

На правах рукописи

КОРБОЛИНА

Елена Евгеньевна

**ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, С КОТОРЫМИ АССОЦИИРОВАНО РАЗВИТИЕ  
РАННИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ  
У КРЫС OXYS, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНГЕННЫХ ЛИНИЙ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в секторе молекулярных механизмов старения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Колосова Наталия Гориславовна**

д.б.н., профессор, зав. сектором молекулярных механизмов старения, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Дымшиц Григорий Моисеевич**

д.б.н., профессор, зав. кафедрой естественных наук Специализированного учебно-научного центра Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск

**Омельянчук Леонид Владимирович**

д.б.н., зав. лабораторией генетики клеточного цикла ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

**Ведущее Учреждение:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Института цитологии и генетики СО РАН, в конференц-зале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект акад. Лаврентьева 10.

Тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
д.б.н.

Хлебодарова Т.М.

**Актуальность темы исследования.** Увеличение положительности жизни людей в развитых странах со второй половины XX века и в результате – увеличение доли людей старших возрастов в общей численности населения, определили достижения медицины, обеспечившие снижение смертности от ассоциированных с возрастом заболеваний. Их развитие в более раннем возрасте рассматривается как проявление ускоренного старения, более позднее - становится основой успешного старения, долголетия. Необходимым условием существенного продления периода здоровой жизни людей является выяснение фундаментальных молекулярно-генетических механизмов старения и развития ассоциированных с ним заболеваний, которое позволит разработать способы их фармакологической коррекции в направлении успешного старения. Несмотря на очевидную связь продолжительности жизни с наследственностью, сведения о генетических факторах детерминации преждевременного старения крайне ограничены. Ассоциированные с возрастом заболевания имеют многофакторную природу с полигенным наследованием, и для их начального генотипирования как у людей, так и у грызунов широко используется метод анализа локусов количественного признака (quantitative trait loci или QTL-анализ). Выявлять метаболические пути и молекулярные мишени - гены, вовлеченные в этиологию и патогенез многофакторных заболеваний, или ассоциированные с предрасположенностью к ним, позволяют также исследования с изучением изменений транскриптома. Однако манифестация многих, в т.ч. нейродегенеративных заболеваний происходит позднее, чем развиваются лежащие в их основе события на молекулярном уровне, и проводить исследование на людях проблематично, в особенности на доклинических стадиях.

Уникальной моделью для исследования преждевременного старения является линия крыс OXYS, созданная селекцией и инбридингом крыс Wistar, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. Сцепленно с катарактой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе раннее развитие ретинопатии и ускоренное старение мозга, проявляющееся формированием пассивного типа поведения, ростом тревожности, нарушением способности к ассоциативному обучению. Доказано, что ретинопатия у крыс OXYS аналогична возрастной макулярной дегенерации (ВМД) у людей – нейродегенеративному заболеванию сетчатки, которое становится основной причиной потери зрения у людей старше 60 лет. Наши исследования

также показали, что нейродегенеративные изменения в сетчатке и мозге крыс OXYS во многом воспроизводят картину болезни Альцгеймера (Stefanova *et al.*, 2014). Комплексное проявление признаков старения у крыс OXYS уже в молодом возрасте предполагает общие молекулярно-генетические основы развивающихся фенотипических проявлений, однако патогенетические механизмы остаются неясными. Патогенез нейродегенеративных заболеваний тесно связан с нарушениями энергетического гомеостаза (Cabezas-Orazo *et al.*, 2015). Нарастающие с возрастом дисфункции митохондрий рассматриваются как одна из возможных причин преждевременного старения крыс OXYS, однако на момент постановки задач настоящего исследования вопрос о причинно-следственной связи между нарушением энергетического метаболизма и «запуском» процессов преждевременного старения оставался открытым.

Целью настоящей работы являлось выявление генов, с которыми ассоциировано развитие ранних нейродегенеративных изменений у крыс OXYS. Были поставлены следующие задачи:

1) Оценить возможную связь ускоренного старения крыс OXYS с нарушениями энергетического метаболизма, сравнив его состояние в мозге крыс OXYS и Wistar (контроль) методами  $P^{31}$  ЯМР-спектроскопии.

2) Провести поиск локусов на первой хромосоме, ассоциированных с развитием у крыс OXYS признаков преждевременного старения: поведенческих, ранней катаракты и ретинопатии, - методом анализа локусов количественного признака (QTL-анализа).

3) На основе генома крыс WAG (с нормальным темпом старения) сконструировать конгенные линии крыс, несущие каждая по одному из выявленных локусов первой хромосомы крыс OXYS, ассоциированных с развитием у линии-донора локуса признаков преждевременного старения. Охарактеризовать конгенных животных в сравнении с крысами родительских линий: а) по заболеваемости катарактой и ретинопатией; б) по поведению в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» и по способности обучению в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт»; в) по морфофункциональным параметрам мозга методами магниторезонансной томографии (МРТ).

