padj<0.05) в их экспрессии. Для 10 генов известна их функция: *Cd6, Neat1, Rprm, Col62a, Prune2, Frmd8, Eps8l1, Crip2, Carnmt1, Snhg1*. Анализ транскриптома показал, что только небольшое количество генов изменило свою экспресиию при нокауте Neat1, при этом часть (около половины) генов, наиболее изменившие свой уровень экспрессии, локализованы на той же хромосоме, что и ген *Neat1*, например, *Frmnd8, Cd6* и *Malat1*. Это согласуется с появляющимися данными о роли днРНК, которую они играют в качестве *cis* регуляторов. При взятии в анализ большего числа генов с измененной экспрессией мы обнаружили, что большинство из них (~90%) снижали свою экспрессию. Известно, что Neat1, а также Malat1 связываются с большим числом геномных сайтов и активных генов. Таким образом, можно сделать вывод, что Neat1 оказывает позитивное действие на экспрессию большинства генов.

Данные, полученные от РНК-Сек, были далее использованы для анализа возможных изменений альтернативного сплайсинга генов в мозге *Neat1*$^{-/-}$ мышей.

Всего было обнаружено 14 генов, сплайсинг которых различался у *Neat1*$^{-/-}$ и *Neat1*$^{+/+}$ мышей. Все найденные гены имеют высокий уровень экспрессии в мозге, а два из них экспрессируются исключительно в мозге (*Myt1l, Rgs7*). Большинство этих генов также важны для функционирования ЦНС и участвуют в таких процессах, как пролиферация, дифференцировка, межклеточное взаимодействие, межнейронный транспорт, первичный аксоногенез и регуляция роста аксонов (*Dlg1, Myt1l, Ptprs, Dctn2, Rgs7*). Некоторые гены ассоциированы с психиатрическими расстройствами, такими как шизофрения (*Dlg1, Myt1l*), расстройства аутистического спектра (*Myt1l*), панические расстройства (*Rgs7*). Для того, чтобы провести анализ обогащения функций и метаболических путей, был использован список генов, для которых пороговое значение p соответствовало значению <0.05, включающий 671 ген. Далее был проведен анализ генетических онтологий биологических процессов, в которых участвуют данные гены с использованием инструментов ресурса Enrichr. Было показано, что значительное число генов, дифференциально сплайсирующихся у *Neat1*$^{-/-}$ мышей, участвуют в аксоногенезе, морфогенезе дендритов, определяют локализацию белков в синапсах, включая гены, имеющие критическое значение для поддержания нейронального гомеостаза, а также вовлеченых в неврологические заболевания, например, *Shank1, Bdnf, Map2, Dlg4, Nrxn1, Nrxn2* and *Ncam1*. Среди обогащенных категорий также присутствовал РНК процессинг, в том числе включающий гены, кодирующие широко представленные РНК-связывающие белки *Cpsf6, Hnrnpk, Hnrnph1, Hnrnpa2b1, Hnrnpd, Srsf5* and *Srsf7*. Анализ метаболических путей, в которых участвуют исследуемые гены, выделил группу генов важных для синаптических функций (*Syngap1, Camk2b, Cacna1a, Cacna1d, Gria4*) и мРНК процессинга (Celf1, Cstf2, Pcbp2, Hnrnpk, Hnrnph1, Hnrnpa2b1, а также несколько генов, кодирующих факторы сплайсинга, богатые серином и аргинином).

3 Характеристика БАС-ассоциированного белка CREST

Среди генов, мутации в которых ассоциированы с БАС, наиболее представлены гены, кодирующие белки, вовлеченные в метаболизм РНК, напрямую или опосредовано. CREST является ядерным белком, открытым в 2003 году в исследовании по скринингу кальций-зависимых генов, вовлеченных в активацию транскрипции. Chesi A. с соавт. проводили секвенирование экзома пациентов со спорадическими случаями БАС и обнаружили две мутации в гене *SS18L1*, кодирующем белок CREST (calcium-responsive transactivator). Позднее были описаны еще две мутации в этом гене у пациентов с семейными формами БАС. CREST важен для нормального развития нервной системы. У мышей, лишенных этого гена, наблюдаются нарушения ветвления дендритов, моторные нарушения и ранняя летальность. Ранее было показано, что CREST вовлекается в ядерные тельца неизвестной природы, после чего он был идентифицирован в качестве белка параспеклов.

Большинство белков, ассоциированных с БАС, характеризуются высокой способностью к агрегации, что связывается с наличием в их структуре прионо-подобного домена. Несмотря на то, что наличие прионо-подобного домена в белке CREST было установлено, его агрегационные способности не оценивались ранее ни для белка дикого типа, ни для мутантных вариантов. Ничего не было известно и о роли CREST в параспеклах, а также о том, может ли он вовлекаться в другие РНП комплексы. Наше исследование было направлено на изучение агрегационных свойств и возможного участия CREST в формировании ядерных и цитоплазматических РНК гранул, в том числе его аберрантных форм, связанных с БАС. Нами были получены плазмидные конструкты, кодирующее CREST, сшитый с меткой GFP или Flag, а также без метки. Все три варианта белка показали преимущество ядерную локализацию в культурах клеток SH-SY5Y и COS7 (Рисунок 16). Распределение белка в ядрах носило характер точечных структур

круглой формы. В клетках с большим количеством экспрессируемого белка, CREST также детектировался в цитоплазме с образованием агрегатов, по крайней мере для конструкта GFP-CREST (Рисунок 16).

