

Однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с развитием фенотипа преждевременного старения у крыс OXYS

Девяткин В.*, Редина О., Колосова Н., Муралёва Н.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

* devyatkin@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: крысы OXYS; SNP; гипертензия; болезнь Альцгеймера; старение; возраст-зависимые заболевания

Мотивация и цель: Старение – основной фактор риска возраст-зависимых заболеваний, распространённость которых растёт на фоне увеличения продолжительности жизни. Их развитие в более раннем возрасте является проявлением преждевременного старения, более позднее становится основой успешного старения, долголетия. Более 60 % людей в возрасте старше 65 лет страдают несколькими заболеваниями, «набор» и возраст манифестации которых определяют генетические и экологические факторы, качество жизни. Известно, что артериальная гипертензия, которой страдает 7 % людей в возрасте до 40 лет и две трети – старше 60 лет, способствует развитию болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД) – неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, которые зачастую развиваются одновременно. Генетические основы предрасположенности к развитию коморбидных возраст-зависимых состояний остаются не ясными. Продуктивным подходом к изучению их природы является использование биологических моделей, генетическая однородность и стандартные условия содержания которых снижают влияние внешних факторов и повышают воспроизводимость результатов. Целью настоящей работы был поиск нуклеотидных вариантов, с которыми связано раннее развитие сходного с гериатрическими заболеваниями человека фенотипа у крыс линии OXYS (ИЦиГ СО РАН) – уникальной модели преждевременного старения. На фоне умеренно повышенного кровяного давления у крыс OXYS развиваются катаракта, кардиомиопатия, ретинопатия, аналогичная ВМД у людей, и ключевые признаки БА при отсутствии мутаций в генах *App*, *Psen1* и *Psen2*, специфичных для наследственной формы заболевания.

Методы и алгоритмы: Анализировали данные RNA-seq, полученные ранее для образцов префронтальной коры, гиппокампа и сетчатки крыс OXYS. Риды картировали на сборку референсного генома Rnор 6.0. Из выявленных полиморфных вариантов с минимальным качеством картирования, равным 100, были выбраны позиции, генотип которых находился в гомозиготном состоянии по меньшей мере у трёх животных в одной экспериментальной группе. Глубина чтения (DP) должна быть ≥ 10 по крайней мере у одного животного.

Выявленные у крыс OXYS SNPs сравнивались с данными геномного и транскриптомного секвенирования 45 других линий крыс, сравнение проводили только по локусам, секвенированным в транскриптомном анализе крыс OXYS.

Результаты: Сравнение данных транскриптомов префронтальной коры, гиппокампа и сетчатки крыс OXYS с референсным геномом крыс BN/NHsdMcwi выявило 42478 SNPs в 9903 генах, из них 40373 SNP в 9699 генах были также выявлены в последовательностях геномов 11 линий/сублиний, использующихся в качестве нормотензивного контроля, и 22 линий/сублиний крыс с фенотипом, не связанным с артериальной гипертензией или старением. Среди оставшихся 2105 SNP проведен поиск генетических вариантов, которые могут влиять на проявление фенотипа преждевременного старения у крыс OXYS. Гены, несущие мутации у крыс OXYS, связаны с процессингом и презентацией антигенов, ростом клеток при развитии, положительной регуляцией локализации белка в клетке, регуляцией связывающих белков, процессами в многоклеточном организме, клеточным старением, главным комплексом гистосовместимости I и фагосомами. Выявлено семь нуклеотидных замен, способных оказывать значительный эффект на структуру транскрипта. Наиболее существенно укороченные белки ожидаются для *Rims2*, *Lemd2*, *Slc25a36l1* и *AABR07045405.1*, в первых трёх из них ожидается потеря функционально значимых доменов. В первом экзоне двух последних генов происходит сдвиг рамки считывания, что также может привести к накоплению дефектного белкового продукта. Продукт гена *Slc25a36l1* содержит домен, сходный с суперсемейством митохондриальных переносчиков, которые участвуют в транспорте пиримидиновых нуклеотидов для синтеза митохондриальной ДНК. Таким образом, SNP в гене *Slc25a36l1* может быть вовлечен в дисфункцию митохондрий, которая рассматривается как вероятная причина преждевременного старения крыс OXYS.

