Изменения транскриптома префронтальной коры мозга при развитии признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS

Н.А. Стефанова[1], Е.Е. Корболина[1], Н.И. Ершов[1], Е.И. Рогаев[1], Н.Г. Колосова[1, 2]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга. Заболеваемость БА растет по мере увеличения продолжительности жизни и постарения населения развитых стран. Эффективных методов профилактики БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза заболевания и отсутствием его адекватных биологических моделей. Недавно мы показали, что перспективной моделью БА являются преждевременно стареющие крысы OXYS, ускоренное старение мозга которых происходит на фоне характерных признаков заболевания: дегенеративных изменений и гибели нейронов, снижения плотности синапсов, дисфункции митохондрий, гиперфосфорилирования тау-белка, повышения уровня амилоида бета ($A\beta_{1–42}$) и образования амилоидных бляшек. Выясняя природу их развития, в настоящей работе исследовали методом RNA-seq транскриптом префронтальной коры мозга крыс OXYS в период манифестации признаков БА (возраст 5 мес.) и их активной прогрессии (возраст 18 мес.), используя в качестве контроля одновозрастных крыс Вистар. У крыс OXYS и Вистар в возрасте 5 мес. в префронтальной коре мозга значимо ($p < 0,01$) различался уровень мРНК более 900 генов, в возрасте 18 мес. – более 2 000 генов, основная часть которых связана с нейрональной пластичностью, фосфорилированием белка, Ca^{2+} гомеостазом, гипоксией, иммунными процессами и апоптозом. В возрастной период с 5 до 18 мес. у крыс Вистар изменялась экспрессия 499 генов, у крыс OXYS – более 5 500 генов. Из них только 333 гена были общими для крыс OXYS и Вистар, что свидетельствует о различиях в механизмах и скорости возрастных изменений мозга при нормальном темпе старения и развитии характерных для БА нейродегенеративных процессов.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; крысы OXYS; транскриптом мозга; RNA-seq.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?
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;19(4):445-454. DOI 10.18699/VJ15.059

HOW TO CITE THIS ARTICLE?
Stefanova N.A., Korbolina E.E., Ershov N.I., Rogaev E.I., Kolosova N.G. Changes in the transcriptome of the prefrontal cortex of OXYS rats as the signs of Alzheimer's disease development. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):445-454. DOI 10.18699/VJ15.059

DOI 10.18699/VJ15.059
УДК 616.894-053.8
Поступила в редакцию 11.08.2015 г.
Принята к публикации 31.08.2015 г.
© АВТОРЫ, 2015

e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Changes in the transcriptome of the prefrontal cortex of OXYS rats as the signs of Alzheimer's disease development

N.A. Stefanova[1], E.E. Korbolina[1], N.I. Ershov[1], E.I. Rogaev[1], N.G. Kolosova[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent neurodegenerative disease. It produces atrophic changes in the brain, which cause dementia. The incidence of AD is increasing with increasing life expectancy and gradual aging of the population in developed countries. There are no effective prophylactic interventions because of insufficient understanding of the AD pathogenesis and the absence of adequate experimental models. Recently, we showed that senescence-accelerated OXYS rats represent a promising model of AD; in these rats, accelerated aging of the brain is accompanied by the typical signs of AD: degenerative alterations and death of neurons, a decrease in synaptic density, mitochondrial dysfunction, hyperphosphorylation of the tau protein, an increased level of amyloid β ($A\beta_{1–42}$), and the formation of amyloid plaques. To elucidate how these signs develop, we used a next-generation RNA sequencing technique (RNA-Seq) to study the prefrontal-cortex transcriptome of OXYS rats during the manifestation of AD signs (at an age of 5 months) and during their active progression (at an age of 18 months), using age-matched Wistar rats (parental strain) as controls. At the age of 5 months, there were significant differences between OXYS and Wistar rats ($p < 0,01$) in the mRNA expression of more than 900 genes (> 2 000 genes at the age of 18 months) in the prefrontal cortex. Most of these genes were related to neuronal plasticity, protein phosphorylation, Ca^{2+} homeostasis, hypoxia, immune processes, and apoptosis. Between the ages of 5 and 18 months, there were changes in the expression of 499 genes in Wistar rats and changes in the expression of 5 500 genes in OXYS rats. Only 333 genes were common between these sets. This finding points to differences in the mechanisms and rates of age-related changes in the brain between normal aging and the period of development of AD-specific neurodegenerative processes.

Key words: Alzheimer's disease; OXYS rats; brain transcriptome; RNA-seq.

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга и в конечном счете – смерти в течение 3–9 лет после постановки диагноза (Querfurth, LaFerla, 2010). Заболеваемость растет по мере увеличения продолжительности жизни и постарения населения развитых и развивающихся стран: по данным ВОЗ, в мире более 35 млн человек страдают БА, а к 2050 г., по прогнозам, таких больных будет >115 млн (Morley et al., 2012). Эффективных способов профилактики и лечения БА нет, что обусловлено неполнотой знаний патогенеза заболевания, поздней постановкой диагноза, которая базируется в основном на оценке когнитивных нарушений и поведения, наличие которых регистрируется уже на фоне необратимых нейродегенеративных изменений. Это определяет актуальность исследования молекулярно-генетических механизмов развития БА и разработки на их основе новых способов профилактики и лечения заболевания и маркеров для ранней диагностики БА.

Различают две формы БА: наследственную и спорадическую. На первую приходится только около 5 % случаев БА, она развивается в возрасте до 65 лет, чаще – до 40–50 лет и обусловлена мутациями в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2*. Остальные 95 % случаев приходятся на спорадическую форму заболевания, возраст развития которой – больше 65 лет (Krstic, Knuesel, 2013). В ходе усиленных исследований механизмов БА в последние 20 лет было выдвинуто несколько гипотез ее этиологии и патогенеза, доминирующей среди них стала гипотеза «амилоидного каскада», основанная на исследованиях генетических форм БА и выявленных нейротоксических эффектах пептида амилоида-β ($A\beta_{1–42}$) как центрального события в каскаде патологических процессов (Morley et al., 2012). Однако в последние годы растет число убедительных аргументов в пользу того, что эта гипотеза оправдана, скорее всего, только для наследственной формы БА. Недавние исследования свидетельствуют о том, что накопление токсических форм Аβ при развитии спорадической формы БА может быть опосредовано синаптическими процессами (Shinohara et al., 2014).