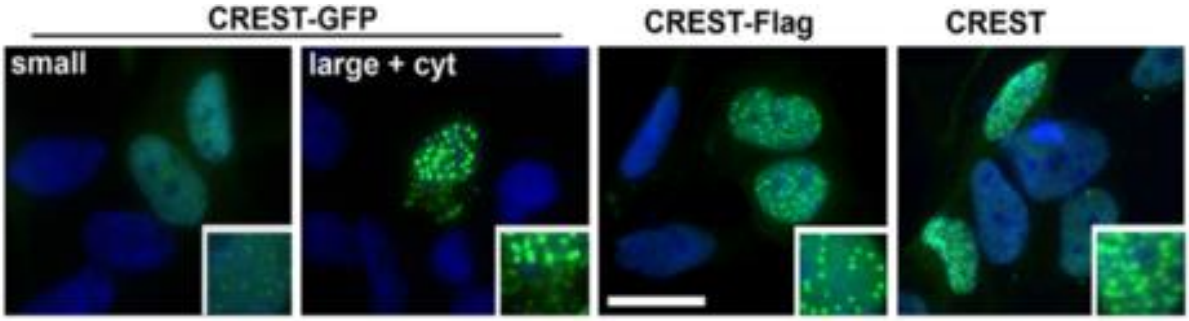

Рисунок 16 – Локализация белка CREST, меченного GFP или Flag, а также не меченного (иммуногистохимическая окраска) белка в клетках нейробластомы.

Для того, чтобы установить тип внутриядерных структур, в образовании которых участвует CREST, нами была проведена окраска на маркеры различных внутриядерных телец. В клетках SH-SY5Y с диффузным или мелкогранулярным распределением GFP-CREST белок не обнаруживался в нуклеолярной зоне, детектируемой при помощи окраски бромистым этидием. Помимо этого, накопления CREST не обнаруживались в SMN-позитивных Gems, коилин p80-позитивных тельцах Кохаля и PML тельцах. Накопление CREST наблюдалось вблизи MALAT1-позитивных ядерных спеклов (Рисунок 17). Мы также наблюдали накопление GFP-CREST в параспеклах, детектируемых с помощью FISH на NEAT1, однако только в тех клетках, в которых CREST экспрессировался на низком уровне и имел диффузное распределение. Крупные гранулярные внутриядерные структуры, образуемые CREST, не перекрывались ни с одним из вышеупомянутых маркеров внутриядерных телец, включая параспеклы, хотя они и окружали спеклы (что типично для параспеклов). На основании приведенных фактов ядерные, а также цитоплазматические структуры, в которых накапливается CREST, были признаны белковыми агрегатами.

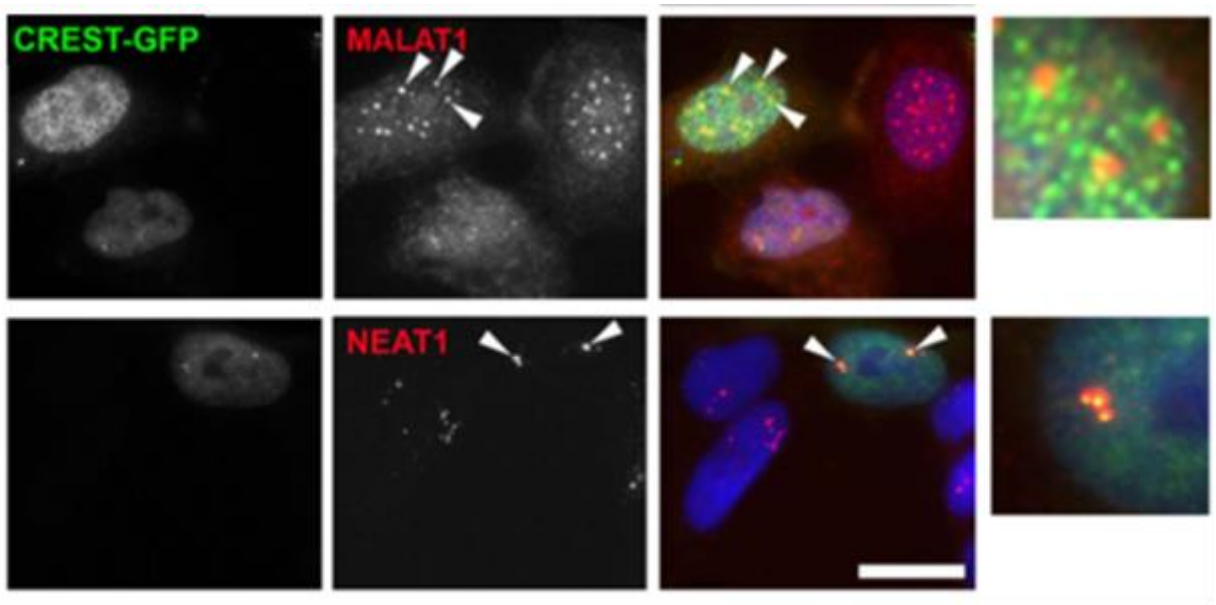

Рисунок 17 – Взаимная локализация белка CREST с маркерами внутриядерных телец спеклов (MALAT1) и параспеклов (NEAT1).

