

УДК 575.1, 616.8

# Анализ генетической предрасположенности к наследственной каталепсии в мышинной модели нейропсихических заболеваний с использованием полногеномных данных

Т. В. Андреева<sup>1,2\*</sup>, Ф. Е. Гусев<sup>1,2</sup>, Н. А. Синякова<sup>3</sup>, А. В. Куликов<sup>3</sup>, А. П. Григоренко<sup>2</sup>, И. Ю. Адрианова<sup>2</sup>, Д. В. Базовкина<sup>4</sup>, Е. И. Рогов<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Научный центр генетики и наук о жизни, Университет «Сириус», Сочи, 354340 Россия

<sup>2</sup>Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Отдел геномики и генетики человека, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор генетических коллекций нейропатологий, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>4</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Лаборатория нейрогеномики поведения, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>5</sup>Медицинская школа Чан Массачусетского университета, Департамент психиатрии, Шрусбери, 01545 США Массачусетс, США

\*E-mail: an\_tati@vigg.ru, Evgeny.Rogaev@umassmed.edu

Поступила в редакцию 12.12.2022

Принята к печати 23.01.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11875

**РЕФЕРАТ** Каталепсия – это особое состояние организма, сопровождающее тяжелые нейропсихические патологии, включая шизофрению, депрессивные расстройства, болезнь Паркинсона. У некоторых линий мышей каталепсия может быть вызвана зажиманием кожи загривка. Ранее методом анализа сцепления участок 105–115 млн п.н. на хромосоме 13 был определен как главный локус наследственной щипковой каталепсии у мышей. С целью поиска вероятных генов-кандидатов каталепсии мы провели полногеномное секвенирование мышей из линий, склонных и устойчивых к щипковой каталепсии. Нами установлено, что главный локус каталепсии ограничен участком 103.92–106.16 млн п.н. Гомологичный локус в геноме человека расположен на хромосоме 5 и содержит генетические и эпигенетические маркеры, ассоциированные с шизофренией. Кроме того, нами выявлен миссенс-вариант в гене *Nln* у мышей из линий, склонных к каталепсии. *Nln* кодирует фермент нейролизин, участвующий в расщеплении нейротензина – пептида, индуцирующего эпилепсию у мышей. Полученные данные указывают на *Nln* как на наиболее вероятный ген-кандидат, связанный со щипковой каталепсией у мышей, и на общие механизмы развития каталепсии у мышей и нейропсихических патологий у человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** каталепсия, мышшь, геном, мозг, нейролизин.

## ВВЕДЕНИЕ

Каталепсия – естественное состояние организма, характеризующееся длительной реакцией замирания и неспособностью изменить принятую позу, представляет собой одну из форм пассивно-оборонительного поведения и встречается у большинства позвоночных. У человека каталепсия утратила свою защитную функцию и является симптомом ряда тя-

желых нейропсихических патологий, таких, как шизофрения и депрессия [1, 2].

Каталепсия у грызунов может быть вызвана блокадой дофаминовых D2-рецепторов нейролептиками, такими, как галоперидол или морфин [3–6]. Немедикаментозная (щипковая) каталепсия у мышей (Дополнительный файл 1. Мышь со щипковой каталепсией (видеофайл) см. по ссылке <https://>

evolgenomics.org/catalepsy/) может быть вызвана зажиманием кожи загривка [7], при этом предрасположенность разных линий мышей к данному типу катаlepsии значительно различается. Мыши наиболее распространенных инбредных линий, таких, как C57BL/6J, DBA/2, AKR/J, устойчивы к щипковой катаlepsии, тогда как около 50% мышей линии CBA/Lac демонстрируют наследственную катаlepsию [8–11].