Несмотря на выявленные ассоциации с полиморфизмами в ряде генов (Bertram et al., 2007), конкретные молекулярно-генетические механизмы развития спорадической формы БА, перехода физиологических возрастных изменений мозга в патологический процесс остаются не ясными. Анализ изменений транскриптома, предшествующих и сопутствующих фенотипическим проявлениям старения и развитию связанных с ним заболеваний, – продуктивный подход к поиску молекулярных мишеней-генов, вовлеченных в их этиологию и патогенез, но проводить такие исследования на людях проблематично, особенно на доклинических стадиях БА, манифестация которых происходит позднее, чем формируются нейродегенеративные изменения и развиваются лежащие в их основе события на молекулярном уровне. Наши исследования показали, что уникальной генетической моделью преждевременного старения и связанных с ним заболеваний является линия крыс OXYS, созданная в ИЦиГ СО РАН селекцией и инбридингом крыс Вистар, чувствительных к катарактогенному эффекту галактозы. В пяти первых поколениях развитие катаракты провоцировали нагрузкой галактозой, в дальнейшем отбор вели по ранней спонтанной катаракте, сцепленно с которой животные унаследовали комплекс признаков преждевременного старения, в том числе ускоренное старение мозга (Kolosova et al., 2009; Stefanova et al., 2010; Колосова и др., 2014). На фенотипическом уровне оно проявляется формированием уже к возрасту 3 мес. пассивного типа поведения, повышенной тревожности, нарушением способности к обучению на фоне нейродегенеративных изменений, выявленных методами магнитно-резонансной томографии (Колосова и др., 2011; Stefanova et al., 2014b). О снижении когнитивных функций у молодых крыс OXYS свидетельствует и нарушение формирования длительной посттетанической потенциации (Береговой и др., 2011). Методом QTL-анализа были выявлены локусы, ассоциированные с развитием у крыс OXYS катаракты, ретинопатии и особенностей поведения (Korbolina et al., 2012). Функциональная аннотация этих локусов выявила обогащение района генами, связанными с нейродегенерацией, в том числе с метаболическим путем БА. Действительно, проведенные нами исследования показали, что снижение когнитивных функций и изменение поведенческого стереотипа происходят у крыс OXYS на фоне развития характерных для БА признаков: дегенеративных изменений и гибели нейронов, снижения плотности синапсов, дисфункции митохондрий, гиперфосфорилирования тау-белка, повышения уровня $A\beta_{1-42}$ и образования амилоидных бляшек (Stefanova et al., 2014a, b, 2015a, b). Отсутствие в геноме крыс OXYS характерных для ранней формы заболевания мутаций в генах *App*, *Psen1* и *Psen2* (Stefanova et al., 2015a) позволяет рассматривать линию крыс OXYS как перспективную модель спорадической формы БА.

Цель настоящей работы – изучить транскриптом префронтальной коры мозга крыс OXYS в период активной манифестации и усиленной прогрессии признаков БА методом массового параллельного секвенирования, используя в качестве контроля одновозрастных крыс Вистар.

Материалы и методы

Работа выполнена методом RNA-seq на крысах OXYS и Вистар в возрасте 5 и 18 мес. ($n = 3$). Приготовление кДНК библиотек и секвенирование на платформе Illumina Genome Analyzer IIx проведены в соответствии с протоколами Illumina для RNA-seq (ОАО «Геноаналитика»). Для каждого образца было получено ~40 млн прочтений (ридов) длиной 50 нуклеотидов. Риды картировали на референсный геном *Rattus norvegicus* (версии Rnor_5.0.76) с помощью программы TopHat (v2.0.10) (Trapnell et al., 2009). Картированные последовательности были использованы для сборки транскриптома по референсному геному с помощью Cufflinks (v2.2.1). Полученная аннотация транскриптов была объединена с известными аннотациями ENSEMBL (Rnor, v5.0.76) и RefSeq (Rnor, v5.0) и использована совместно с данными картирования для составления таблиц числа ридов на ген (HTSeq2 с параметром MAQ > 10). Различия в экспрессии оценивали с помощью программных пакетов DESeq и DESeq2, использующих статистическую модель отрицательного

биномиального распределения (Anders, Huber, 2010). Одновременно такой же анализ выполнялся и для картирований, прошедших через удаление потенциальных ПЦР-дупликатов с помощью программы Picard Tools, с целью отследить и исключить возможную систематическую погрешность, привнесенную на этапе амплификации библиотек. Уровень значимости изменения экспрессии рассчитывали с учетом поправки для множественных сравнений Бенджамини–Хохберга (БХ p-value, DESeq). При создании объединенного списка дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) учитывали гены без поправки на множественные сравнения с $p < 0{,}01$. Функциональную аннотацию групп ДЭГ проводили с помощью Web-инструмента DAVID и WebGestalt при порогах значимости обогащения (EASE) $p < 0{,}05$.

Результаты

Анализ данных секвенирования транскриптома (RNA-seq)

Установлено, что при заданной глубине секвенирования в префронтальной коре крыс OXYS и Вистар, согласно методу DESeq, экспрессируется около 15 200 генов. Согласно методу DESeq2 – около 21 200 генов. Поскольку перекрытие списков экспрессирующихся генов при оценке методами DESeq и DESeq2 составило 100 %, для дальнейшего анализа результатов секвенирования транскриптома префронтальной коры крыс использовали данные DESeq2. Установлено, что максимальное количество ридов было 2 687 083. Среднее значение уровня экспрессии по всем детектированным генам составило 1 422 рида. В таблице представлены 30 генов с наиболее высокой экспрессией в префронтальной коре крыс. Функциональный анализ обогащения терминами генных онтологий (Gene Ontology) транскриптома префронтальной коры крыс показал, что среди генов с самой высокой экспрессией представлены гены, ассоциированные с окислительным фосфорилированием, синтезом АТФ и белка, что связано с высоким уровнем метаболизма в мозге как наиболее активной и энергоемкой ткани в организме. Закономерно, что на высоком уровне экспрессируются гены, ассоциированные с обеспечением нейрональной пластичности и формированием межнейронных связей в мозге: передачей нервного импульса, синаптической передачей, транспортом белков, регуляцией формирования микротрубочек (табл. 1).

Межлинейные различия. Анализ результатов показал, что количество генов, экспрессия которых в префронтальной коре мозга крыс OXYS и Вистар различна (при уровне значимости $p < 0{,}01$), с 5 до 18 мес. увеличивается. Так, в возрасте 5 мес. были выявлены межлинейные различия в экспрессии 923 генов: уровень мРНК 537 генов у крыс OXYS был повышен, а 386 – снижен.

В возрасте 18 мес. количество генов, экспрессия которых в префронтальной коре у крыс OXYS отличалась от таковой у крыс Вистар, достигло 2 103: уровень мРНК у 1 156 генов был повышен, а у 947 – снижен. Таким образом, в возрасте и 5, и 18 мес. у крыс OXYS (см. диаграмму Венна, рис. 1, *а*) доля генов с повышенным уровнем мРНК была несколько больше, чем со сниженным по сравнению с крысами Вистар (58 и 55 % генов соответственно). Следует подчеркнуть, что для 309 генов межлинейная разница в уровне экспрессии сохранялась в обеих возрастных группах.

Функциональный анализ обогащения терминами генных онтологий транскриптома префронтальной коры показал, что в возрасте и 5, и 18 мес. у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар повышенный уровень экспрессии генов ассоциирован с изменениями генов, участвующих в ответе на циклические органические соединения, регуляции размера кровеносных сосудов и вазодилатации, ответе на эндогенные стимулы, аутофагии ($< 10^{-5}$; табл. 2). В префронтальной коре у крыс OXYS в возрасте и 5, и 18 мес. среди генов со сниженным уровнем экспрессии выявлены ассоциации с изменениями процессинга фагосомы, эндоцитоза, клеточной адгезии, главного комплекса гистосовместимости ($< 10^{-4}$), каталитической активности, иммунного ответа ($p < 0{,}0042$) и структурной организации миелиновых волокон ($p = 0{,}0003$; табл. 2).