Большое количество белков, связанных с БАС, являются компонентами стресс-гранул (СГ), цитоплазматических РНП комплексов, образующихся в клетке в ответ на неблагоприятные факторы среды и способствуют снижению общего уровня белкового синтеза в условиях сильного стресса. Мы проанализировали поведение белка CREST при разных типах стресса и обнаружили, что он также является компонентом СГ. Для активации образования СГ клетки SH-SY5Y, экспрессирующие GFP-CREST или Flag-CREST, были подвергнуты воздействию арсенита натрия, тапсигаргина или простагландина 15d-PGJ2, которые вызывают оксидативный стресс, ЭПР-стресс и ингибирование фактора инициации трансляции eIF4E соответственно. В клетках с небольшими агрегатами или диффузной окраской в ядре все три агента вызывали слабое, но отчетливое перераспределение CREST в СГ, которые визуализировались с помощью маркера TIAR (Рисунок 18), при этом сборка СГ усиливала перераспределении CREST из ядра в цитоплазму стрессированных клеток.

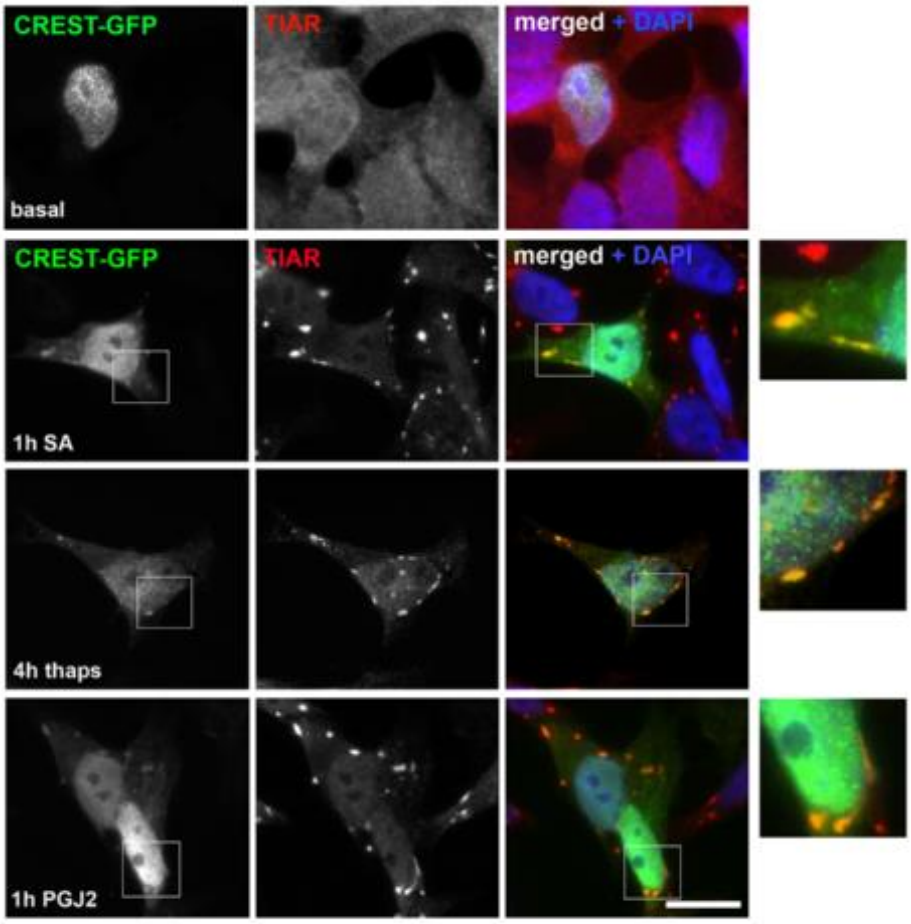

Рисунок 18 – Белок CREST обнаруживается в стресс-гранулах, образование которых вызвано воздействием арсенита натрия (SA), тапсигаргина (thaps) или простагландина 15d-PGJ2 (PGJ2). Детекция стресс-гранул проводилась путем окраски на маркер TIAR. Шкала 10 мкм.

Цитоплазматические агрегаты полноразмерного GFP-CREST, которые наблюдались в части клеток вместе с крупными ядерными агрегатами, не окрашивались на маркеры СГ или Р-телец, как в обычных условиях, так и при стрессе, хотя в стрессированных клетках такие агрегаты часто располагались вблизи СГ. Для изучения участия CREST в функционировании параспеклов нами была использована линия COS7, в которой они образуются в большом количестве. В большинстве клеток, в которых обнаруживались ядерные гранулоподобные агрегаты Flag-CREST, они были хорошо отличимы от параспеклов, для детекции

которых использовалась окраска на коровый белок параспеклов NONO/p54nrb. Более детальный анализ выявил, что часть агрегатов CREST находятся в непосредственной близости от параспеклов. Как и параспеклы, такие агрегаты часто располагались на границе спеклов.