4) Картировать перенесенные в сконструированные конгенные линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 локусы первой хромосомы крыс OXYS при помощи выявленных

методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq) однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

5) Выявить характерные для крыс OXYS несинонимичные относительно крыс WAG замены нуклеотидов в генах: а) расположенных в перенесенных от крыс OXYS локусах первой хромосомы у крыс OXYS и конгенных животных WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2; б) ассоциированных с развитием аутосомно-доминантной или спорадической формы болезни Альцгеймера согласно литературным данным.

6) Провести сравнение транскриптома сетчатки конгенных животных WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 и крыс OXYS методом массового параллельного секвенирования (RNA-seq); провести функциональную аннотацию дифференциально экспрессирующихся генов.

Научная новизна. В работе впервые установлено, что постнатальное развитие мозга крыс OXYS происходит на фоне характерных для адаптации к гипоксии изменений энергетического метаболизма при отсутствии дефицита высокоэнергетических фосфатов, который не проявляется и в период манифестации признаков ускоренного мозга. Выявлены два локуса количественного признака на первой хромосоме, ассоциированные с развитием у крыс OXYS ранней катаракты, ретинопатии и характерных поведенческих признаков. Их влияние на развитие исследуемых признаков доказано экспериментально созданием конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2. На основании данных массового параллельного секвенирования (RNA-seq) был проведен сравнительный анализ однонуклеотидных полиморфизмов, который позволил картировать конгенные локусы и выявить в 19-ти расположенных в них генах, а также в генах *Casp3* и *Sor11*, несинонимичные замены, потенциально ассоциированные с развитием ранней катаракты и ретинопатии у крыс OXYS и конгенных животных. Сравнение профилей экспрессии генов в сетчатке 20-дневных крыс WAG/OXYS-1.1, WAG/OXYS-1.2 и OXYS методом RNA-seq выявило функциональные группы генов, с изменением экспрессии которых может быть связано развитие у крыс OXYS ранних нейродегенеративных изменений: гены метаболического пути болезни Альцгеймера, Wnt -, и TGF- $\beta$  - сигнальных путей.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Результаты исследования вносят вклад в фундаментальные знания о молекулярно-генетических механизмах комплексного развития признаков преждевременного старения и могут быть востребованы для поиска

новых терапевтических мишеней при создании препаратов, направленных на профилактику преждевременного старения и связанных с ним заболеваний. Сконструированные в ходе работы конгенные линии крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 наряду с крысами OXYS являются уникальным инструментом для исследования механизмов развития ранних нейродегенеративных заболеваний сетчатки, в том числе - в случае их параллельного с катарактой развития.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Манифестация признаков ускоренного старения мозга крыс OXYS не связана с нарушениями энергетического метаболизма - дефицитом высокоэнергетических фосфатов.
- 2) Локусы количественного признака, расположенные на первой хромосоме, ассоциированы с развитием у крыс OXYS признаков преждевременного старения: ранней катаракты и ретинопатии.
- 3) Развитию нейродегенеративных изменений в сетчатке крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 предшествуют изменения уровня мРНК генов, ассоциированных с метаболизмом жирных кислот, липидов и ДНК, воспалительным ответом, морфогенезом кровеносных сосудов и генов, задействованных в Wnt - и TGF- $\beta$  - сигнальных путях.

Апробация работы. Полученные результаты были представлены и обсуждены на: «Фундаментальные проблемы геронтологии и гериатрии» (Санкт-Петербург, 2014), «FEBS» (Санкт-Петербург, 2013), «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2012), The XXth Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER, Берлин, 2012), «Генетика старения и продолжительности жизни» (Сыктывкар, 2008, 2010; Москва, 2012), «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), «International conference on bioinformatics of genome regulation and structure - BGRS» (Новосибирск, 2010, 2014), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 12 статей из списка журналов, рекомендованных ВАК, в отечественных (6) и международных журналах (6), а также 12 тезисов на конференциях.

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Автор принимал личное активное участие в планировании, проведении и обсуждении всех экспериментов, по результатам которых написана диссертация. Офтальмологические осмотры проводились д.м.н. А.Ж. Фурсовой, их результаты анализировались самостоятельно. Гистоморфологическое исследование сетчатки крыс проведено совместно с д.м.н. А.А. Жданкиной (СибГМУ). Аппаратные этапы массового параллельного секвенирования были проведены на базе ЗАО Генаналитика. Биоинформатический анализ данных RNA-seq выполнен в рамках совместной работы с к.б.н. Н.И. Ершовым и к.б.н. Л.О. Брызгаловым.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (742 наименований) и приложений. Работа изложена на 136 страницах, содержит 17 рисунков (16 из которых оригинальные), 7 таблиц (6 из которых оригинальные).

#### **Методы и материалы**

**Животные.** Работа выполнена на крысах линий OXYS, Wistar, WAG, крысах гибридной популяции F<sub>2</sub>, полученных в результате реципроктных скрещиваний OXYS×WAG, а также на животных сконструированных конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 на базе Центра коллективного пользования «Генофонды лабораторных животных» ИЦиГ СО РАН.