Возрастные различия. Всего в возрастной период с 5 до 18 мес. у крыс Вистар изменился уровень мРНК 499 генов: экспрессия 293 генов повысилась, 206 – снизилась (рис. 1, *б*). У крыс OXYS с возрастом на фоне прогрессии нейродегенеративных процессов изменился уровень мРНК 5 606 генов: экспрессия 2 985 генов повысилась, 2 621 – снизилась. Сравнение списка генов, экспрессия которых с возрастом изменилась однонаправленно в префронтальной коре крыс обеих линий, показало, что у 191 из них она возросла, а у 142 – снизилась (рис. 1, *б*). В целом такие результаты свидетельствуют о различиях в механизмах и скорости изменений в префронтальной коре при нормальном темпе старения мозга у крыс Вистар и при развитии характерных для БА нейродегенеративных процессов у крыс OXYS. В пользу этого свидетельствуют и результаты сравнения списков генов, дифференциально экспрессирующихся у 18-месячных крыс Вистар и 5-месячных крыс OXYS. Установлено, что уже в 5 мес. у крыс OXYS уровень мРНК 39 генов в префронтальной коре соответствовал уровню ДЭГ с возрастом у 18-месячных крыс Вистар, что свидетельствует об ускоренном старении мозга крыс OXYS. На рис. 2 представлены 15 из 39 генов с наиболее измененной по уровню значимости экспрессией с возрастом у крыс Вистар.

Функциональная характеристика дифференциально экспрессирующихся генов

Возрастные различия. На рис. 3 представлены основные биологические процессы (термины генных онтологий – Gene Ontology), для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов в префронтальной коре с возрастом у крыс OXYS и Вистар. Несмотря на то что набор генов, экспрессия которых изменяется с возрастом, у крыс Вистар и OXYS значительно различается, они объединяются в сходные категории генных онтологий. Так, с возрастом в префронтальной коре крыс обеих линий изменяется экспрессия генов, связанных с фосфорилированием, активностью протеинкиназ, нейрогенезом, синаптической пластичностью, воспалением. У крыс Вистар с возрастом снижается экспрессия генов, участвующих в развитии нейрона (*Nrep*, *Slitrk3*, *Lppr4*, *Pvrl1*, *Robo2*, *Jak2*, *Robo3*, *Sema3a*, *Olfm3* и *Lamb1*), активности протеинкиназ (*Met*,

Таблица 1. Гены экспрессии в префронтальной коре крыс

Ген	Официальное название	Количество прочтений	Ассоциированная функция
ND5	NADH dehydrogenase subunit 5	2687083	Окислительное фосфорилирование
Trnw	tRNA-Trp	1186464	Трансляционный посредник
Trnt	tRNA-Thr	280584	
Calm1	Calmodulin 1	160924	Связывание ионов кальция
Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	131236	Связывание АТФ
Snap25	Synaptosomal-associated protein 25	82906	Синаптическая передача
Scd	Stearoyl-CoA desaturase	82750	Передача нервного импульса
Camk2n1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	78087	Синаптическая передача
Trne	tRNA-Glu	73661	Трансляционный посредник
Zwint	ZW10 interacting kinetochore protein	69032	Везикулярный транспорт
Bc1	Brain cytoplasmic RNA 1	67692	Локомоторное поведение
Map1b	Microtubule-associated protein 1B	62387	Регуляция деполимеризации микротрубочек
Slc1a2	Solute carrier family 1(glial high affinity glutamate transporter), member 2	59888	Транспорт нейромедиаторов
Sparcl1	SPARC-like 1	58972	Связывание ионов кальция
Map2	Microtubule-associated protein 2	58664	Регуляция деполимеризации микротрубочек
Map1a	Microtubule-associated protein 1A	54512	
Ywhaz	Tyrosine 3-monooxygenase	53288	Митохондриальный транспорт
Tomm40	Translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog	51104	Митохондриальный транспорт
Clstn1	Calsyntenin 1	50877	Связывание ионов кальция
Sptbn2	Spectrin beta2	50181	Передача нервного импульса
Atp1a2	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide	49041	Связывание АТФ
Kif5a	Kinesin family member 5A	49028	Формирование микротрубочек
Nptxr	Neuronal pentraxin receptor	47960	Связывание ионов кальция
Glul	Glutamate-ammonialigase	46614	Связывание АТФ
Kif1a	Kinesin family member 1A	45762	Формирование микротрубочек
Actb	Actin beta	45335	Связывание АТФ
Sptan1	Spectrin alpha 1	45315	Организация трансмембранных белков, органелл
Calm3	Calmodulin 3	44529	Связывание ионов кальция
Atp1a3	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide	43669	Связывание АТФ
Prkcb	Protein kinase C, beta	43361	Связывание АТФ

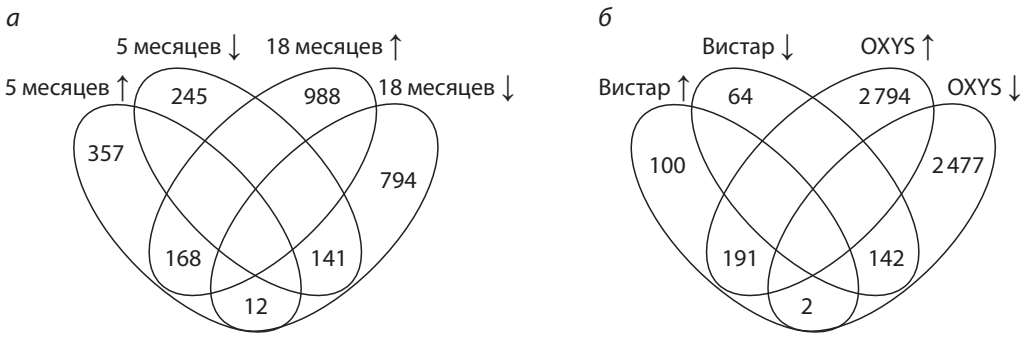

Рис. 1. Диаграммы Венна для дифференциально экспрессирующихся генов.

а – количество генов в префронтальной коре крыс OXYS со сниженным и повышенным по сравнению с крысами Вистар уровнем мРНК в возрасте 5 и 18 мес. и пересечения между группами генов; *б* – количество генов, снизивших и повысивших уровень мРНК с возрастом у крыс OXYS и Вистар, и пересечения между группами генов.

Таблица 2. Обогащение по терминам генных онтологий для групп генов с повышенным и сниженным уровнем экспрессии в префронтальной коре крыс OXYS в возрасте 5 и 18 мес.

Уровень экспрессии			
повышенный		сниженный	
Метаболические пути KEGG, Wikipathways			
WP1305 ($p < 10^{-5}$)	Старение и аутофагия	rno04145 ($p < 10^{-7}$)	Фагосома
rno01110 ($p = 0{,}0024$)	Метаболические пути	rno04144 ($p < 10^{-6}$)	Эндоцитоз
		rno04514 ($p < 10^{-6}$)	Молекулы клеточной адгезии
Категории генных онтологий, относящихся к биологическим процессам			
GO:0014070 ($p < 10^{-8}$)	Ответ на органические составляющие	GO:0019882 ($p < 10^{-4}$)	Процессинг и презентация антигенов
		GO:0042611 ($p < 10^{-4}$)	Главный комплекс гистосовместимости
GO:0050880 ($p < 10^{-6}$)	Регуляция размера кровеносных сосудов	GO:0003824 ($p = 0{,}0005$)	Каталитическая активность
GO:0042311 ($p < 10^{-6}$)	Вазодилатация	GO:0019911 ($p = 0{,}0003$)	Структурные составляющие миелиновых волокон
GO:0009719 ($p < 10^{-5}$)	Ответ на эндогенные стимулы	GO:0006955 ($p = 0{,}0042$)	Иммунный ответ

В скобках указан уровень значимости (p) с поправкой Бенджамини – Хохберга.