Таким образом, по-видимому, параспеклы при сборке могут выступать в качестве точки нуклеации агрегатов CREST, которые отщепляются от параспеклов и оказываются распределенными в нуклеоплазме. Следующий вопрос, который был поставлен, – это может ли CREST вовлекать другие белки параспеклов в состав ядерных агрегатов? Действительно, коровый белок параспеклов FUS секвестрировался в почти все ядерные агрегаты, образуемые Flag-CREST или GFP-CREST, в независимости от их размера и количества (Рисунок 19). Однако FUS не является необходимым белком для агрегации CREST, так как нокдаун FUS с помощью siRNA не оказал эффекта на агрегацию Flag-CREST.

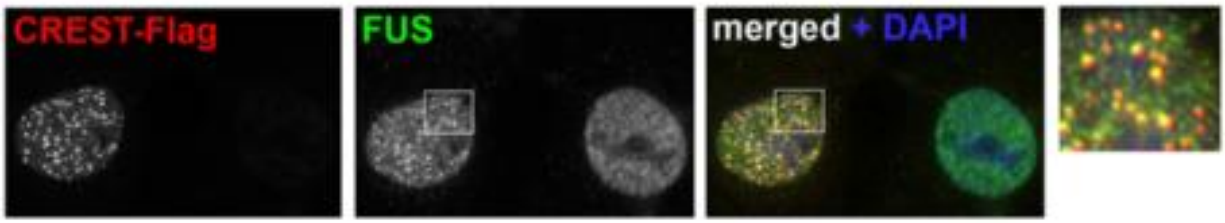

Рисунок 19 – Белок CREST вовлекает FUS в ядерные агрегаты. Шкала 10 мкм.

Другие характерные для параспеклов белки NONO/p54nrb и PSPC1 не детектировались в агрегатах CREST малого размера, но коагрегировали с CREST в тех клетках, где CREST образовывал крупные внутриядерные агрегаты (данные не представлены). Таким образом, можно заключить, что FUS специфически вовлекается в агрегаты CREST, тогда как белки NONO/p54nrb и PSPC1 могут быть неспецифически захвачены в состав агрегатов при их росте. Так как FUS важен для формирования параспеклов и может влиять на уровень NEAT1, его накопление и удержание в агрегатах может негативно влиять на параспеклы, например, через

снижение уровня NEAT1. Действительно, в клетках COS7, экспрессирующих CREST с формированием ядерных агрегатов, с меньшей вероятностью образовывались параспеклы (детектируемые с помощью окраски на NEAT1) в сравнении с клетками, в которых CREST имел только диффузное распределение или нетрансфецированными клетками (Рисунок 20А, Б). Более того, сравнение уровня NEAT1 в клетках нейробластомы, экспрессирующих CREST или пустой GFP вектор, показало, что повышенный уровень CREST приводит к снижению количества NEAT1 транскрипта (Рисунок 20В).

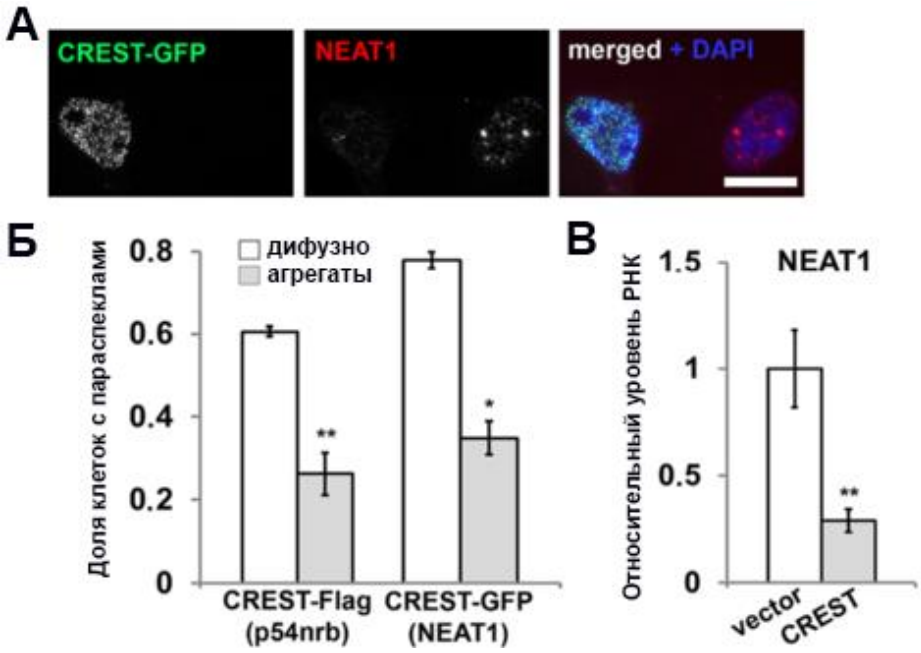

Рисунок 20 – В клетках, содержащих агрегаты CREST, с меньшей вероятностью образуются параспеклы (А и Б). Экспрессия CREST приводит к снижению уровня NEAT1 (В). Шкала 10 мкм. * - $p<0.05$; ** - $p<0.01$.

Так как CREST проявляет склонность к агрегации и секвестирует ряд важных белков в свои агрегаты, можно предположить, что его повышенная экспрессия сама по себе может быть вредна для нейронов. Мы провели исследование действия нормального CREST, а также его мутантных форм на дендритное древо нейронов из первичных гиппокампальных культур мыши. В первичных нейронах как GFP-

меченый, так и немеченый CREST имел одинаковое распределение и локализовался преимущественно в ядрах клеток, образовывая агрегаты в ядре и иногда в отростках, при этом агрегация усиливалась при повышении уровня экспрессии белка (Рисунок 21А).