**Энергетический метаболизм мозга** исследовали, анализируя фосфорные спектры образцов кислотных экстрактов мозга, полученные с использованием метода P<sup>31</sup> ЯМР-спектроскопии на спектрометре DRXAVANCE-200 NMR (Bruker). Химические сдвиги были назначены по отношению к сигналу от внешнего контроля (85% фосфорной кислоты), интенсивности сигнала фосфорных метаболитов были представлены в процентах от интегрального P<sup>31</sup> сигнала.

**Анализ локусов количественного признака (QTL-анализ) и проверка гипотез, принятых по его результатам.** Для поиска на первой хромосоме локусов, ответственных за развитие у крыс OXYS ранней катаракты, ретинопатии и проявление характерных поведенческих признаков, применялся метод сканирования хромосомы с использованием базы 26 анонимных микросателлитных маркеров. Полиморфизм маркеров в гибридной популяции и принадлежность животных к классу гомо- или гетерозигот по аллелям маркера определялись после проведения ПЦР на геномной ДНК и электрофоретического

разделения продуктов реакции в 6-8% ПААГ. Специфические праймеры к микросателлитным последовательностям подбирались в программе OligoAnalyzer (<http://idtdna.com>). Для каждого животного гибридной популяции F<sub>2</sub> данные по характерным фенотипическим признакам и принадлежности к гаметному классу обрабатывались программами для анализа сцепления и поиска QTL MAPMAKER/QTL и MAPMAKER/EXP (Whitehead Institute, Cambridge, MA, <http://www.wi.mit.edu>). Конгенные линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 были получены переносом выявленных локусов количественного признака от линии-донора OXYS в геном линии-реципиента WAG в результате 8 последовательных возвратных скрещиваний с контролем по аллелям соответствующих микросателлитных маркеров. Доказательством ассоциации перенесенного локуса с развитием фенотипического признака служило его проявление у конгенных крыс (Rapp *et al.*, 2000).

**Поведение.** Моторно-исследовательскую активность животных оценивали в тесте «открытое поле» (Redrobe *et al.*, 2003), тревожность – в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (Sterley *et al.*, 2011), референтную память – в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт» (Takasaki *et al.*, 2011).

**Офтальмоскопические осмотры** проводили с помощью прямого офтальмоскопа "Betta" (Германия) после расширения зрачков 1% раствором тропикамида. Наличие и степень выраженности изменений хрусталиков и сетчатки оценивали в соответствии с протоколом Age-Related Eye Disease Study (AREDS, <http://eyephoto.opth.wisc.edu>).

**Морфофункциональные параметры мозга** крыс исследовали методами магниторезонансной томографии (МРТ) - спинового эха с многосрезовым сканированием -MSME (Multi Slice Multispin Echo).

**Морфологический и морфометрический анализ сетчатки животных** проводили методом световой микроскопии на микроскопе AxioScop 2 Plus (Zeiss, Германия), с использованием 5 мкм срезов стандартных парафиновых блоков, окрашенных гематоксилином и эозином.

**Массовое параллельное секвенирование (RNA-seq)** проводили на платформе Illumina GAIIx (ОАО «Геноаналитика») в соответствии со стандартными протоколами производителя.

**Биоинформатический анализ данных RNA-seq** проводили с использованием программ Bowtie 2, TopHat v2.0.4, Cutadapt, SAMtools v. 0.1.17, MySQL v. 5.0, DESeq v.



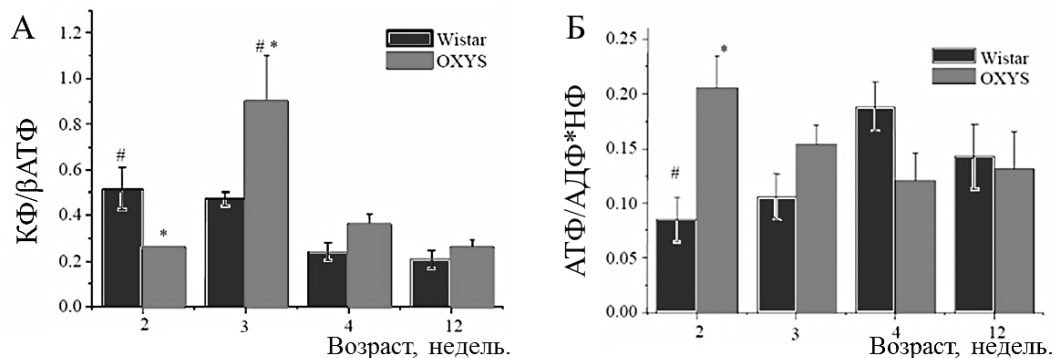
2.0. Прочтения картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* RGSC 5.0 (Ensemble release 75). Для анализа и визуализации данных использовали свободный язык программирования R; для предсказания фенотипического эффекта полиморфизмов – веб-инструмент Variant Effect Predictor tool, Ensemble.

**Статистический анализ результатов** проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Полученные данные были проанализированы с использованием факторного дисперсионного анализа (ANOVA/MANOVA) с post-hoc сравнением групповых средних в тесте Ньюмена-Кейлса (Newman-Keul), а также зависимых парных сравнений. Во всех тестах  $p < 0,05$  рассматривалось как статистически значимое.