В ожидаемом белковом продукте гена *Rims2* у крыс OXYS отсутствуют несколько сайтов фосфорилирования серина. Этот ген ассоциирован с наследственными заболеваниями сетчатки и риском возраст-зависимых заболеваний. Мутации в гене *Lemd2*, кодирующем белок ядерной оболочки, могут приводить к гибели эмбриона или к формированию фенотипа, который включает ювенильную катаракту, наследственную дилатационную кардиомиопатию, ремоделирование хроматина и ускоренное старение сердечной ткани. Недавно показано, что мутации в гене *LEMD2* могут приводить к развитию прогероидного фенотипа у людей. Полиморфизм в этом гене у крыс OXYS потенциально приводит к сдвигу рамки считывания, преждевременному стоп-кодону и потенциальной потере одного из двух трансмембранных доменов. Как показал вестерн-блот анализ, в префронтальной коре и гиппокампе крыс OXYS присутствует только полноразмерный белковый продукт гена *Lemd2*, хотя его уровень снижен по сравнению с крысами Wistar на протяжении всей жизни.

В соответствие с алгоритмом SIFT, 33 SNPs крыс OXYS, отсутствующие у нормотензивных линий, предположительно способны приводить к изменению структуры и/или функции белка и могут рассматриваться как вероятные кандидаты, с которыми связано развитие фенотипа преждевременного старения. Среди них два гена (*Acat2* и *Ephx1*) ассоциированы со старением, группа из 10 генов (*Plagr1*, *Zmym6*, *Trappc9*, *Nqo2*, *Ephx1*, *Ano10*, *Chrna5*, *Man2c1*, *Pcm1* и *LOC100364500*) связана с нейродегенеративными заболеваниями, и ген *Ephx1* – с артериальной гипертензией.

Анализ генетического сходства, основанный на идентифицированных SNP, показал, что генетически крысы OXYS наиболее близки к линии крыс ISIAH/Icgn (она также происходит из крыс Wistar/Icgn), чем к другим гипертензивным линиям

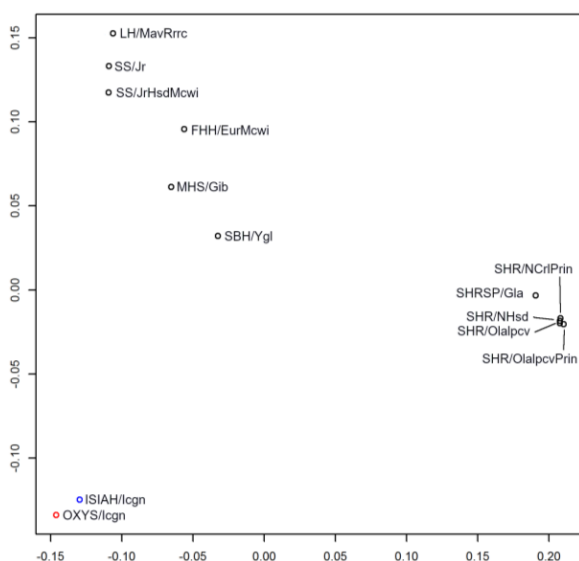


Рис. 1. Анализ расстояний между крысами OXYS/Icgn и 12 гипертензивными линиями крыс

гипертензией. Высокий титр PLA2R1 в сыворотке обнаружен у пациентов с диабетом 1 типа, диабетической ретинопатией, артериальной гипертензией и нефротическим синдромом. Белок, кодируемый геном *Ccdc28b*, ассоциирован с синдромом Барде–Бидля, аутосомно-рецессивным расстройством, включающим дегенерацию сетчатки, ожирение, когнитивные нарушения, умственную отсталость, почечные расстройства и гипертензию.

Выводы: Таким образом, выявленные у крыс OXYS SNPs могут способствовать как развитию у крыс OXYS умеренной гипертензии, так и фенотипа преждевременного старения в целом, в том числе – признаков БА и ВМД. В то же время мы не выявили мутаций, которые могли бы однозначно определять данный фенотип, что свидетельствует либо о совокупном действии множественных генных нарушений, либо о факторах, не связанных с мутациями в кодирующих регионах генома крыс OXYS. Линия крыс OXYS и другие исследованные нами линии имеют мало общих мутаций, что указывает на собственные механизмы развития патологии у крыс OXYS, отличающие их даже от генетически близких крыс ISIAH/Icgn.

Финансирование: Исследование поддержано государственным бюджетным проектом (№ FWNR-2022-0016).