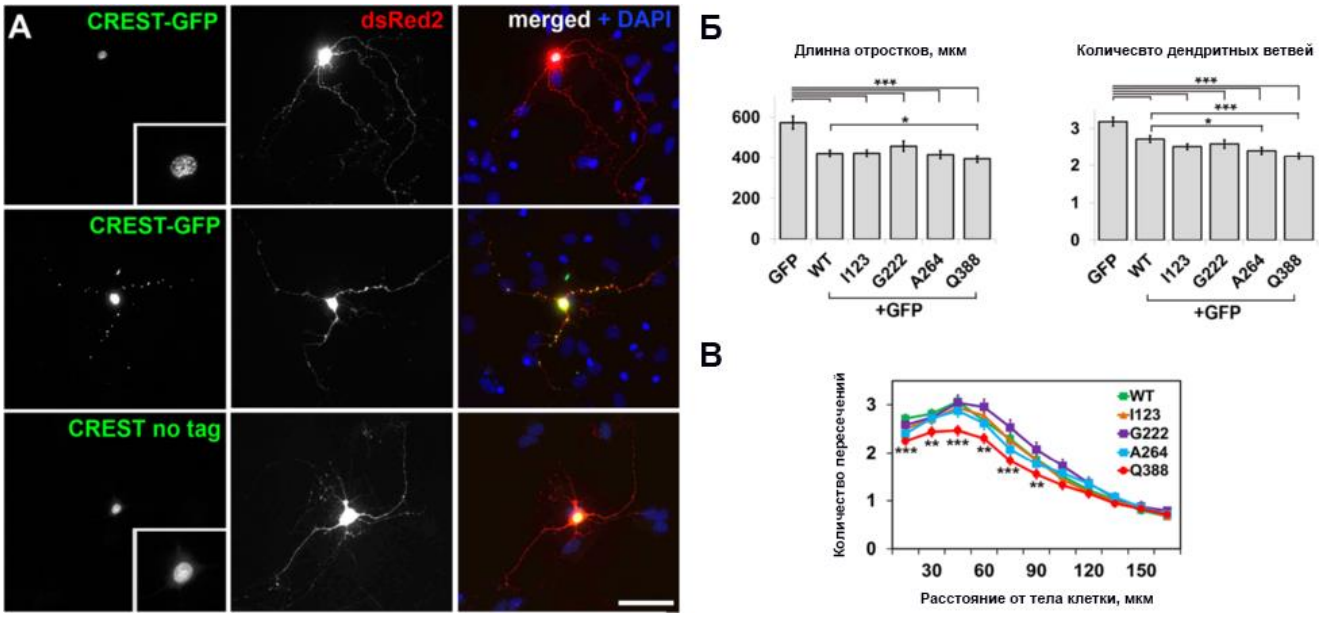

Рисунок 21 – Распределение белка CREST, меченного GFP и без метки, в клетках первичных гиппокампальных культур при совместной ко-трансфекции с плазмидой, кодирующей белок dsRed (А). Общая длинна отростков и количество дендритных ветвей первичных нейронов, трансфецированных мутантными вариантами CREST (Б). Разветвленность сети нейритов по результатам Sholl-анализа (В). Шкала 10 мкм. * - $p<0.05$; ** - $p<0.01$; *** - $p<0.001$.

Дальнейшие эксперименты проводились с немеченным CREST в силу его большей физиологичности. Клетки гиппокампа были изолированы из животных на 3-ий постнатальный день и культивировались на протяжении 5 дней, затем культуры ко-трансфецировали вектором, несущим метку dsRed2, для визуализации морфологии клеток и вектором, кодирующем один из вариантов CREST. После 48 часов экспрессии белка проводили измерение общей длины отростков и Sholl-анализ, характеризующий разветвленность сети нейритов для единичной клетки.

Общая длина отростков была значительно снижена у клеток, экспрессирующих CREST в сравнении с нейронами, экспрессирующими только GFP вектор. При этом различий между разными вариантами CREST не наблюдалось. Однако данный параметр был меньше для мутантной формы Q388stop в сравнении с белком дикого типа (Рисунок 21Б). Схожим образом, клетки, экспрессирующие CREST, имели меньшее количество дендритных ветвей, а для формы Q388stop и в меньшей степени для A264T данный эффект был более выражен. Sholl-анализ показал, что нейроны, экспрессирующие Q388stop, имеют значимо меньшее число пересечений в дендритной сети, тогда как остальные мутантные формы не отличались от белка дикого типа (Рисунок 21В).