### **Содержание работы и основные результаты**

**Состояние энергетического метаболизма в мозге крыс OXYS** оценивали в сравнении с крысами Wistar (контроль) в возрасте 2, 3, 4 и 12 недель ( $n=48$ ). Вычисляли относительные содержания фосфатных метаболитов с определением показателей, характеризующих относительное содержание креатинфосфата (КФ) и АТФ - отношения КФ/НФ и АТФ/АДФ\*НФ (фосфатный потенциал), где НФ - неорганический фосфат; а также относительную способность генерирования АТФ - отношение КФ/ $\beta$ АТФ. Ни в ранний постнатальный период, ни в возрасте 3 месяцев, к которому у крыс OXYS формируются поведенческие проявления ускоренного старения и в мозге методами МРТ регистрируются нейродегенеративные изменения, признаков дефицита высокоэнергетических соединений в мозге крыс OXYS выявлено не было. Напротив, по сравнению с крысами Wistar, в возрасте 2 недель в мозге крыс OXYS был выше фосфатный потенциал (показатель относительной доступности АТФ), а в возрасте 3 недель - содержание КФ и отношение КФ/ $\beta$ АТФ (см. рисунок 1). Выявленные изменения характерны для адаптации к гипоксии и могут отражать изменения многих метаболических путей, связанных с развитием у крыс OXYS поведенческих и когнитивных нарушений. Истощение адаптивных резервов - характерные для хронической ишемии изменения церебрального кровотока и реактивности сосудов в мозге, предполагающие развитие энергетического дефицита, характерны только для годовалых крыс OXYS (Sergeeva *et al.*, 2006, Korbolina *et al.*, 2007). Таким образом, наше исследование показало, что дисфункции митохондрий не является первопричиной преждевременного старения крыс OXYS. В мозге крыс OXYS в возрасте 2 недель

выявлены также признаки нарушения баланса процессов катаболизма и синтеза мембранных фосфолипидов по сравнению с крысами Wistar.



**Рисунок 1. Отношения содержания КФ/βАТФ (А) и фосфатный потенциал – АТФ/АДФ\*НФ – (Б) в кислотных экстрактах мозга крыс.** Данные представлены как  $M \pm S.E.M$  ( $n=5-12$ ), \* - достоверные межлинейные различия; # - достоверные различия по сравнению с возрастной группой 4 недель.

**Выявление локусов количественного признака (QTL – анализ).** На стадии предварительных исследований мы исключили моногенный тип наследования катаракты, ретинопатии и поведенческих признаков ускоренного старения крыс OXYS с помощью гибридологических скрещиваний (OXYS×WAG). Логическим продолжением работы стало проведение анализа локусов количественного признака. Исследование проводили с использованием крыс гибридной популяции  $F_2$  (самцов и самок,  $n=77$ ), полученных при реципрокном скрещивании OXYS×WAG и протестированных в возрасте 3-4-х месяцев по фенотипическим признакам преждевременного старения. Для 5 из 26 протестированных микросателлитных маркеров первой хромосомы: D1Rat196 (положение на карте хромосомы 55,1 Mb); D1Rat224 (90,3 Mb); D1Rat30 (100,6 Mb); D1Rat219 (188,0 Mb); и D1Rat81 (250,4 Mb), - соотношение двух маркерных классов гомозигот и одного класса гетерозигот в исследуемой популяции  $F_2$ , соответствовало теоретически ожидаемому при моногибридном расщеплении (1:2:1) согласно критерию  $\chi^2$ . Выявлены значимые количественные показатели сцепления (LOD score > 3) для следующих параметров: заболеваемости ретинопатией (пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 4,89, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 7,79), заболеваемости катарактой (пик

между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 3,07), латентного периода выхода в центр открытого поля (пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 43,94, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 38,86), латентного периода выхода в центр крестообразного лабиринта (пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 28,80, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 28,83), времени, проведенного в центре крестообразного лабиринта (пик между D1Rat30 и D1Rat219, LOD score 7,02, пик между D1Rat219 и D1Rat81, LOD score 5,57). По результатам QTL-анализа были сформулированы гипотезы о существовании на первой хромосоме крыс OXYS двух локусов количественного признака, ассоциированных с проявлением признаков преждевременного старения крыс OXYS, в интервалах между маркерами D1Rat30/D1Rat219 (QTL1) и D1Rat219/D1Rat81 (QTL2).