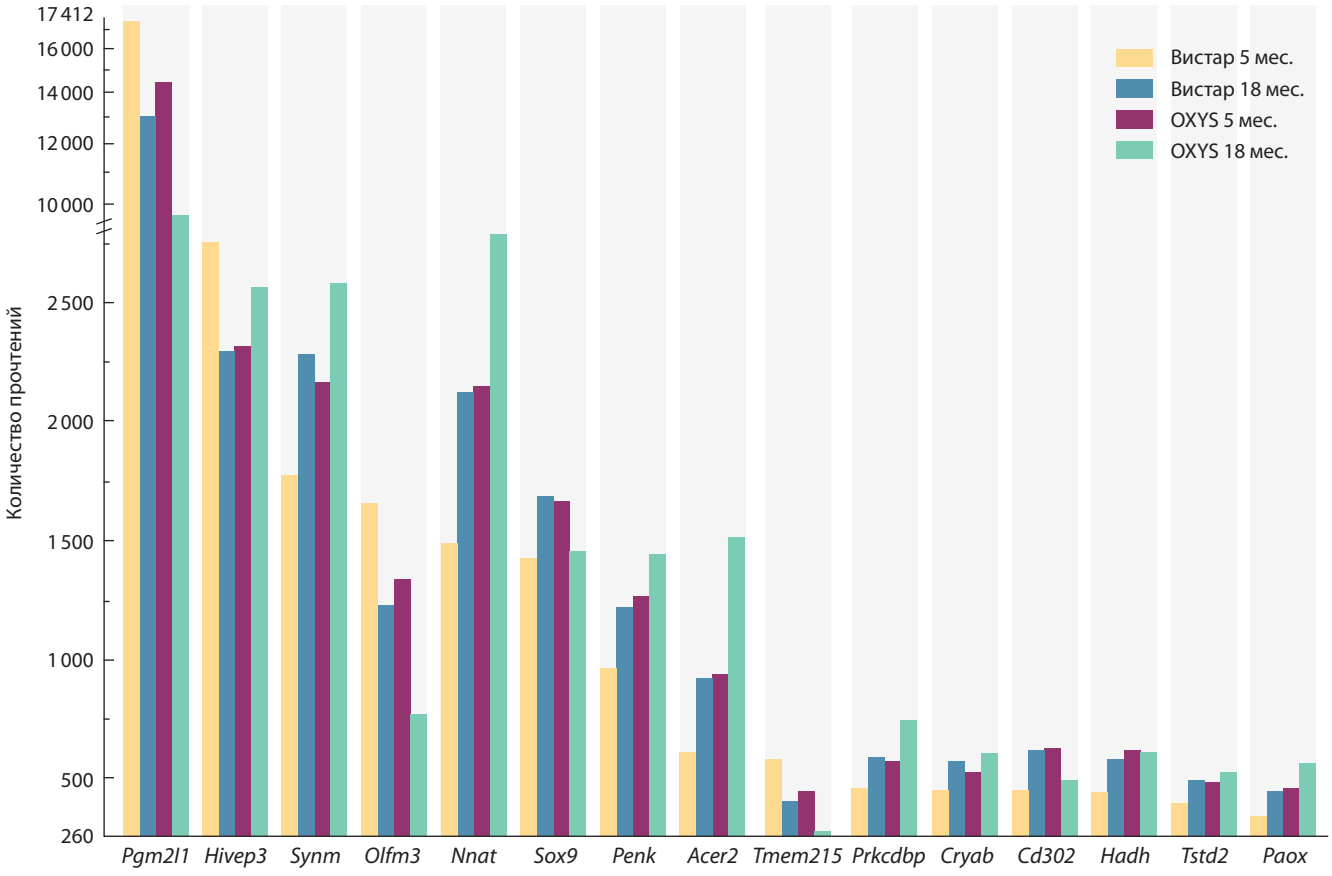

Рис. 2. Гены, уровень мРНК которых у крыс OXYS в возрасте 5 мес. соответствует уровню 18-месячных крыс Вистар.

Kit, *Trib2*, *Epha3*, *Acvr1c*, *Ntrk3*, *Epha5*, *Epha6*, *Camk4*, *Pak3*, *Mapk14*, *Jak2*, *Prkaa2*, *Camk2a* и *Kcnh5*). К возрасту 18 мес. у крыс Вистар повышается экспрессия генов, связанных с воспалительным ответом (*C1qa*, *Cyba*, *Tf*, *Ass1*, *Fcgr2b*, *C4b*, *C3*, *Itgb2* и *Mif*), глиогенезом (*Sox10*, *Gsn*, *Nkx6-2*, *Nab2*, *Cspg4* и *Olig2*), ответом на повреждение (*Tf*, *Gfap*, *Ass1*, *Plek*, *C4b*, *C3*, *Cst3*, *Itgb2*, *Sparc*, *Mif*, *C1qa*, *Cyba*, *Apod*, *Fcgr2b* и *Gsn*).

По мере прогрессирования признаков БА у крыс OXYS изменяется экспрессия 122 генов, связанных с развитием

Рис. 3. Значимые категории генных онтологий (GeneOntology), объединяющие гены, экспрессия которых изменяется с возрастом в коре мозга крыс OXYS и Вистар ($p < 0,05$).