Проведенные нами исследования белка CREST показали, что данный белок обладает рядом свойств, характерных для других белков, ассоциированных с БАС: 1) высокой способностью к агрегации в живых клетках; 2) включается в состав стресс гранул; 3) влияет на образование параспеклов. Появляется все больше данных о том, что белковая агрегация и изменение функции СГ (и, вероятно, параспеклов) являются важными факторами в патогенезе БАС, и наши данные также указывают на эти процессы, как на ключевые участники развития патологических изменений в случае с мутациями в белке CREST.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз является мультифакториальным заболеванием, развитие которого зависит от целого ряда как внутренних, так и внешних причин, а его патогенез остается недостаточно изученным. За последние годы стало появляться все больше научных данных о важной роли РНК-связывающих белков в патогенетических событиях при БАС. Белки TDP-43, FUS, мутации в которых ассоциированы с БАС, являются компонентами рибонуклеопротеиновых комплексов различной природы и локализации, например, параспеклов и стресс-гранул. Данные белки проявляют высокую склонность к

агрегации, при этом они перераспределяются из ядра в цитоплазму клетки, что приводит к потере их нормальной функции. Так как FUS и TDP-43 участвует в биогенезе miRNA и связанном с ними сплайсинге генов, происходит нарушение процессов, связанных с метаболизмом РНК. Примечательно, что агрегаты белка TDP-43 обнаруживаются в спинном мозге у подавляющего большинства пациентов с БАС, в том числе при отсутствии мутации в данном гене.

Мы обнаружили, что в спинном мозге больных БАС, в отличии от здоровых людей обнаруживаются внутриядерные рибонуклеопротеиновые комплексы – параспеклы, сборка которых происходит на основе длинной некодирующей РНК NEAT1, при участии белков, в том числе TDP-43 и FUS. Смоделировав последствия TDP-43-протеинопатии в клеточных культурах, мы показали, что потеря функции TDP-43 может быть причиной активации образования параспеклов при БАС, при этом наблюдается нарушение биогенеза miRNA и активация сигнального пути интерферонов I типа. Таким образом, нарушения в работе данных метаболических путей могут представлять собой общий механизм, лежащий в основе стимулирования сборки параспеклов при разных формах БАС.

Для выяснения роли Neat1, как важнейшего компонента параспеклов в функционировании нервной системы, мы провели подробную фенотипическую характеристику линии мышей с генетической инактивацией (нокаутом) данного гена. В результате было показано, что у нокаутных мышей наблюдалась повышенная возбудимость нейронов и нарушались адаптивные поведенческие реакции на стрессовые стимулы. Помимо этого, в тканях коры головного мозга изменялась экспрессия и альтернативный сплайсинг ряда генов, связанных с работой синапсов и процессингом РНК. По-видимому, функция параспеклов становится существенной в патофизиологических условиях, например, в нейронах, переживающих стресс из-за развивающегося нейродегенеративного процесса.

Нами также был охарактеризован другой БАС-ассоциированный белок CREST. Проведенные нами исследования показали, что данный белок обладает рядом свойств, характерных для других белков, связанных с БАС. CREST проявлял высокую способность к агрегации в живых клетках, обнаруживался в составе стресс-гранул, а также влиял на образование параспеклов. Более того, параспеклы при сборке могут выступать в качестве точки нуклеации агрегатов CREST. Мы также показали, что структуры, появляющиеся в условиях высокой экспрессии CREST и накопления белка в ядре, являются продуктами необратимой агрегации. Также, как и FUS при своей агрегации CREST способен захватывать другие белки, входящие в состав параспеклов, и таким образом нарушать функции последних.

Полученные нами данные указывают на то, что белковая агрегация, изменение функций параспеклов и стресс-гранул являются ключевыми процессами в развитии патологических изменений при БАС. Можно предположить, что появление в клетке даже незначительного количества агрегированных белков TDP-43, FUS и CREST, делает ее более чувствительной к дальнейшим повреждающим воздействиям, особенно в случае таких клеток, как двигательные нейроны в силу их высокой метаболической активности и требованиям к белковому синтезу. Нарушение функционирования рибонуклеопротеиновых комплексов (параспеклов, стресс-гранул и др.) может рассматриваться как общий механизм, ответственный за селективное поражение двигательных нейронов при БАС. Такие нарушения могут возникать как вследствие патологической агрегации белков, участвующих в образовании рибонуклеопротеиновых комплексов (TDP-43, FUS, CREST), так и из-за изменения уровня РНК (Neat1), входящих в их состав.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в спинном мозге больных БАС со спорадическими и семейными формами около 40% нейронов содержат внутриядерные рибонуклеопротеиновые комплексы – параспеклы.
2. Перераспределение белка TDP-43 из ядра в цитоплазму приводит к нарушению биогенеза miRNA, что в свою очередь запускает сигнальный путь интерферонов I типа и активирует сборку параспеклов в культуре клеток.
3. Образование параспеклов играет протекторную роль для нейронов и препятствует апоптозу.
4. Детальная фенотическая характеристика с использованием гистологических, биохимических и поведенческих методов исследования показала, что у мышей с генетическим нокаутом длинной некодирующей РНК Neat1 наблюдается повышенная возбудимость нейронов и нарушается адаптивная поведенческая реакция на стрессовые стимулы.
5. Установлено, что потеря функции Neat1 у нокаутных мышей приводит к изменению экспрессии, а также альтернативного сплайсинга ряда генов, связанных с работой синапсов и процессингом РНК в коре головного мозга.
6. Нативный белок CREST, а также его мутантные формы, проявляют высокую склонность к агрегации при экспрессии в нейронах *in vitro* и подавляет рост и ветвление нейритов.
7. Белок CREST участвует в образовании стресс-гранул и параспеклов, при этом взаимодействуя с белком FUS, входящим в состав парспеклов, может негативно влиять на их формирование.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Kukharsky M.S. In a search for efficient treatment for amyotrophic lateral sclerosis: Old drugs for new approaches / Kukharsky M.S., Skvortsova V.I., Bachurin S.O., Buchman V.L. // **Med Res Rev.** – 2020. DOI: 10.1002/med.21725.