Главный локус наследственной катаlepsии у мышей был недавно картирован методами QTL-анализа в дистальной части (61–70 cM) хромосомы 13 [12]. Генетическое сцепление подтверждено экспериментами по селективному скрещиванию [13] и путем переноса дистального фрагмента хромосомы 13, расположенного между генетическими маркерами D13Mit74 и D13Mit214, из линии CBA в геном устойчивой к катаlepsии линии AKR. Около 50% мышей конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 проявляли выраженную катаlepsию, как и мыши линии CBA [10]. Линия ASC/Icg (антидепрессант-чувствительная катаlepsия) была создана путем селективного возвратного скрещивания CBA × (CBA × AKR) и отбора мышей, склонных к катаlepsии. Показано, что наследственная катаlepsия у мышей линии CBA ассоциирована с депрессивноподобными чертами и чувствительностью к хронической терапии антидепрессантами [2, 9, 11, 14]. Около 80–85% мышей ASC проявляют катаlepsию [13], но гены, ответственные за щипковую катаlepsию, в этой линии все еще не выявлены.

Мы провели полногеномное секвенирование устойчивых к катаlepsии (AKR/J) и склонных к катаlepsии линий мышей (CBA, AKR.CBA-D13Mit76 и ASC) для поиска предполагаемых генов-кандидатов или хромосомных локусов, связанных с развитием наследственной щипковой катаlepsии у мышей.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

В работе использовали мышей из устойчивых (AKR/J) и предрасположенных к катаlepsии (CBA/LacJ) линий, более 50 лет содержавшихся в Институте цитологии и генетики (Новосибирск, Россия), а также животных из конгенной AKR.CBA-D13Mit76 линии с CBA-производным фрагментом хромосомы 13, содержащим главный ген катаlepsии, который был перенесен в геном AKR, и мышей из линии ASC с наследственной предрасположенностью к катаlepsии. Проведение исследований одобрено Этическим комитетом Института цитологии и генетики РАН, все экспери-

ментальные процедуры соответствовали Директиве Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 года (86/609/ЕЕС). Животных тестировали на катаlepsию (в том числе AKR/J на отсутствие катаlepsии), как описано ранее [15]: тест считали положительным, если мышь сохраняла неизменной позу не менее 20 с. Для анализа отбирали животных с положительной реакцией на щипок (за исключением контрольной линии AKR).

### Полногеномное секвенирование

Геномную ДНК выделяли из фрагментов длиной 3–4 мм хвостов мышей. По фрагменту хвоста от одного животного использовали для выделения ДНК из линий AKR и D13Mit76C; по два хвоста использовали для выделения ДНК из животных линий ASC и CBA. ДНК очищали с использованием колонок QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Hilden, ФРГ). 1.5 мкг геномной ДНК использовали для подготовки фрагментных геномных библиотек с использованием набора TruSeq DNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Приготовленные фрагментные библиотеки со средней длиной вставки 350 п.н. были секвенированы на платформе Illumina HiSeq2000 в режиме парных прочтений длиной 101 н. Полученные в результате секвенирования геномные данные депонированы в базу NCBI SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, PRJNA900682).

### Анализ данных секвенирования и статистика

Прочтения, полученные в результате секвенирования, картировали на референсный геном мыши (GRCm38/mm10) с использованием программ BWA v. 0.7.17 [16] и Sarek v.2.7.1 [17]. ПЦР-дубликаты маркировали с помощью инструмента Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Генетические варианты были предсказаны с использованием программного пакета GATK v.4.1.7.0 [18] и аннотированы с помощью VEP [19]. Предсказание структурных вариантов выполнено с помощью Manta 1.6.0 [20]. В результате секвенирования получено среднее геномное покрытие каждого образца 17–33× (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Точное картирование главного локуса щипковой катаlepsии мышей

Наследственная катаlepsия, как показано ранее, является гомозиготным рецессивным состоянием [8], поэтому для поиска генов-кандидатов катаlepsии мы использовали только гомозиготные варианты, обнаруженные в дистальном фрагменте хромосомы 13 у мышей всех трех линий, предрасположенных

**Таблица 1.** Статистика геномного секвенирования мышей четырех линий

Образец (линия)	Число прочтений	Прочтения, картированные на геном мыши (Grem38/mm10), %	Среднее геномное покрытие
HT76	561995272	99.56	19 ×
ASC	720038088	99.35	23 ×
СВА	555706906	97.95	17 ×
AKR	986011514	99.49	33 ×

к катаlepsии (СВА, D13Mit76С и ASC), и отсутствующие у мышей линии АКР.