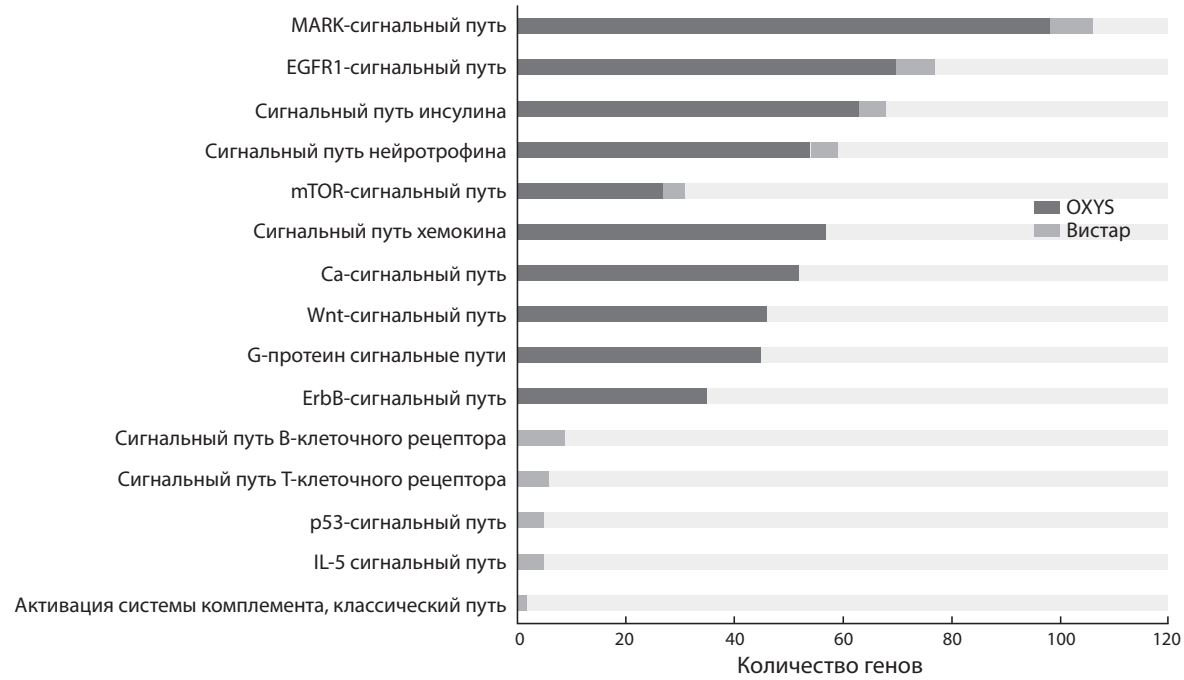

Рис. 4. Сигнальные пути с наиболее значимыми изменениями экспрессии генов с возрастом в коре мозга крыс OXYS и Вистар согласно базам данных KEGGpathway и Wikipathways.

нейрона (*Nrtn*, *Uchl1*, *Cspg4*, *Pip5k1c*, *L1cam*, *Cnp*, *Apod*, *Htra2* и др.), 81 гена – с регуляцией нейрогенеза (*Ache*, *Lzts1*, *Efna3*, *Cspg4*, *Timp2*, *Mif* и др.), 64 генов – с аксоногенезом (*Cck*, *Stk11*, *Uchl1*, *Ephb3*, *Unc5b*, *Unc5a* и др.), 84 генов – с синаптической трансмиссией (*Cltb*, *Cplx1*, *Adora2a*, *Clstn3*, *Syt3*, *Grik4* и др.). Кроме того, изменения экспрессии 220 генов в префронтальной коре у крыс OXYS с возрастом ассоциированы с процессами фосфорилирования (*Cspg4*, *Adora1*, *Map3k4*, *Map3k9*, *Prkaca*, *Map2k7*, *Matk* и др.), 180 генов – с активностью протеинкиназ (*Itpka*, *Maged1*, *Mark4*, *Grk6*, *Mtor*, *Tnk2*, *Gsk3a* и др.), 110 генов – с внутриклеточным транспортом белков (*Clta*, *Cltb*, *Ap1b1*, *Ap2s1*, *Hps4* и др.), 128 генов – с цитоскелетным связыванием белков (*Maea*, *Hip1r*, *Crocc*, *Vapb*, *Mtss1l*, *Pacsin1* и др.), 50 генов – с организацией митохондрий (*Sept4*, *Oxa1l*, *Timm50*, *Timm13*, *Fis1*, *Mrpl12*, *Sharpin*, *Tomm40* и др.), 71 гена – с убихинон-связанными катаболическими процессами (*Uchl1*, *Ube2g2*, *Man1b1*, *Bap1*, *Usp19* и др.). Экспрессия генов, участвующих в делении органелл (*Sept2*, *Pds5b*, *Dnm1l*,

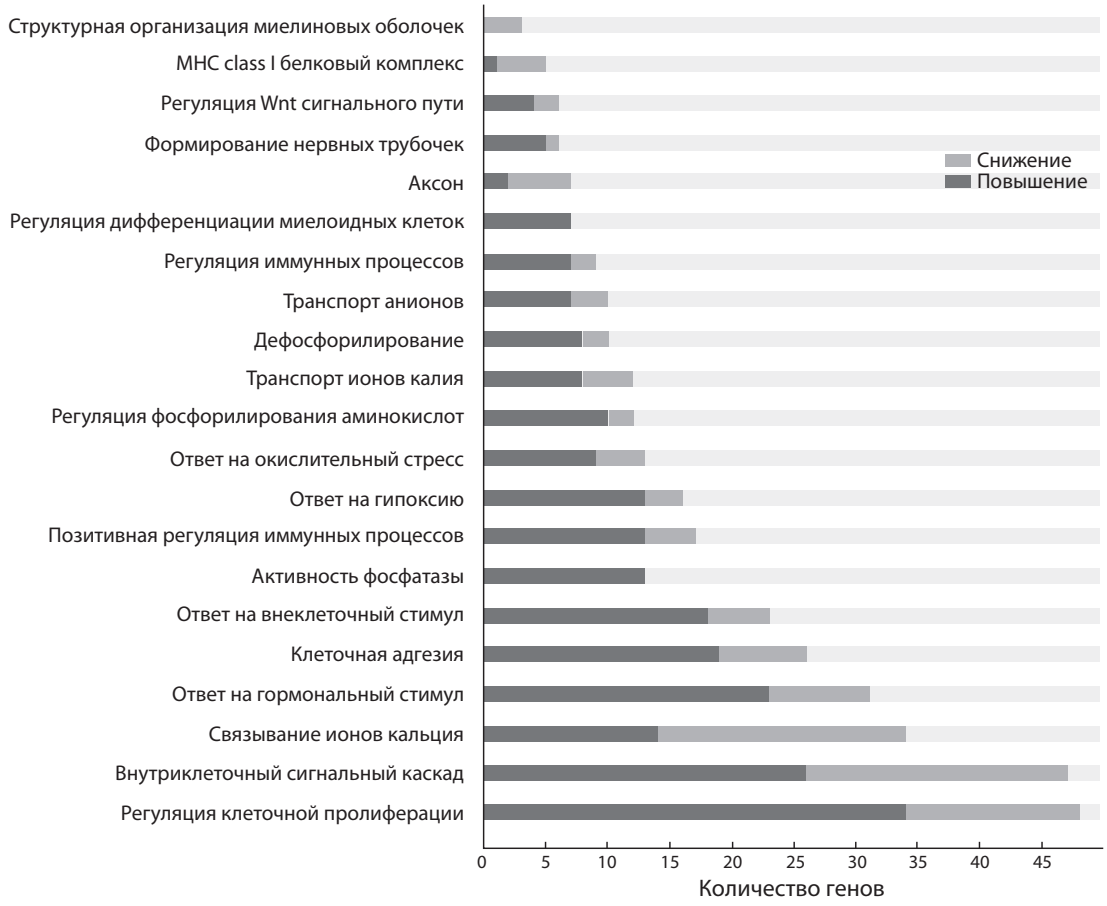

Рис. 5. Значимые категории генных онтологий (GeneOntology), объединяющие межлинейные различия в экспрессии генов в префронтальной коре крыс Вистар и OXYS в возрасте 5 мес. ($p < 0,05$).