Single nucleotide polymorphisms associated with the development of accelerated aging phenotype in OXYS rats

Devyatkin V.*, Redina O., Kolosova N., Muraleva N.

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* devyatkin@bionet.nsc.ru

Key words: OXYS rats; SNP; hypertension; Alzheimer's disease; aging; age-related diseases

и сублиниям крыс (рис. 1). Среди 2105 SNPs, выявленных у крыс OXYS, 725 встречались также у одной или нескольких гипертензивных линий крыс. Из них 663 были общими для крыс OXYS и НИСАГ и не были обнаружены у других крыс с гипертензией. Среди генов с данными мутациями наиболее интересен ген эпоксидгидролазы 1, который ассоциирован с гипертензией, а также коррелирует с нейродегенеративными заболеваниями и психическими расстройствами. SNP в генах *Pla2r1* и *Ccdc28b* являются наиболее распространенными у гипертензивных крыс и расположены в генетических локусах, ассоциированных с

Motivation and Aim: Aging is a major risk factor for age-related diseases, the prevalence of which is increasing as life expectancy increases. Their development at an earlier age is a manifestation of premature aging; later development becomes the basis for successful aging and longevity. More than 60 % of people over the age of 65 suffer from several diseases, the “set” and age of manifestation of which are determined by genetic and environmental factors and quality of life. It is known that arterial hypertension, which affects 7 % of people under the age of 40 and two thirds of people over 60, contributes to the development of Alzheimer's disease (AD) and age-related macular degeneration (AMD) – incurable neurodegenerative diseases that often develop simultaneously. The genetic basis of predisposition to the development of comorbid age-related conditions remains unclear. A productive approach to studying its nature is the use of biological models, the genetic homogeneity of which and standard maintenance conditions reduce the influence of external factors and increase the reproducibility of results. The goal of this work was to search for nucleotide variants that are associated with the early development of a phenotype similar to human geriatric diseases in OXYS rats (ICG SB RAS), a unique model of accelerated aging. With mildly elevated blood pressure, OXYS rats develop cataracts, cardiomyopathy, retinopathy similar to AMD in humans, and key features of AD in the absence of mutations in the *App*, *Psen1*, and *Psen2* genes specific to the inherited form of the disease.

Methods and Algorithms: We analyzed RNA-seq data obtained previously from samples of the prefrontal cortex, hippocampus, and retina of OXYS rats. Reads were mapped to the Rnor 6.0 reference genome assembly. From the identified polymorphic variants with a minimum mapping quality of 100, positions were selected whose genotype was in a homozygous state in at least three animals in one experimental group. Reading depth (DP) must be ≥ 10 in at least one animal.

The SNPs identified in OXYS rats were compared with genomic and transcriptomic sequencing data from 45 other rat strains; comparisons were made only for loci sequenced in the transcriptomic analysis of OXYS rats.

Results: Comparison of transcriptome data from the prefrontal cortex, hippocampus and retina of OXYS rats with the reference genome of BN/NHsdMcwi rats revealed 42478 SNPs in 9903 genes, of which 40373 SNPs in 9699 genes were also identified in the genome sequences of 11 strains/substrains used as normotensive controls, and 22 strains/substrains of rats with a phenotype not associated with arterial hypertension or aging. Among the remaining 2105 SNPs, a search was conducted for genetic variants that may influence the manifestation of the accelerated aging phenotype in OXYS rats. Genes carrying mutations in OXYS rats are associated with antigen processing and presentation, cell growth during development, positive regulation of protein localization in the cell, regulation of binding proteins, processes in a multicellular organism, cellular senescence, major histocompatibility complex I and phagosomes.

Seven nucleotide substitutions were identified that can have a significant effect on the structure of the transcript. The most significantly truncated proteins are expected for *Rims2*, *Lemd2*, *Slc25a36l1* and *AABR07045405.1*; in the first three of them, loss of functionally significant domains is expected. Frameshift occurs in the first exon of the last two genes, which can also lead to the accumulation of a defective protein product. The *Slc25a36l1* gene product contains a domain similar to the superfamily of mitochondrial transporters that are involved in the transport of pyrimidine nucleotides for mitochondrial DNA synthesis. Thus, the SNP in the *Slc25a36l1* gene may be

involved in mitochondrial dysfunction, which is considered a likely cause of accelerated aging in OXYS rats.

