

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- β - 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- β - 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 F₂, 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 P³¹ 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 P³¹ 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 F₂ 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/ β 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/ β 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.

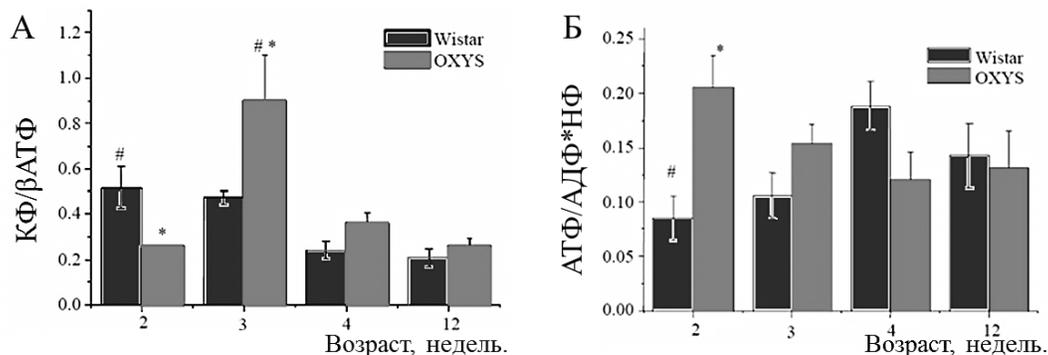


Рисунок 1. Отношения содержания КФ/βАТФ (А) и фосфатный потенциал – АТФ/АДФ*НФ – (Б) в кислотных экстрактах мозга крыс. Данные представлены как $M \pm S.E.M$ ($n=5-12$), * - достоверные межлинейные различия; # - достоверные различия по сравнению с возрастной группой 4 недель.

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 χ^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.

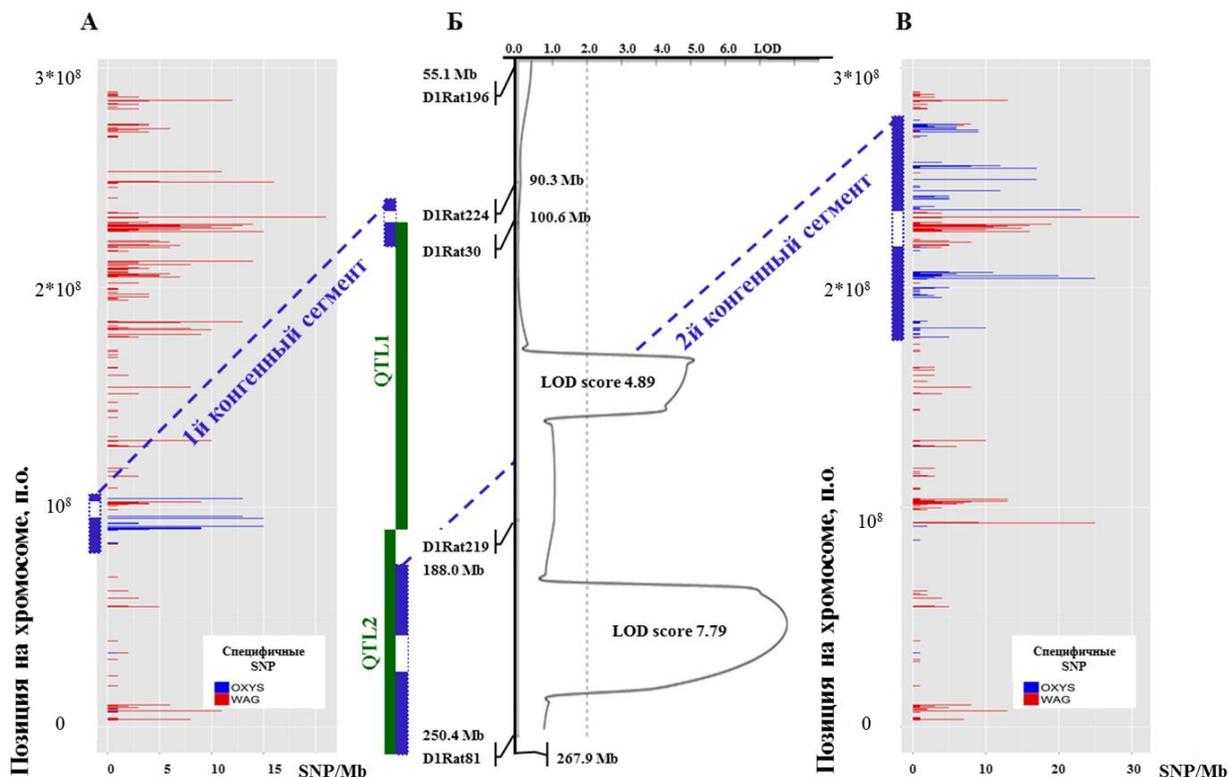


Рисунок 2. Распределение на первой хромосоме конгенных животных WAG/OXYS-1.1 (А) и WAG/OXYS-1.2 (В), однонуклеотидных полиморфизмов, специфически представленных у крыс родительских линий. Красные пики соответствуют SNP, характерным для крыс WAG, синие – для OXYS. На панели Б показан график распределения статистической значимости для заболеваемости ретинопатией в гибридной популяции F₂ 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 mpo5 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 P³¹ 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 β - 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 β -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- β - 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.