Ранее показали, что основной локус, связанный со щипковой катаlepsией у мышей, расположен на дистальном конце хромосомы 13 мыши. Этот фрагмент, маркированный D13Mit76, был перенесен из линии СВА в линию АКР, что привело к созданию рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76. С помощью метода микросателлитного картирования основной ген катаlepsии был картирован между 105.8 и 115.3 млн п.н. хромосомы 13 мыши [10]. Однако границы перенесенного фрагмента могут быть определены неточно в связи с недостаточно высокой разрешающей способностью использованного метода. Чтобы уточнить координаты основного локуса катаlepsии, мы проанализировали распределение родительских (АКР и СВА-специфических) гомозиготных вариантов в линиях ASC и АКР.СВА-D13Mit76 на дистальном фрагменте хромосомы 13 с использованием данных геномного секвенирования и обнаружили гомозиготные варианты, специфичные для линии СВА, на участке 103.92–106.16 млн п.н. как в линии ASC, так и у мыши из линии АКР.СВА-D13Mit76.

Нами определено, что этот локус на хромосоме 13 мыши гомологичен участку 63.24–65.93 млн п.н. на хромосоме 15 человека (в соответствии с версией GRCh38 генома человека). С использованием данных полногеномного анализа ассоциаций, представленных в базе GWAS Catalog [21], мы выявили статистически строго значимые ассоциации полиморфных вариантов в этом локусе с когнитивными и образовательными способностями ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ), а также нестрогие значимые ассоциации ( $P < 10^{-6}$ ) с шизофренией и депрессивными расстройствами (Дополнительная таблица S1. Генетические ассоциации хромосомного локуса в геноме человека, гомологичного главному локусу катаlepsии у мыши).

Нами также проведен анализ данных ацетилирования маркера активного энхансера – гистона H3K27ac – в мозге пациентов с шизофренией [22]. Обнаружено изменение эпигенетического статуса пяти из 76 энхансеров в нейрональных клетках префронтальной коры в локусе хромосомы 15 человека при шизофрении, а также семи из 114 энхансеров тотальной ткани префронтальной коры человека (Дополнительная таблица S2. Изменения эпигенетического статуса энхансеров (H3K27ac), выявленные при шизофрении в локусе, гомологичном главному локусу катаlepsии у мышей). В целом, эти данные позволяют предположить общие молекулярные механизмы щипковой катаlepsии у мышей и нейропсихических патологий у человека.

### Кодирующие варианты в локусе хромосомы 13, сцепленном с катаlepsией

Всего в главном локусе наследственной щипковой катаlepsии мышей выявлены 13147 полиморфных геномных позиций, содержащих однонуклеотидные замены или короткие инсерционно-делеционные варианты. Среди них 6087 вариантов представлены в гомозиготном состоянии во всех трех секвенированных геномах линий мышей, склонных к катаlepsии, и отсутствуют в некатаlepsической линии (Дополнительная таблица S3. Однонуклеотидные варианты, выявленные в главном локусе катаlepsии у мыши). В этом локусе обнаружены также 239 структурных вариантов, из которых 21 вариант специфичен для мышей из линий, склонных к катаlepsии (обнаружены во всех трех линиях и отсутствуют в геноме мыши АКР), но ни один из структурных вариантов не изменяет белок-кодирующую последовательность (Дополнительная таблица S4. Структурные варианты, выявленные в главном локусе катаlepsии у мыши).

Мы проанализировали однонуклеотидные замены в белок-кодирующих участках локуса, сцепленного с катаlepsией, и обнаружили, что девять из них приводят к изменению аминокислотной последовательности соответствующих белков у мышей, склонных к катаlepsии, по сравнению с мышью линии АКР без катаlepsии (табл. 2). Дополнительно мы провели анализ этих девяти вариантов в референсных геномах 14 линий мышей, представленных в GenBank (линии DBA\_2J\_v3, BALB\_cJ\_v3, A\_J\_v3, СВА\_J\_v3, C3H\_HeJ\_v3, АКР\_J\_v3, NOD\_ShiLtJ\_v3, FVB\_NJ\_v3, Mm\_Celera, LP\_J\_v1, PWK\_PhJ\_v3, WSB\_EiJ\_v3, CAST\_EiJ\_v3, C57BL/6J), включая известные линии устойчивых (C57BL/6J, DBA/1J) и склонных к катаlepsии (C3H/HeJ, A/He, BALB/cLac) мышей [8]. В геноме линии C3H/HeJ, мыши которой склонны к катаlepsии, выявлены все