**Создание и характеристика конгенных линий крыс.** Выявленные локусы QTL1 и QTL2, маркированные аллелями длины микросателлитных последовательностей, характерными для крыс OXYS, были перенесены возвратными скрещиваниями в геном крыс WAG. Ожидалось, что у крыс WAG/OXYS-1.1 будет развиваться ретинопатия, а у крыс WAG/OXYS-1.2 – и ретинопатия, и катаракта. Однако, офтальмологические исследования показали, что в возрасте 2-3 мес у крыс обеих конгенных линий развивались и ранняя катаракта и ретинопатия (Korbolina *et al.*, 2012), что свидетельствовало в пользу влияния генов из перенесенных локусов на развитие обоих заболеваний. Показано, что заболеваемость катарактой и ретинопатией у крыс конгенных линий прогрессировала менее активно, чем у крыс OXYS. Так, признаков второй стадии ретинопатии у конгенных животных не выявлено. При этом у крыс WAG/OXYS-1.2 патологические изменения сетчатки более выражены, чем у крыс WAG/OXYS-1.1. Интересно, что при офтальмоскопическом осмотре одних и тех же крыс WAG/OXYS-1.1 выявлена ремиссия ретинопатии за период от 3 до 12 мес, что никогда не наблюдалось у крыс OXYS без медикаментозной поддержки. Можно полагать, что феномен обусловлен иным генным окружением, в частности, различиями в состоянии иммунной системы животных. Крыс OXYS отличает сниженная реактивность иммунной системы, на что указывают результаты анализа проведенного нами исследования транскриптома сетчатки крыс OXYS в возрасте 3 и 18 мес (Kozhevnikova *et al.*, 2013), а также выявленная ранее недостаточность Т-клеточного звена иммунной системы на фоне ускоренной инволюции тимуса. В пользу этой гипотезы свидетельствуют и результаты гистоморфометрического

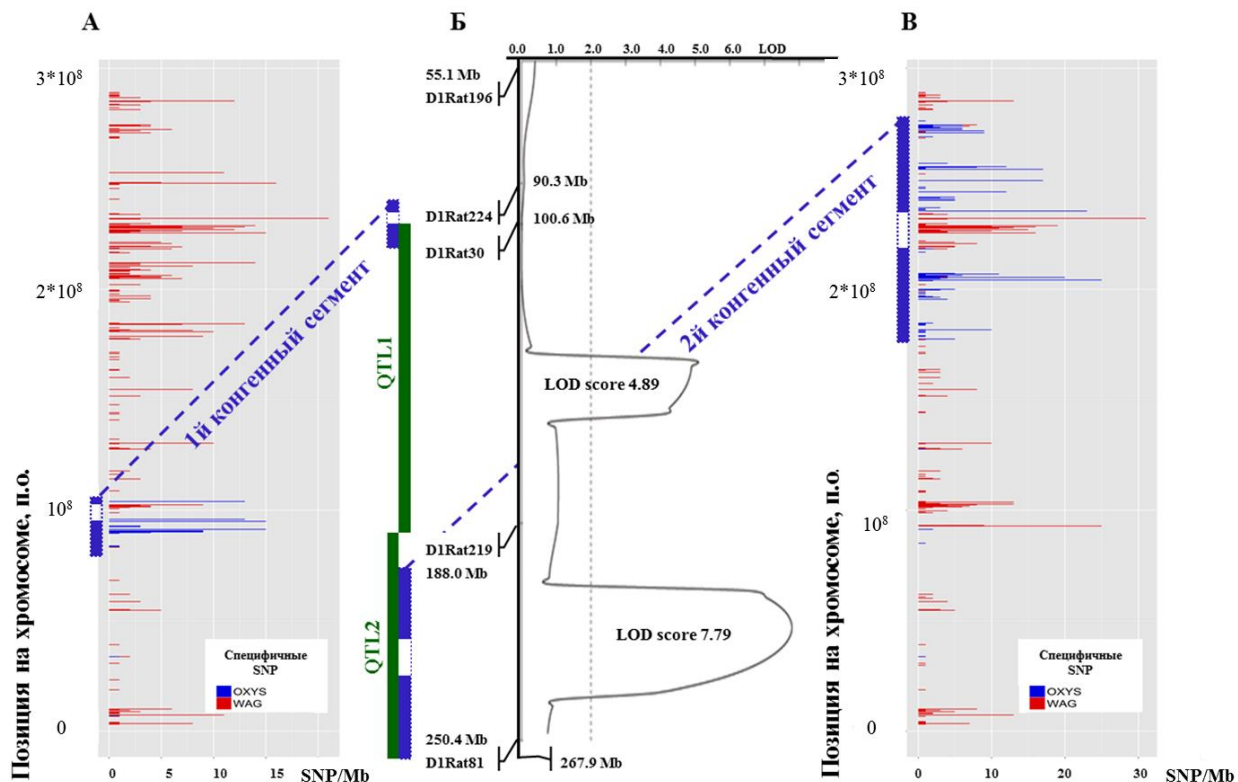
исследования, согласно которым у крыс обеих конгенных линий, в отличие от крыс OXYS, дистрофические изменения сетчатки происходят на фоне массовой миграции во внутренний сетчатый и ганглионарный слои сетчатки мононуклеарных фагоцитов. Это свидетельствует о развитии у конгенных животных полноценного воспалительного процесса, что характерно и для больных возрастной макулярной дегенерацией (Markovets *et al.*, 2011). Показано, что в возрасте 8-10 мес крысы конгенных линий отличаются от крыс OXYS по параметрам, характеризующим ретинальное кровоснабжение, при этом в сетчатке крыс линии WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 наблюдаются сходные морфологические изменения с возрастом.