2. Kukharsky M.S. Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice / Kukharsky M.S., Ninkina N.N., An H., Telezhkin V., Wei W., Meritens C.R., Cooper-Knock J., Nakagawa S., Hirose T., Buchman V.L., Shelkovnikova T.A. // **Transl Psychiatry.** – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 171.
3. Kukharsky M.S. Alterations in the nigrostriatal system following conditional inactivation of alpha-synuclein in neurons of adult and aging mice / Ninkina N., Tarasova T.V., Chaprov K.D., Roman A.Y., Kukharsky M.S., Kolik L.G., Ovchinnikov R., Ustyugov A.A., Durnev A.D., Buchman V.L. // Neurobiol Aging. – 2020. – V. 91. – P. 76-87.
4. Kukharsky M.S. Low Level of Expression of C-Terminally Truncated Human FUS Causes Extensive Changes in the Spinal Cord Transcriptome of Asymptomatic Transgenic Mice / Lysikova E.A., Funikov S., Rezvykh A.P., Chaprov K.D., Kukharsky M.S., Ustyugov A., Deykin A.V., Flyamer I.M., Boyle S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. // Neurochem Res. – 2020. – V. 45. – № 5. – P. 1168-1179.
5. Kukharsky M.S. Behavioural impairments in mice of a novel FUS transgenic line recapitulate features of frontotemporal lobar degeneration / Lysikova E.A., Kukharsky M.S., Chaprov K.D., Vasilieva N.A., Roman A.Y., Ovchinnikov R.K., Deykin A.V., Ninkina N., Buchman V.L. // Genes Brain Behav. – 2019. 10.1111/gbb.12607. – P. e12607.
6. Кухарский М.С. Нарушение когнитивной функции у трансгенных мышей со сниженным уровнем экспрессии патогенной формы белка FUS человека / Лысикова Е.А., Чапров К.Д., Иванова Т.А., Устюгов А.А., Овчинников Р.К., Кухарский М.С., Коршунов Е.А., Дейкин А.В., член-корр. РАН Бачурин С.О., Нинкина Н.Н. // Патогенез. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 41-49.
7. Кухарский М.С. Перспективность гамма-карболинов в качестве основы для разработки соединений, подавляющих прогрессию протеинопатии при нейродегенеративных заболеваниях / Скворцова В. И., Бачурин С. О., Устюгов А. А., Кухарский М.С., Дейкин А. В., Бухман В. Б., Нинкина Н. Н. // **Acta Naturae.** – 2018. – Т. 10. – No. 4 (39). – С. 54-57.
8. Кухарский М.С. Присутствие аутоантител против гамма-синуклеина коррелирует с полиморфизмом в четвёртом экзоне кодирующего гена / Мальцев А.В., Бородина Ю.В., Скуратовская Л.Н., Кухарский М.С., Овчинников Р.К., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ковражкина Е.А., Устюгов А.А. // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.** – 2018. – V. 118(9). – P. 68-70.

9. Kukharsky M.S. Protective paraspeckle hyper-assembly downstream of TDP-43 loss of function in amyotrophic lateral sclerosis / Shelkovnikova T.A., Kukharsky M.S., An H., Dimasi P., Alexeeva S., Shabir O., Heath P.R., Buchman V.L. // Mol Neurodegener. – 2018. – V. 13. – № 1. – P. 30.
10. Kukharsky M.S. Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain / Tarasova T.V., Lytkina O.A., Goloborshcheva V.V., Skuratovskaya L.N., Antohin A.I., Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S. // PeerJ. – 2018. – V. 6. – P. e4779.
11. Kukharsky M.S. Chronically stressed or stress-preconditioned neurons fail to maintain stress granule assembly / Shelkovnikova T.A., Dimasi P., Kukharsky M.S., An H., Quintiero A., Schirmer C., Buee L., Galas M.C., Buchman V.L. // Cell Death Dis. – 2017. – V. 8. – № 5. – P. e2788.
12. Кухарский М.С. Выявление аутоантител к потенциально амилоидогенному белку гамма-синуклеину в сыворотке крови больных с боковым амиотрофическим склерозом и нарушениями мозгового кровообращения / Роман А.Ю., Ковражкина Е.А., Разинская О.Д., Кухарский М.С., Мальцев А.В., Овчинников Р.К., Лыткина О.А., Смирнов А.П., Московцев А.А., Бородина Ю.В., Сургучёв А.П., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И. // **Доклады академии наук.** – М., 2017. Т. 472. – №5. С. 600-603.
13. Kukharsky M.S. Intracerebral Injection of Metal-Binding Domain of Abeta Comprising the Isomerized Asp7 Increases the Amyloid Burden in Transgenic Mice / Kulikova A.A., Cheglakov I.B., Kukharsky M.S., Ovchinnikov R.K., Kozin S.A., Makarov A.A. // Neurotox Res. – 2016. – V. 29. – № 4. – P. 551-7.
14. Кухарский М.С. Молекулярные аспекты патогенеза и современные подходы к фармакологической коррекции болезни Альцгеймера / Кухарский М.С., Овчинников Р.К., Бачурин С.О. // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.** – 2015. Т. 115(6). С.103-114
15. Kukharsky M.S. The Y-Box Binding Protein 1 Suppresses Alzheimer's Disease Progression in Two Animal Models / Bobkova N.V., Lyabin D.N., Medvinskaya N.I., Samokhin A.N., Nekrasov P.V., Nesterova I.V., Aleksandrova I.Y., Tatarnikova O.G., Bobylev A.G., Vikhlyantsev I.M., Kukharsky M.S., Ustyugov A.A., Polyakov D.N., Eliseeva I.A., Kretov D.A., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P. // PLoS One. – 2015. – V. 10. – № 9. – P. e0138867.
16. Kukharsky M.S. C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in ALS patients from the Central European Russia population / Abramycheva N.Y., Lysogorskaia E.V.,