**Таблица 2.** Гомозиготные миссенс-варианты в главном локусе щипковой каталепсии мышей на хромосоме 13, выявленные в секвенированных геномах мышей трех линий, предрасположенных к каталепсии, и отсутствующие в геноме мыши из устойчивой к каталепсии линии

Вариант	Идентификатор	Ген	Аминокислотная замена	Эффект, предсказанный с помощью SIFT [23]
13:104069202 T/C	rs50518036	<i>Nln</i>	H148R	tolerated(0.35)
13:104111134 G/A	rs51459950	<i>Sgtb</i>	C7Y	deleterious(0.01)
13:104111173 A/G	rs50301687	<i>Sgtb</i>	N20S	tolerated(0.99)
13:104174454 T/C	rs51569005	<i>Shld3</i>	I150V	tolerated(0.41)
13:104174470 G/T	rs219600951	<i>Shld3</i>	S144R	tolerated(0.68)
13:104220239 T/C	rs221133823	<i>Ppwd1</i>	E256G	tolerated(0.23)
13:104220303 A/G	rs49763463	<i>Ppwd1</i>	Y235H	tolerated(0.11)
13:104230784 G/T	rs48594661	<i>Cenpk</i>	V43L	tolerated(1)
13:104312759 T/A	rs45772491	<i>Adamts6</i>	S226T	tolerated(0.29)

девять миссенс-вариантов, как и в линии СВА, однако в двух других линиях мышей с каталепсией (А/Не, BALB/cJ) присутствует только один из этих вариантов – замена His146Arg в гене *Nln*. Таким образом, в главном локусе щипковой каталепсии мышей на хромосоме 13 выявлена единственная замена T > C (rs50518036) в кодирующей области гена нейролизина *Nln*, присутствующая у всех исследованных мышей из линий СВА, АКР.СВА-D13Mit76 и ASC, а также в геномах мышей из линий СЗН/HeJ, А/Не, BALB/cJ из GenBank, склонных к каталепсии, и отсутствующая в геномах мышей, устойчивых к каталепсии (линии АКР/J, С57BL/6J, DBA/1J).

Нейролизин – это металлоэндопептидаза, участвующая в деградации нейротензина и брадикинина, которые являются фармакологическими индукторами каталепсии у мышей [24–27]. Во всех линиях мышей, склонных к каталепсии, в положении 146 продукта гена *Nln* присутствует гистидин, в то время как устойчивые к каталепсии линии, включая АКР, содержат аргинин. Данные, свидетельствующие о связи вариантов в гене *Nln* с каталепсией, ранее не были получены, однако продукт этого гена участвует в расщеплении нейротензина, который может вызывать каталепсию у мышей [24]. Таким образом, ген *Nln* является наиболее вероятным кандидатом на роль основного гена наследственной щипковой каталепсии у мышей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате полногеномного секвенирования склонных и устойчивых к каталепсии линий мы-

шей мы показали, что связанный со щипковой каталепсией участок хромосомы 13 расположен в области 103.92–106.16 млн п.н., а также выявили мутацию в гене нейролизина *Nln*, сцепленную с каталепсией. Главный ген каталепсии, по результатам проведенных ранее исследований, определяет около 20% пенетрантности признака [10]. Принимая во внимание, что каталепсия проявляется у 50% мышей рекомбинантной линии D13Mit76 и у 80% животных склонной к каталепсии линии ASC, оставшаяся пенетрантность признака, вероятно, является результатом влияния генов и/или регуляторных локусов на других хромосомах. Полученные нами на мышинных моделях полногеномные данные наследуемых особенностей поведения, которые у человека являются характерными симптомами таких заболеваний, как шизофрения и депрессивные расстройства, могут в дальнейшем использоваться для идентификации генетических и эпигенетических факторов психических расстройств у человека. ●

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФ № 19-75-30039 (биоинформатический анализ баз данных и регуляторных локусов генома человека).