Крысы линий OXYS, WAG и конгенных (n=11-15) охарактеризованы по моторно-исследовательской активности в тесте «открытое поле», и тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», в возрасте 3 мес, к которому у крыс OXYS формируется пассивный поведенческий стереотип и повышенная тревожность на фоне появления нейродегенеративных изменений в головном мозге. Установлено, что в тесте «открытое поле» поведение трёхмесячных крыс OXYS и WAG существенно различается только по параметру, характеризующему горизонтальную двигательную активность животных - количество пересеченных за время тестирования квадратов было существенно ниже у крыс OXYS ( $p < 0,05$ ). Двигательная активность крыс WAG/OXYS-1.1 была на уровне крыс WAG, крысы WAG/OXYS-1.2 по количеству пересеченных квадратов отличались от крыс OXYS ( $p = 0,0001$ ), но демонстрировали значительную вариабельность параметра. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» крысы конгенных линий по уровню тревожности (выходам в открытые рукава и времени, проведенном в них) достоверно не отличались ни от крыс WAG, ни от крыс OXYS. Референтная память крыс OXYS, WAG и конгенных животных (n=7-8, тех же групп) в возрасте 5 месяцев оценивалась по способности к обучению в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт». Количество входов в рукава лабиринта (показатель горизонтальной двигательной активности) у крыс OXYS было достоверно ниже, а количество актов груминга (показатель тревожности) – выше, чем у крыс WAG и конгенных животных ( $p < 0,05$ ). Ни в одном из периодов обучения у конгенных крыс не выявлено снижения способности к обучению по сравнению с крысами WAG. Тем не менее, при анализе совокупности

показателей поведения животных в тесте «радиальный восьмирукавный лабиринт» методом Монте-Карло обнаружены достоверные межлинейные различия ( $p < 0,01$ ).

**Исследование морфофункциональных параметров мозга.** Ранее показано, что в возрасте 12 мес. у 100% крыс OXYS присутствуют выявляемые методами МРТ нейродегенеративные изменения в головном мозге – очаги демиелинизации и гидроцефалия желудочков, отражающая дисбаланс между выработкой ликвора и его резорбцией, характерные для нейродегенеративных состояний (Stefanova *et al.*, 2015). Сравнительное исследование годовалых крыс конгенных и родительских линий выявило определенные признаки нейродегенеративных изменений у конгенных животных. Однако у них наблюдалось меньшее, чем у крыс OXYS, количество очагов демиелинизации: наиболее существенно – на порядок – в мозолистом теле ( $p < 0,001$ ) и в 2 раза - в гиппокампе ( $p < 0,091$ , на уровне тенденции). У крыс конгенных линий и крыс WAG по сравнению с крысами OXYS, увеличена ( $p < 0,001$ ) удельная площадь боковых желудочков мозга на аксиальном срезе. Значимых отличий конгенных животных от крыс WAG по морфофункциональным параметрам мозга не выявлено.

**Сравнительный анализ кодирующих однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) первой хромосомы крыс OXYS, WAG и конгенных линий** проведен на основе данных RNA-seq. Доказано, что в конгенные линии действительно перенесены локусы первой хромосомы крыс OXYS, картированные по однонуклеотидным полиморфизмам, характерным для кДНК крыс родительских линий, в положениях  $8,9 \times 10^7$ – $9,7 \times 10^7$  п.о. и  $1,04 \times 10^8$ – $1,05 \times 10^8$  п.о. для крыс WAG/OXYS-1.1;  $1,78 \times 10^8$ – $2,1 \times 10^8$  п.о. и  $2,34 \times 10^8$ – $2,75 \times 10^8$  п.о. - для крыс WAG/OXYS-1.2 (см рисунок 2). С учетом событий кроссинговера, имевших место при конструировании конгенных животных, локус, перенесенный крысам WAG/OXYS-1.2 от родительской линии OXYS соответствует локусу QTL2 (Korbolina E.E. *et al.*, 2012). В геноме крыс WAG/OXYS-1.1 выявлен локус первой хромосомы, перенесенный от крыс OXYS, но только частично соответствующий локусу QTL1. Возможно, причиной является наложение процессов кроссинговера на сопутствующий перенос ДНК-района, фланкирующего микросателлитный маркер (Rapp *et al.*, 2000). Тем не менее, развитие у крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 и ранней катаракты и ретинопатии экспериментально подтверждает значимое участие расположенных в перенесенном локусе генов в патологических процессах.



**Рисунок 2.** Распределение на первой хромосоме конгенных животных WAG/OXYS-1.1 (A) и WAG/OXYS-1.2 (B), однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных у крыс родительских линий. Красные пики соответствуют SNP, характерным для крыс WAG, синие – для OXYS. На панели Б показан график распределения статистической значимости для заболеваемости ретинопатией в гибридной популяции F<sub>2</sub> на первой хромосоме. Вертикальная пунктирная линия соответствует порогу статистической значимости (LOD=2). Зелеными прямоугольниками показаны выявленные локусы количественного признака QTL1/2, синими – картированные конгенные локусы.