Pds5a, *Tmem215*, *Katna1*, *Usp16* и др.) и слиянии органелл (*Mfn1*, *Cav2*, *Vav3*, *Gnai3* и др.), снижается. Повышается экспрессия 35 генов, участвующих в процессах организации микротрубочек (*Kifc2*, *Kif22*, *Spg7*, *Crocc*, *Uchl1*, *Tubb5*, *Tubg1*, *Tubb3* и др.), 39 генов – в олигомеризации белка (*Prkcz*, *Traf2*, *Ache*, *Kcnab2*, *Stk11*, *Aldoc*, *Prkcsh*, *Lnx1*, *Mif* и др.), 17 генов – в глиогенезе (*Sox10*, *Adora2a*, *Cspg4*, *Hdac11*, *Sod1* и др.). Также повышается экспрессия 72 генов, связанных с апоптозом (*Ppard*, *Dedd*, *Fastk*, *Eif5a*, *Casp9*, *Bag3* и др.).

Далее с помощью баз данных KEGGpathway и Wikipathways был проведен анализ ассоциаций групп генов, экспрессия которых изменилась в префронтальной коре животных с возрастом, с сигнальными путями. У крыс обеих линий были выявлены ассоциации с сигнальными путями, контролирующими транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, воспаление, апоптоз и другие процессы (рис. 4). У крыс Вистар наиболее значимые изменения экспрессии генов с возрастом связаны с активацией сигнального пути рецептора В-клеток (*Rps6ka1*, *Card11*, *Zap70*, *Blnk*, *Rps6*, *Fcgr2b*) и Т-клеток (*Cd4*, *Card11*, *Zap70*), IL-5 сигнального пути (*Itgam*, *Rps6ka1*, *Itgb2*), системы комплемента. Общими для крыс обеих линий были изменения экспрессии генов, связанных с MAPK-, инсулин-, нейротрофин-, EGFR1- и mTOR-сигнальными путями, однако представленность генов и масштабы их изменений были значительнее у крыс OXYS (рис. 4). С возрастом у них существенно изменилась экспрессия генов, ассоциированных с G-protein-, EGFR1-, chemokine-, ErbB-, Wnt- и calcium-зависимыми сигнальными путями (рис. 4), что характерно и для больных БА (Winkler, Fox, 2013).

Межлинейные различия. На рис. 5 и 6 представлены основные биологические процессы (термины генных онтологий, GeneOntology), для которых выявлены значимые изменения экспрессии генов в префронтальной коре в период развития (возраст 5 мес.) и в период активной прогрессии (возраст 18 мес.) признаков БА у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар.

Анализ специфичных для возраста 5 мес. ДЭГ показал, что на ранней стадии развития признаков БА у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар изменена экспрессия генов, участвующих в регуляции клеточной пролиферации, внутриклеточных сигнальных каскадов.

Экспрессия генов Wnt-зависимого сигнального пути, ответа на внеклеточный стимул, фосфатазной активности, ответа на окислительный стресс, регуляции фосфорилирования аминокислот, дефосфорилирования, транспорта анионов и ионов калия, дифференциации миелоидных клеток, регуляции иммунных процессов повышена.

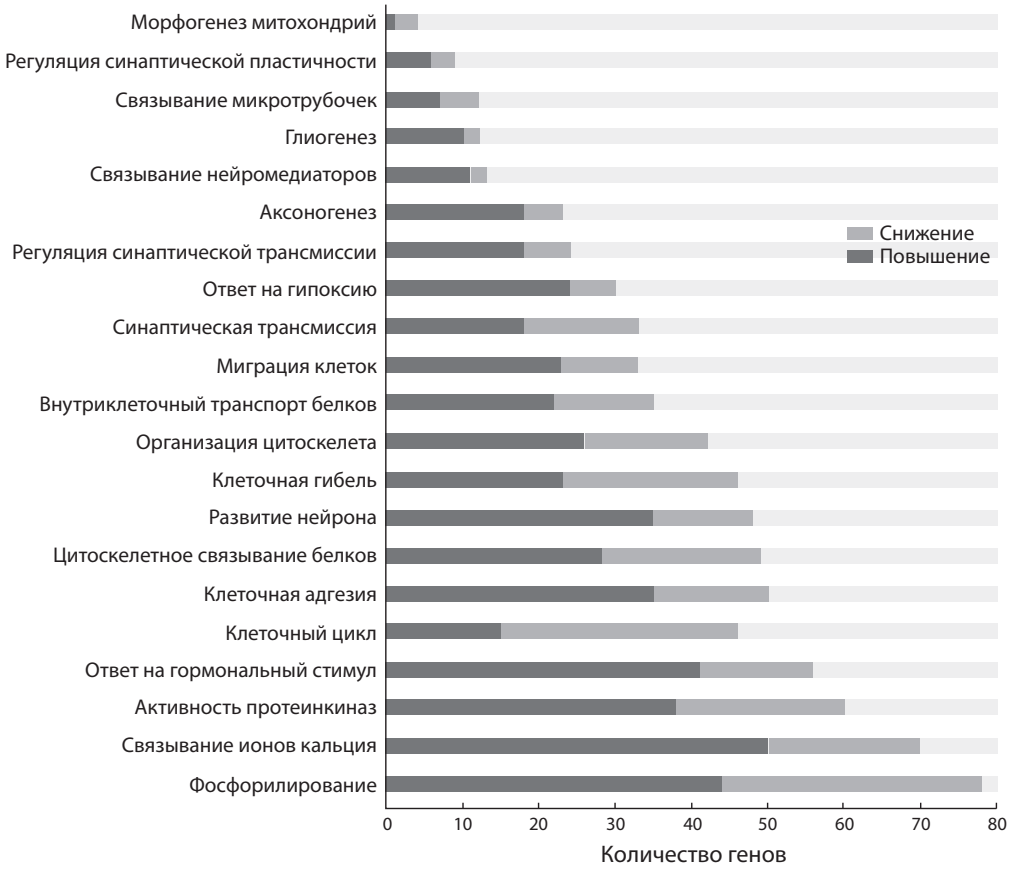

Рис. 6. Значимые категории генных онтологий (GeneOntology), объединяющие межлинейные различия в экспрессии генов в префронтальной коре крыс Вистар и OXYS в возрасте 18 мес. ($p < 0,05$).

В возрасте 5 мес. у крыс OXYS снижена экспрессия генов, участвующих в организации миелиновых оболочек (*Crocc*, *Haus1*, *Nefh*, *Cnp*, *Tubgcp2*), при этом повышена регуляция формирования микротрубочек (*P2rx4*, *Adora2b*, *Agt*, *Pde5a*, *Gucy1a3*). И в 5, и в 18 мес. у крыс OXYS повышена экспрессия генов ответа на гипоксию, клеточной адгезии, связывания ионов кальция, ответа на гормональный стимул. Для крыс OXYS обоих возрастных периодов также характерно изменение экспрессии генов, ассоциированных с аксоногенезом. В возрасте 18 мес. гены с повышенной экспрессией группируются у них в категории (термины генных онтологий): развитие нейрона (*Fgfr1*, *Pip5k1c*, *Grin3a*, *Ephb2*, *Lingo1* и др.), организация цитоскелета (*Fgd1*, *Ablim2*, *Pdlim7*, *Bcar1*, *Srf*, *Ptk2b*, *Obsl1* и др.), внутриклеточный транспорт белков (*Ramp3*, *Aspscr1*, *Ap1m1*, *Ipo13*, *Hps4*, *Pml*, *Cacnb1* и др.), миграция клеток (*Plat*, *Ppard*, *Efnb1*, *Bcar1*, *Itga3*, *Pf4*, *Kit*, *Mmp14* и др.), регуляция синаптической трансмиссии (*Plat*, *Sncg*, *Ncdn*, *Gnai2*, *Grik5* и др.), связывание нейромедиаторов (*Kiss1r*, *Chrm4*, *Grin2b*, *Chrm3*, *Chrm1*, *Chrnb2*, *Grin3b*, *Grin3a* и др.), глиогенез (*Ascl1*, *Ptk2b*, *Agt*, *Nab2*, *Phgdh*, *Reln*, *C1s*, *Mmp14*, *Eif2b1* и *Smarca4*). У крыс OXYS изменена экспрессия генов, участвующих в фосфорилировании, цитоскелетном связывании белков, апоптозе. Экспрессия генов, связанных с клеточным циклом (*Nbn*, *Tmem215*, *Haus1*, *Cdc73*, *Ccng1*, *Zkscan5*, *Katna1*, *Npm1*, *Usp16* и др.) и морфогенезом митохондрий (*Mfn2*, *Mfn1* и *Col4a3bp*), снижена.