Дополнительный материал к этой статье можно найти онлайн по ссылке <https://evolgenomics.org/catalepsy/>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singerman B., Raheja R. // *Ann. Clin. Psychiatry*. 1994. V. 6. № 4. P. 259–266.
2. Kolpakov V.G., Gilinsky M.A., Alekhina T.A., Barykina N.N., Nikulina E.M., Voitenko N.N., Kulikov A.V., Shtilman N.I. // *Behav. Processes*. 1987. V. 14. № 3. P. 319–341.
3. Sanberg P.R., Bunsey M.D., Giordano M., Norman A.B. // *Behav. Neurosci*. 1988. V. 102. № 5. P. 748–759.
4. Klemm W.R. // *Prog. Neurobiol*. 1989. V. 32. № 5. P. 403–422.
5. VanderWende C., Spoerlein M.T. // *Neuropharmacology*. 1979. V. 18. № 7. P. 633–637.
6. de Ryck M., Teitelbaum P. // *Behav. Neurosci*. 1984. V. 98. № 2. P. 243–261.
7. Ornstein K., Amir S. // *J. Comp. Physiol. Psychol*. 1981. V. 95. № 5. P. 827–835.
8. Kulikov A.V., Kozlachkova E.Y., Maslova G.B., Popova N.K. // *Behav. Genet*. 1993. V. 23. № 4. P. 379–384.
9. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 9. С. 1222–1228.
10. Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. // *Genes. Brain. Behav*. 2008. V. 7. № 4. P. 506–512.
11. Tikhonova M.A., Kulikov A.V. // *Chin. J. Physiol*. 2012. V. 55. № 4. P. 284–293.
12. Куликов А.В., Базовкина Д.В., Муазан М.П., Мормэд П. // Доклады РАН. 2003. Т. 293. С. 134–137.
13. Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. // *Genes. Brain. Behav*. 2006. V. 5. № 8. P. 596–601.
14. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. // *Генетика*. 1989. Т. 25. № 8. С. 1402–1408.
15. Kulikov A.V., Kozlachkova E.Y., Kudryavtseva N.N., Popova N.K. // *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1995. V. 50. № 3. P. 431–435.
16. Li H., Durbin R. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 14. P. 1754–1760.
17. Garcia M., Juhos S., Larsson M., Olason P.I., Martin M., Eisfeldt J., DiLorenzo S., Sandgren J., Diaz De Ståhl T., Ewels P., et al. // *F1000Research*. 2020. V. 9. P. 63.
18. McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytzky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., et al. // *Genome Res*. 2010. V. 20. № 9. P. 1297–1303.
19. McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Singh Riat H., Ritchie G.R.S., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. // *Genome Biol*. 2016. V. 17. № 122. P. 1–14.
20. Chen X., Schulz-Trieglaff O., Shaw R., Barnes B., Schlesinger F., Källberg M., Cox A.J., Kruglyak S., Saunders C.T. // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. № 8. P. 1220–1222.
21. Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M., Harris L.W., Hayhurst J., Malangone C., McMahon A., Morales J., Mountjoy E., Sollis E., et al. // *Nucl. Acids Res*. 2019. V. 47. № D1. P. 1005–1012.
22. Girdhar K., Hoffman G.E., Bendl J., Rahman S., Dong P., Liao W., Hauberg M.E., Sloofman L., Brown L, Devillers O., et al. // *Nat. Neurosci*. 2022. V. 25. № 4. P. 474–483.
23. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
24. Dunn A.J., Snijders R., Hurd R.W., Kramarcy N.R. // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1982. V. 400. № 1. P. 345–353.
25. Snuders R., Kramarcy N.R., Hurd R.W., Nemeroff C.B., Dunn A.J. // *Neuropharmacology*. 1982. V. 21. № 5. P. 465–468.
26. Bhattacharya S.K., Rao P.J.R.M., Brumleve S.J., Parmar S.S. // *Pharm. Res*. 1986. V. 3. № 3. P. 162–166.
27. Dixon A.K. // *Br. J. Med. Psychol*. 1998. V. 71. № 4. P. 417–445.