**Поиск полиморфизмов (SNP), потенциально ассоциированных с развитием признаков преждевременного старения крыс OXYS,** проведен с использованием библиотеки, полученной для крыс WAG, в качестве дополнительной группы сравнения. Анализировались только уникальные прочтения, и только полиморфизмы, имеющие оценку качества не менее 100 ( $pvalue < 10^{-5}$ ), вероятность нарушения функции белкового продукта определена с использованием алгоритма SIFT. В 19-ти генах, расположенных в перенесенных от крыс OXYS локусах первой хромосомы (*Hps5*, *Cic*, *Arhgap33*, *Lin37*,

*Cebpg*, *Nudt19* у крыс WAG/OXYS-1.1; *Ccp110*, *Gtf3c1*, *Rabep2*, *Aldoa*, *Inpp5f*, *Psat1*, *Tjp2*, *Ak3*, *Ric1*, *RGD1311595*, *Sfxn3*, *Nolc1*, *Pdcd11* у крыс WAG/OXYS-1.2) а также в 2-х генах, согласно литературным данным ассоциированных с развитием спорадической формы болезни Альцгеймера (*Casp3* и *Sorl1*), у крыс OXYS были выявлены несинонимичные замены нуклеотидов относительно крыс WAG, демонстрирующих нормальные темпы старения. Замены в генах *Cic*, *Arhgap33*, и *Sorl1* потенциально способны значительно нарушать функцию итогового белкового продукта.

**Исследование транскриптома сетчатки крыс.** Показано, что фенотипическим проявлениям ассоциированных с возрастом комплексных заболеваний предшествуют и сопутствуют характерные изменения транскрипционной активности генов, что имеет особую ценность для фундаментальных исследований доклинических стадий заболеваний. Изучение изменений транскрипционного профиля сетчатки конгенных животных по сравнению с крысами родительской линии OXYS в возрасте 20 дней (на доклинической стадии развития ретинопатии) проведено с применением технологии RNA-seq. Из 26405 генов референсного генома *rn5* на 15442 гена было уникально картировано более 10 прочтений из полученных (более 40 млн. для каждой кДНК-библиотеки). С использованием данных баз GeneOntology, DAVID, PANTHER и WebGestalt, показано, что группы генов, дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) в сетчатке крыс OXYS по сравнению с крысами WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2, обогащены генами, ассоциированными в терминах генных онтологий с процессингом и презентацией антигенов, белками комплекса МНС1, лигированием ДНК в процессах репарации, ДНК-зависимой РНК-полимеразной активностью, метаболизмом липидов, воспалительным ответом, и (для обеих конгенных линий) организацией внеклеточного матрикса, что может быть как следствием особенностей забора биологического материала, так и отражением системных процессов. Принципиально важно, что направленность изменения уровней мРНК совпадающих ДЭ генов воспалительного ответа одинакова относительно крыс OXYS у крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2. Полученные данные могут служить подтверждением системности нарушений липидного метаболизма, признаки которых выявлены нами в мозге крыс OXYS методом  $P^{31}$  ЯМР-спектроскопии. Показано, что группа генов, имеющих наиболее сильные отличия в экспрессии на уровне мРНК в сетчатке крыс WAG/OXYS-1.1 по сравнению с крысами WAG/OXYS-1.2, относительно

обогащена генами, относящимися к категориям дифференцировки нейронов, развития кровеносных сосудов, мембранных рафтов, активности транскрипционных факторов; а также к метаболическому пути болезни Альцгеймера, Wnt- и TGF $\beta$ - сигнальным путям, ассоциированным с протеканием нейродегенеративных процессов, в том числе – в сетчатке, как у модельных животных, так и у человека. Для генов *Bace2*, *Wnt16*, *Mitf* (связанных с Wnt-сигнальным путем) и *Thbs4*, *Pitx2*, *Dcn* (генов TGF $\beta$ -сигнального пути) в сетчатке крыс OXYS в возрасте 20 дней выявляются однонаправленные изменения уровня соответствующих мРНК по сравнению с крысами Wistar (Telegina *et al.*, 2015, статья принята к печати). Следовательно, выявленные изменения экспрессии могут рассматриваться как предпосылки развития нейродегенеративных процессов в сетчатке.

### **Выводы**

- 1) Постнатальное развитие мозга крыс OXYS происходит на фоне характерных для адаптации к гипоксии изменений энергетического метаболизма – увеличения уровня креатинфосфата и его утилизации на синтез АТФ. Развитие признаков ускоренного старения мозга у крыс OXYS к возрасту 3 месяцев не связано с нарушением энергетического метаболизма - дефицитом высокоэнергетических фосфатов.
- 2) Методом QTL-анализа на первой хромосоме крыс OXYS выявлены локусы, ассоциированные с развитием признаков преждевременного старения: катаракты, ретинопатии и поведенческих признаков ускоренного старения мозга.
- 3) Перенос выявленных локусов в геном крыс WAG с контролем по ограничивающим локусы микросателлитным маркерам привел к развитию ранней катаракты и ретинопатии у крыс конгенных линий WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2.
- 4) По результатам анализа данных массового параллельного секвенирования (RNA-seq) картировано положение перенесенных локусов: первый –  $8,9 \times 10^7$ – $9,7 \times 10^7$  п.о./  $1,04 \times 10^8$ – $1,05 \times 10^8$  п.о. и второй –  $1,78 \times 10^8$ – $2,1 \times 10^8$  п.о./  $2,34 \times 10^8$ – $2,75 \times 10^8$  п.о. первой хромосомы.
- 5) Согласно результатам анализа данных RNA-seq специфичные для крыс OXYS несинонимичные относительно крыс WAG однонуклеотидные полиморфизмы присутствуют в последовательности кДНК 19 генов, расположенных в картированных локусах первой хромосомы, и 2-х генов, по литературным данным ассоциированных с развитием спорадической формы болезни Альцгеймера. Выявленные полиморфизмы



способны влиять на развитие комплекса признаков преждевременного старения у крыс OXYS.