The expected protein product of the *Rims2* gene in OXYS rats lacks several serine phosphorylation sites. This gene is associated with hereditary retinal diseases and the risk of age-related diseases. Mutations in the *Lemd2* gene, which encodes a nuclear envelope protein, can lead to embryonic death or a phenotype that includes juvenile cataracts, hereditary dilated cardiomyopathy, chromatin remodeling and accelerated aging of cardiac tissue. Recently, it was shown that mutations in the *LEMD2* gene can lead to the development of a progeroid phenotype in humans. Polymorphisms in this gene in OXYS rats potentially result in a frameshift, a premature stop codon, and the potential loss of one of the two transmembrane domains. Western blot analysis showed that only the full-length protein product of the *Lemd2* gene is present in the prefrontal cortex and hippocampus of OXYS rats, although its level is reduced compared to Wistar rats throughout life.

According to the SIFT algorithm, 33 SNPs of OXYS rats, absent in normotensive strains, are presumably capable of leading to changes in protein structure and/or function and can be considered as likely candidates associated with the development of the accelerated aging phenotype. Among them, two genes (*Acat2* and *Ephx1*) are associated with aging, a group of 10 genes (*Plagr1*, *Zmym6*, *Trappc9*, *Nqo2*, *Ephx1*, *Ano10*, *Chrna5*, *Man2c1*, *Pcm1* and *LOC100364500*) are associated with neurodegenerative diseases, and the *Ephx1* gene is associated with arterial hypertension.

Genetic similarity analysis based on identified SNPs showed that OXYS rats are genetically closest to the ISIAH rat strain (also derived from Wistar/Icgn rats) than to other hypertensive rat strains and substrains (Fig. 1). Among the 2105 SNPs identified in OXYS rats, 725 were also found in one or more hypertensive rat strains. Of these, 663

were common to OXYS and ISIAH rats and were not found in other hypertensive rats.

Among the genes with these mutations, the most interesting is the epoxide hydrolase 1 gene, which is associated with hypertension and also correlates with neurodegenerative diseases and mental disorders. SNPs in the *Pla2r1* and *Ccdc28b* genes are the most common in hypertensive rats and are located in genetic loci associated with hypertension. High serum titers of PLA2R1 were found in patients with type 1 diabetes, diabetic retinopathy, hypertension, and nephrotic syndrome. The protein encoded by the *Ccdc28b* gene is associated with Bardet-Biedl syndrome, an autosomal recessive

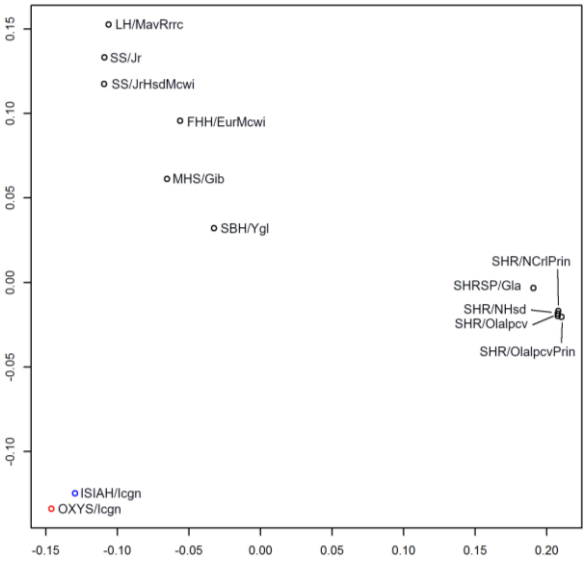


Fig. 1. Analysis of distances between OXYS/Icgn rats and 12 hypertensive rat strains

disorder involving retinal degeneration, obesity, cognitive impairment, mental retardation, renal disorders and hypertension.

Conclusion: Thus, the SNPs identified in OXYS rats may contribute to both the development of moderate hypertension in OXYS rats and the accelerated aging phenotype in general, including signs of AD and AMD. At the same time, we did not identify mutations that could unambiguously determine this phenotype, which indicates either the cumulative effect of multiple gene disorders or factors not associated with mutations in the coding regions of the OXYS rat genome. The OXYS rat strain and other strains we studied have few common mutations, which indicates their own mechanisms for the development of pathology in OXYS rats, distinguishing them even from genetically similar ISIAH/Icgn rats.

Funding: This study was supported by the state budget project (No. FWNR-2022-0016).