Stepanova M.S., Zakharova M.N., Kovrazhkina E.A., Razinskaya O.D., Smirnov A.P., Maltsev A.V., Ustyugov A.A., Kukharsky M.S., Khritankova I.V., Bachurin S.O., Cooper-Knock J., Buchman V.L., Illarioshkin S.N., Skvortsova V.I., Ninkina N. // Neurobiol Aging. – 2015. – V. 36. – № 10. – P. 2908 e5-9.

17. Кухарский М.С. Подавление гамма-карболином нейродегенеративного процесса в трансгенной модели бокового амиотрофического склероза / Броновицкий Е.В., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Фёдоров Е.Н., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Овчинников Р.К., Роман А.Ю., Хританкова И.В., Кухарский М.С., Бухман В.Л., член-корреспондент РАН Бачурин С.О., Устюгов А.А. // **Доклады академии наук.** – М., 2015. Т. 462. – №5. С. 609-612.
18. Kukharsky M.S. Early lethality and neuronal proteinopathy in mice expressing cytoplasm-targeted FUS that lacks the RNA recognition motif / Robinson H.K., Deykin A.V., Bronovitsky E.V., Ovchinnikov R.K., Ustyugov A.A., Shelkovnikova T.A., Kukharsky M.S., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., Kovrazhkina E.A., Bachurin S.O., Buchman V.L., Ninkina N.N. // Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. – 2015. – V. 16. – № 5-6. – P. 402-9.
19. Kukharsky M.S. Calcium-responsive transactivator (CREST) protein shares a set of structural and functional traits with other proteins associated with amyotrophic lateral sclerosis / Kukharsky M.S., Quintiero A., Matsumoto T., Matsukawa K., An H., Hashimoto T., Iwatsubo T., Buchman V.L., Shelkovnikova T.A. // Mol Neurodegener. – 2015. – V. 10. – № 1. – P. 20.
20. Кухарский М.С. Исследование эффекта повышенного образования гамма-синуклеина на дегенерацию синапсов, вызванную нарушением функции белка CSPα / Лыткина О. А., Тарасова Т. В., Хританкова И. В., Анохин П. К., Кухарский М. С., Устюгов А. А., Бачурин С. О. // **Фундаментальные исследования**. – 2014. – № 6. – Часть 6 – С. 1214-1218.
21. Кухарский М.С. Связывание гамма-синуклеина с синаптическими везикулами происходит без взаимодействия с белками SNARE-комплекса / Лыткина О. А., Тарасова Т. В., Хританкова И. В., Анохин П. К., Кухарский М. С., Устюгов А. А., Бачурин С. О. // **Доклады академии наук.** – 2014. – Т. 456. – №5. С. 610-612.
22. Кухарский М.С. Модель бокового амиотрофического склероза на основе линии трансгенных мышей, экспрессирующих мутантную форму FUS белка человека / Дейкин А.В., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Броновицкий Е.В., Разинская О.Д., Смирнов А.П., Ермолкевич Т.Г., Еляков А.Б., Попов А.Н., Фёдоров 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. // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.** – 2014. – Т. 8. – С. 62-69.

23. Kukharsky M.S. Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease / 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. // J Alzheimers Dis. – 2014. – V. 38. – № 2. – P. 425-35.

Список сокращений

CREST – calcium-responsive transactivator;

dsRNA – double-strand RNA;

eIF2α – eukaryotic initiation factor 2α;

FUS – РНК-связывающий белок FUS (англ. Fused in Sarcoma);

GFP – green fluorescent protein (зелёный флуоресцентный белок);

miRNA – microRNA (микроРНК);

NEAT1 – nuclear enriched abundant transcript 1;

poly(I:C) – polyinosine-polycytidylic acid;

RNA-FISH – fluorescent *in situ* hybridization targeting ribonucleic acid molecules (флуоресцентная *in situ* гибридизация с использованием РНК зонда);

siRNA – small interfering RNA (малые интерферирующие РНК);

TDP-43 – TAR DNA-binding protein;

WT – дикий тип (wild type);

БАС – боковой амиотрофический склероз;

днРНК – длинные некодирующие РНК (long non-coding RNAs, lncRNAs);

кОТ-ПЦР – количественная ПЦР с обратной транскрипцией;

кПЦР – количественная ПЦР;

НДЗ – нейродегенеративные заболевания;

сБАС – спорадические формы БАС.