- 6) Методом RNA-seq показано, что на доклинической стадии развития ретинопатии (в возрасте 20 дней) в сетчатке конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 по сравнению с крысами OXYS изменен уровень мРНК, соответственно, 80 и 226 генов, функционально связанных в том числе с организацией внеклеточного матрикса, метаболизмом жирных кислот, метаболизмом ДНК и воспалительным ответом.
- 7) Сравнительный анализ транскриптома сетчатки методом RNA-seq показал, что характерные особенности развития ретинопатии у конгенных крыс WAG/OXYS-1.1 и WAG/OXYS-1.2 формируются на фоне изменения на доклинической стадии заболевания уровня мРНК генов, ассоциированных с активностью транскрипционных факторов, морфогенезом кровеносных сосудов, межклеточными коммуникациями и передачей сигнала. Анализ метаболических путей выявил значимую представленность генов, ассоциированных с метаболическим путем болезни Альцгеймера, а также с Wnt- и TGF- $\beta$ - опосредованными сигнальными путями, задействованными в патогенезе нейродегенеративных процессов, как у модельных животных, так и у человека.

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

1. Стефанова Н.А., **Корболина Е.Е.**, Ершов Н.И., Рогаев Е.И., Колосова Н.Г. Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т.19. - №4. – С. 74-82.
2. Stefanova NA, Muraleva NA, **Korbolina EE**, Kiseleva E, Maksimova KYi, Kolosova NG. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. // Oncotarget. – 2015, Jan 30. - 6(3). – P.1396-1413.
3. **Korbolina EE**, Ershov NI, Bryzgalov LO, Kolosova NG. Application of quantitative trait locus mapping and transcriptomics to studies of the senescence-accelerated phenotype in rats. // BMC Genomics. – 2014. – 15. - Suppl 12:S3. Epub 2014 Dec 19.
4. Колосова Н. Г., Стефанова Н. А., **Корболина Е. Е.**, Фурсова А. Ж., Кожевникова О. С. Крысы OXYS — генетическая модель преждевременного старения и связанных с ним заболеваний // Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossiiskaia akademiia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo. - 2014. - Т. 27. - №2. - С. 336 – 341.

5. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., **Korbolina E.E.**, Muraleva N.A., Kolosova N.G. Senescence-accelerated OXYS rats: A model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease. Review. // *Cell Cycle*. – 2014, Feb 17. - 13(6). – P. 898-909.
6. Kozhevnikova O.S., **Korbolina E.E.**, Stefanova N.A., Muraleva N.A., Orlov Y.L., Kolosova N.G. Association of AMD-like retinopathy development with an Alzheimer's disease metabolic pathway in OXYS rats // *Biogerontology*. – 2013, Aug 20. - 14(6). - P. 753-762.
7. Kozhevnikova O.S., **Korbolina E.E.**, Ershov N.I., Kolosova N.G. Rat retinal transcriptome: Effects of aging and AMD-like retinopathy // *Cell Cycle*. – 2013. – Vol.6. – N. 12(11). – P. 1745-1761.
8. **Korbolina E.E.**, Kozhevnikova O.S., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Quantitative trait loci on chromosome 1 for cataract and AMD-like retinopathy in senescence-accelerated OXYS rats // *Aging (Albany NY)*. – 2012. – Vol.4. – N.1. – P.49-59.
9. Кожевникова О.С., Мартыщенко М.К., Генаев М.А., **Корболина Е.Е.**, Муралева Н.А., Колосова Н.Г., Орлов Ю.Л. RatDNA: база данных микрочиповых исследований на крысах для генов, ассоциированных с заболеваниями старения // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2012. – Т.16. - № 4/1. – С. 756-765.
10. Ойдопова О.С, Польшгалова Н.Е., **Корболина Е.Е.**, Колосова Н.Г. Поиск генетических детерминант преждевременного старения крыс линии OXYS // *Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossiiskaia akademiia nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo*, 2008. - Т. 21. - С. 499 – 500.
11. **Korbolina E.E.**, Agafonova I.G., Sergeeva S.V., Trofimova N.A., Mishenko N.P., Kolosova N.G. Early-life hypoxia in the development of behavioral dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats and its correction with antioxidants // *Advances in Gerontology*. - 2007. - Vol. 20. - N 3. - P. 46-48.
12. Sergeeva S., Bagryanskaya E., **Korbolina E.**, Kolosova N. Development of behavioral dysfunctions in accelerated-senescence OXYS rats is associated with early postnatal alterations in brain phosphate metabolism // *Exp Gerontol*. – 2006. – V. 41 (2). – P. 141-150.