

УДК 577

М.А.Дитина (5 курс, каф. БФ), И.В.Гужова, д.б.н., в.н.с.

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ХОРЕИ ГЕНГТИНГТОНА

Хорея Генгтингтона – одно из 10 нейродегенеративных заболеваний, связанных с накоплением в клетке белков с длинными полиглутаминовыми последовательностями. Это наследственное заболевание, поражающее клетки стриатума и коры головного мозга, отвечающий за двигательную активность и когнитивную функцию. Считается, что гибель нейронов при данном заболевании происходит по пути апоптоза, что подтверждается фрагментацией ДНК, а также конденсацией клеточного ядра. Болезнь Генгтингтона вызывается удлинением CAG триплетного повтора в первом экзоне N-концевой части гена, кодирующего белок хантингтин. В норме длина CAG повтора варьирует от 6 до 36 триплетов, при увеличении этого количества более 40 развивается заболевание. Следствием накопления аномально длинных повторов глутаминовых остатков в молекулах белков является агрегация последних, сопровождающаяся подавлением процессов нормального функционирования клеток. Действительно, в тканях головного мозга больных хореей Генгтингтона наблюдались внутриклеточные включения, расположенные в ядре и цитоплазме, чаще в околядерной области, содержащие мутантный белок [1], в то время как при нормальной длине полиглутаминового тракта такие агрегаты не были обнаружены. Таким образом, агрегацию мутантного белка можно представить в качестве молекулярной основы хореей Генгтингтона. В связи с этим, очень важна роль молекулярных шаперонов, так как они регулируют белок-белковые взаимодействия, отвечают за правильность конформации белков, что приводит к подавлению формирования нерастворимых агрегатов и снижению токсичности [2].

Для исследования влияния шаперонов на протекание болезни нужно было создать клеточную модель данного заболевания, в которой можно было бы постепенно повышать уровень основного белка теплового шока, БТШ70, при индукции его синтеза. В качестве основы для такой модели была выбрана линия нейробластомы SK-N-SH, так как эти клетки имеют практически нулевой уровень экспрессии собственного БТШ70. Для этого в нашей лаборатории была получена стабильная клеточная линия на основе клеток SK-N-SH, трансфицированная геном БТШ70 под контролем индуцибельного металлотионеинового промотора и геном устойчивости к геницитину, и отобраны клоны.

Мы произвели анализ трёх полученных клонов: 1С5, 2С5 и 3С5. Клетки клонов обрабатывали различными концентрациями ZnSO₄ для индукции синтеза БТШ70 и подвергали ДСН-ПААГ электрофорезу и последующему иммуноблоттингу. В результате проведённого анализа было выяснено, что у клона 1С5 индукция БТШ70 при обработке ZnSO₄ не происходит, у клона 3С5 наблюдается заметный уровень БТШ70 в контрольных, не индуцированных ZnSO₄ клетках, а клон 2С5 демонстрировал нарастание уровня БТШ70 при увеличении концентрации ZnSO₄.

Для индукции заболевания Генгтингтона мы использовали временную трансфекцию плазидами, кодирующими фрагменты гена хантингтина с различным количеством остатков глутамина (Q25 и Q103), сшитые с геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Клетки анализировали спустя 72 часа после трансфекции с помощью конфокального микроскопа. В случае экспрессии фрагмента гена хантингтина с полиглутаминовым доменом нормальной длины он распределен в клетке диффузно, преимущественно в цитоплазме, в то время как мутантный хантингтин склонен к образованию нерастворимых агрегатов в ядерной или околядерной области. Применение пропидиум йодида, окрашивающего ядерный хроматин,

показывает фрагментацию хроматина в клетке, содержащей внутриядерный агрегат, что является классическим признаком апоптоза. В то же время в клетках, трансфицированных фрагментом хантингтина с 25 остатками глутамина, распределение хроматина в ядре носит равномерный характер.

Из всего вышесказанного можно заключить, что наша модель болезни вполне адекватна. Целью дальнейшей работы является исследование механизмов защитного действия БТШ70 в нейродегенеративных заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bossy-Wetzel E., Schwarzenbacher R., Lipton S.A. Nature Medicine. – 2004. – P.52-59.
2. Novoselova T.V., Margulis B.A., Novoselov S.S. Journal of Neurochemistry, 2005 94(3): P.597-606.