Обсуждение

Выясняя природу развития признаков БА у крыс OXYS, мы исследовали транскриптом префронтальной коры их мозга в возрасте 5 и 18 мес., в период активной манифестации и усиленной прогрессии признаков заболевания. Анализ результатов показал, что в возрасте 5 мес. в префронтальной коре крыс OXYS изменен уровень мРНК более 900 генов, а в 18 мес. – уже более 2 000 генов по сравнению с одновозрастными крысами Вистар. Их основная часть и в 5, и в 18 мес. связана с изменениями экспрессии генов, продукты которых участвуют в процессах нейрональной пластичности, иммунной системы и апоптоза, ассоциированы с фосфорилированием белков, гипоксией, Ca^{2+} гомеостазом.

Уровень мРНК генов из функциональных категорий «синапс», «синаптическая трансмиссия», «аксоногенез», «регуляция синаптической пластичности» в префронтальной коре крыс OXYS в возрасте 5 мес. был снижен, а в возрасте 18 мес. – повышен. Прогрессирующее снижение уровня синапсина I, участвующего в регуляции процесса выброса нейромедиаторов в синапсах, и PSD-95, важного звена в регуляции синаптической пластичности, в мозге больных БА рассматриваются как маркерные события

(Scheff et al., 2014). В префронтальной коре крыс Вистар и OXYS в возрасте 5 мес. мы не выявили межлинейных различий в уровне мРНК гена *Dlg4*, кодирующего PSD-95, и гена *Syn1,* кодирующего синапсин I, но в возрасте 18 мес. у крыс OXYS он был повышен. Ранее мы показали, что уровень белковых продуктов этих генов – PSD-95 и синапсина I – в префронтальной коре крыс OXYS и Вистар в 4 мес. также не различается, но в гиппокампе крыс OXYS – уже снижен. С возрастом уровень пре- и постсинаптических белков закономерно снижается в мозге крыс обеих линий, но у крыс OXYS – ускоренными темпами. В результате у. крыс OXYS в возрасте 18 мес. уровень PSD-95 и синапсина I был ниже в обеих структурах мозга (Stefanova et al., 2015a).

С возрастом у крыс OXYS изменяется экспрессия более 5 500 генов, у крыс Вистар – только 499 генов. Большинство из них связано с фосфорилированием, активностью протеинкиназ, нейрогенезом, синаптической пластичностью и иммунной системой. Уровень мРНК более 120 генов из функциональных категорий «нейрон», «развитие нейрона» и «регуляция нейрогенеза» в префронтальной коре крыс OXYS изменялся с возрастом. Важную роль в развитии мозга играют протеогликаны – гепарансульфаты и гепарансульфатпротеогликаны (Maeda et al., 2011). Гепарансульфаты участвуют в модулировании синаптической пластичности, влияют на формирование структур мозга и его размеры. Экспрессия гепарансульфатпротеогликанов динамично регулируется различными физиологическими стимулами, в том числе нейрональной активностью. Ранее нами установлено, что окончание формирования мозга крыс OXYS в ранний постнатальный период происходит на фоне изменения состава и содержания протеогликанов (Rykova et al., 2011). Также обнаружено, что у крыс OXYS по сравнению с крысами Вистар становление и окончание формирования мозга (оно завершается к возрасту 20 дней) происходит на фоне значительного повышения экспрессии генов ферментов синтеза (*Ext1* и *Ext2*) и деградации (*Hpse* – гепараназы) протеогликанов (Шевелев и др., 2012). С возрастом их уровень в мозге крыс OXYS и Вистар закономерно снижался и межлинейные различия нивелировались. Анализ результатов исследования транскриптома не выявил межлинейных различий в уровне мРНК генов *Ext1*, *Ext2*, а также их лигандов *Extl1* и*Extl2* в возрасте 5 мес. в префронтальной коре мозга. К возрасту 18 мес. уровень мРНК гена *Extl2* снизился у крыс обеих линий, а уровень мРНК генов *Ext1*, *Ext2* и *Extl1*, напротив, повысился, но только у крыс OXYS. При этом и в 5, и в 18 мес. в коре мозга крыс OXYS практически вдвое был снижен уровень мРНК гена *Hpse,* фермента деградации гепарансульфатов.

Согласно современным представлениям, патологическое накопление Aβ, очевидно, обусловлено не столько гиперпродукцией APP, сколько дисбалансом между продукцией и клиренсом Aβ (Mawuenyega et al., 2010). Недавно нами показано, что содержание Aβ в гиппокампе крыс OXYS с возраста 3 до 23 мес. увеличивается втрое (Stefanova et al., 2015a). Усиленное накопление с возрастом Aβ в мозге крыс OXYS наряду с повышением уровня мРНК *App* и содержания APP, вероятно, связано с нарушением процессов деградации. Косвенно на это указывают изменения экспрессии генов, участвующих в процессах деградации (*Mme*) и агрегации Aβ (*Lpl*, *Lrp1*). Снижение уровня неприлизина, мембранной металлоэндопептидазы (MME), фермента, кодируемого *MME*, становится причиной накопления Aβ в мозге (Kanemitsu et al., 2003). Как показали результаты исследования транскриптома, уровень мРНК гена *Mme* в префронтальной коре мозга крыс OXYS и Вистар не различался между линиями в возрасте 5 мес. и снижался с возрастом у крыс OXYS. Не менее важным, чем накопление Aβ, признаком развития БА у крыс OXYS становятся повышение уровня тау-белка и его усиленное фосфорилирование (Stefanova et al., 2014a, b2015a). Нейротоксическое действие тау-белка может быть опосредовано Aβ, который стимулирует белок к усиленному фосфорилированию и, соответственно, образованию нейрофибриллярных клубков через активацию киназ Cdk5 и GSK3b, а также путем активации каспазы 3, каспазы 9 и кальпаина (Chung et al., 2001; Cho, Johnson, 2004). Анализ транскриптома префронтальной коры показал, что прогрессия признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне снижения уровня мРНК гена *Gsk3b* и повышения уровня мРНК генов *Cdk5*, *Casp9* и *Capn1*, которое могло быть следствием активации токсическими формами Aβ нейродегенеративных процессов.

Предполагается, что системный иммунный дисбаланс может создавать определенный метаболический фон для развития и прогрессии многих проявлений преждевременного старения крыс OXYS, включая признаки БА. Межлинейные различия в профилях экспрессии генов иммунной системы как в префронтальной коре, так и в сетчатке (Kozhevnikova et al., 2013) отражают ее состояние у крыс OXYS, которое можно охарактеризовать как неполноценное воспаление. Манифестация первых признаков БА, как и других проявлений преждевременного старения, происходит у крыс OXYS в период завершения полового созревания и начала инволюции тимуса (Obukhova et al., 2009). При этом ускоренная инволюция тимуса крыс OXYS, очевидно, становится причиной снижения активности Т-клеточного звена иммунной системы (Markova et al., 2003). В комплексе с результатами анализа транскриптома это позволяет рассматривать ускоренное иммуностарение как одну из вероятных причин преждевременного старения крыс OXYS, механизмы которого еще предстоит изучить.

Проведенное исследование показало, что развитие признаков БА у крыс OXYS происходит на фоне изменения транскриптома префронтальной коры мозга – экспрессии генов, продукты которых участвуют в процессах нейрональной пластичности, иммунной системы и апоптоза, ассоциированы с фосфорилированием белков, гипоксией, Ca^{2+} гомеостазом. Мы надеемся, что исследования на крысах OXYS позволят получить новые знания о молекулярно-генетических предпосылках развития заболевания и проводить поиск потенциальных молекулярных мишеней для направленных на профилактику и, возможно, лечение БА терапевтических воздействий.

Благодарности

Работа выполнена в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005

и RFMEFI62114X0010), а также поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН VI.53.2.4, грантом Правительства Российской Федерации 14.B25.31.0033 и грантами РФФИ (15-04-01938 и 15-04-06066).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Береговой Н.А., Сорокина Н.С., Старостина М.В., Колосова Н.Г. Возрастные особенности формирования длительной посттетанической потенциации у крыс линии OXYS. Бюл. эксперим. биол. мед. 2011;151(1):82-86.

Колосова Н.Г., Акулов А.Е., Стефанова Н.А., Мошкин М.П., Савелов А.А., Коптюг И.В., Панов А.В., Вавилин В.А. Влияние малата на развитие индуцированных ротеноном изменений мозга у крыс Вистар и OXYS: МРТ исследование. Докл. АН. 2011;437(2):273-276.

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. Усп. геронтологии. 2014;27(2):336-340.

Шевелев О.Б., Рыкова В.И., Федосеева Л.А., Леберфарб Е.Ю., Дымшиц Г.М., Колосова Н.Г. Экспрессия Ext1, Ext2 и гепараназы в мозге преждевременно стареющих крыс OXYS в период раннего онтогенеза и развития нейродегенеративных изменений. Biochemistry (Moscow). 2012;77(1):71-78.

Anders S., Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 2010;11(10):R106. DOI: 10.1186/gb-2010-11-10-r106

Bertram L., McQueen M.B., Mullin K., Blacker D., Tanzi R.E. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. Nat. Genet. 2007;39(1):17-23.

Cho J.H., Johnson G.V. Glycogen synthase kinase 3 beta induces caspase-cleaved tau aggregation *in situ*. J. Biol. Chem. 2004;279(52): 54716-54723.

Chung C.W., Song Y.H., Kim I.K., Yoon W.J., Ryu B.R., Jo D.G., Woo H.N., Kwon Y.K., Kim H.H., Gwag B.J., Mook-Jung I.H., Jung Y.K. Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. Neurobiol Dis. 2001;8(1):162-172.

Kanemitsu H., Tomiyama T., Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. Neurosci Lett. 2003;350(2):113-116.

Kolosova N.G., Stefanova N.A., Sergeeva S.V. OXYS rats: a prospective model for evaluation of antioxidant availability in prevention and therapy of accelerated aging and age-related cognitive decline. Eds Q. Gariépy, R. Ménard. Handbook of Cognitive Aging: Causes, Processes. N.Y.: Nova Sci. Publ., 2009.

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;4(1):49-59.

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;12(11):1745-1761. DOI: 10.4161/cc.24825

Krstic D., Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. 2013;9(1):25-34. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.236

Maeda N., Ishii M., Nishimura K., Kamimura K. Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. Neurochem. Res. 2011;36(7):1228-1240. DOI: 10.1007/s11064-010-0324-y

Markova E.V., Obukhova L.A., Kolosova N.G. Parameters of cell immune response in Wistar and OXYS rats and their behavior in the open field test. Bul. Exp. Biol. Med. 2003;136(6):588-590.

Mawuenyega K.G., Sigurdson W., Ovod V., Munsell L., Kasten T., Morris J.C., Yarasheski K.E., Bateman R.J. Decreased clearance of CNS beta-Amyloid in Alzheimer's disease. Science. 2010;330(6012): 1774. DOI: 10.1126/science.1197623

Morley J.E., Armbrecht H.J., Farr S.A., Kumar V.B. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. Biochim. Biophys Acta. 2012;1822(5):650-656. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.11.015

Obukhova L.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats. Aging (Albany N.Y.). 2009;1(4):389-401.

Rykova V.I., Leberfarb E.Y., Stefanova N.A., Shevelev O.B., Dymshits G.M., Kolosova N.G. Brain proteoglycans in postnatal development and during behavior decline in senescence-accelerated OXYS rats. Adv. Gerontol. 2011;24(2):234-243.

Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 2010;362(4):329-344. DOI: 10.1056/NEJMra0909142

Scheff S.W., Neltner J.H., Nelson P.T. Is synaptic loss a unique hallmark of Alzheimer's disease? Biochem. Pharmacol. 2014;88(4):517-528. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.12.028

Shinohara M., Fujioka S., Murray M.E., Wojtas A., Baker M., Rovelet-Lecrux A., Rademakers R., Das P., Parisi J.E., Graff-Radford N.R., Petersen R.C., Dickson D.W., Bu G. Regional distribution of synaptic markers and APP correlate with distinct clinicopathological features in sporadic and familial Alzheimer's disease. Brain. 2014;137(Pt 5): 1533-1549. DOI: 10.1093/brain/awu046

Stefanova N.A., Fursova A., Kolosova N.G. Behavioral effects induced by mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in Wistar and senescence-accelerated OXYS rats. J. Alzheimers Dis. 2010;21(2): 479-491. DOI: 10.3233/JAD-2010-091675

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. Cell Cycle. 2014a;13(6):898-909. DOI: 10.4161/cc.28255

Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Kiseleva E., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology. J. Pineal Res. 2015b;59(2):163-177. DOI: 10.1111/jpi.12248

Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korbolina E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats. Oncotarget. 2015a;6(3):1396-1413.

Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1. J. Alzheimers Dis. 2014b;38(3):681-694. DOI: 10.3233/JAD-131034

Trapnell C., Pachter L., Salzberg S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 2009;25(9):1105-1111. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp120

Winkler J.M., Fox H.S. Transcriptome meta-analysis reveals a central role for sex steroids in the degeneration of hippocampal neurons in Alzheimer's disease. BMC Syst. Biol. 2013;7:51. DOI: 10.1186/1752-0509-7-51