

Морфофизиологические эффекты инсерционного мутагенеза гена контактин 5 (*Cntn5*) у трансгенных мышей

А.В. Смирнов¹, Н.А. Феофанова^{1,3}, Г.В. Концевая¹, М.В. Анисимова¹, И.И. Ковригин², И.А. Серова¹, М.П. Мошкин^{1,4}, Л.А. Герлинская¹, Н.Р. Баттулин^{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

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

Технологии трансгенеза активно применяются в самых разных областях биологических исследований. Наиболее активно используемая методика получения трансгенных животных с помощью инъекции ДНК в пронуклеус зиготы может сопровождаться нарушением функции генов в месте интеграции трансгенной конструкции. В данной работе описаны морфофизиологические эффекты интеграции трансгенной конструкции, обеспечивающей наработку гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора человека в молоко в линии мышей (GM9), встройка конструкции у которых произошла в интрон гена контактин 5 (*Cntn5*). Было показано, что инсерция конструкции не привела к нокауту *Cntn5*. Однако у трансгенных животных изменяется транскрипция гена в сердце и почках по сравнению с животными дикого типа, а также меняется спектр транскриптов, что может свидетельствовать о нарушении регуляции сплайсинга гена *Cntn5*. Из литературных данных известно, что полиморфизмы *Cntn5* ассоциированы со склонностью к ожирению и с предрасположенностью к артериальной гипертензии. Мы исследовали основные параметры жирового обмена и сердечно-сосудистой деятельности у мышей, гомозиготных по инсерции трансгена в ген *Cntn5*, гетерозиготных животных и животных дикого типа. Проведенное фенотипирование показывает, что гомозиготные мыши имеют меньшую, чем особи дикого типа, массу тела. Причем весовая разница между генотипами определяется не столько отставанием мутантов в развитии скелета и мышц, образующих в сумме тощую массу, сколько существенно меньшим накоплением жира. У исследуемых линий были обнаружены статистически значимые различия по параметрам, характеризующим интенсивность кровообращения. Гомозиготные мыши превосходят особей дикого типа по значениям артериального давления, частоте сердечных сокращений и скорости кровотока в сосудах хвоста. Следует отметить, что гетерозиготные особи имеют промежуточные значения между мутантами и диким типом по всем измеренным морфофункциональным параметрам.

Ключевые слова: контактин 5; трансгенез; жировой обмен; инсерционный мутагенез.

Morphophysiological alterations caused by insertional mutagenesis of contactin 5 (*Cntn5*) gene in transgenic mice

A.V. Smirnov¹, N.A. Feofanova^{1,3}, G.V. Kontsevaya¹, M.V. Anisimova¹, I.I. Kovrigin², I.A. Serova¹, M.P. Moshkin^{1,4}, L.A. Gerlinskaya¹, N.R. Battulin^{1,2}✉

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

Transgenesis has become a routine for modern biological studies. The most popular method for producing transgenic animals—pronuclear microinjection—frequently leads to host gene disruption due to a random transgene integration. In this paper, we report our analysis of morphophysiological parameters of the transgenic mouse line GM9, in which a transgene designed for milk-specific expression of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene was integrated into the intron of the Contactin 5 gene (*Cntn5*). We studied *Cntn5* expression with RT-PCR and discovered that its expression in the brain, the primary organ of *Cntn5* activity, was unperturbed. However, transgenic animals had less *Cntn5* transcripts in other tissues such as the kidney and heart. In addition, we observed a decreased amount of splice variants of *Cntn5* exons that flank the transgene integration site. These data suggest that the transgene integration event might affect proper *Cntn5* splicing in some tissues. Publications exist that imply that some polymorphisms in the *Cntn5* gene are associated with obesity and arterial hypertension in humans. We evaluated core parameters of lipid metabolism and heart activity in mice homozygous and heterozygous for *Cntn5* mutation using wild-type animals as control. Our results uncovered that homozygous mutant mice have lower body weight than controls and that it is caused by slower accumulation of fat tissue. *Cntn5* mutants also exhibit abnormalities in blood circulation: homozygous *Cntn5* mutants are

characterized by a higher blood pressure and heart beat rate, as well as faster blood flow in the tail vessels. Heterozygous animals showed intermediate results for all of these parameters.

Key words: Contactin 5; transgenesis; lipid metabolism; insertional mutagenesis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Смирнов А.В., Фефанова Н.А., Концевая Г.В., Анисимова М.В., Ковригин И.И., Серова И.А., Мошкин М.П., Герлинская Л.А., Баттулин Н.Р. Морфологические эффекты инсерционного мутагенеза гена контактин 5 (*Cntn5*) у трансгенных мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):918-924. DOI 10.18699/VJ16.212

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Smirnov A.V., Feofanova N.A., Kontsevaya G.V., Anisimova M.V., Kovrigin I.I., Serova I.A., Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Battulin N.R. Morphophysiological alterations caused by insertional mutagenesis of contactin 5 (*Cntn5*) gene in transgenic mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):918-924. DOI 10.18699/VJ16.212

В настоящее время трансгенез активно используется для решения широкого круга теоретических и прикладных задач биологии, медицины и сельского хозяйства. Несмотря на огромные достижения в этой области, получение трансгенных животных, стабильно экспрессирующих трансген, сопряжено с рядом проблем. Эффект положения встроенного трансгена и влияние генетического окружения, структура трансгена и его целостность, количество копий трансгена, его эпигенетические модификации, тип экспрессирующей ткани-мишени, эффекты присутствия гомологичных элементов в геноме – вот неполный перечень параметров, влияющих на экспрессию трансгена. Эти аспекты трансгенеза внимательно изучаются, поскольку напрямую связаны с уровнем экспрессии трансгена. Один из побочных эффектов трансгенеза – появление уникальных мутантных линий животных в случае, если интеграция трансгена нарушила функции какого-либо гена. Такие спонтанные нокауты или модификации генов, возникающие при встройке трансгенной ДНК в геном, являются важным источником информации о функциях генов, особенно если они слабо исследованы. В ранее выполненной нами работе были изучены функциональные характеристики генно-инженерной конструкции pGoatcasGMCSF, способной обеспечивать продукцию гранулоцит-макрофаг колоние-стимулирующего фактора человека в молоке трансгенных самок мышей. Среди четырех трансгенных линий была обнаружена одна, в которой сайт интеграции трансгена находился в интроне гена контактин-5 (*Cntn5*) на хромосоме 9 (Burkov et al., 2013). Известно, что интеграция трансгена в интрон может приводить к изменению активности гена (Gogliotti et al., 2011; Fu et al., 2016). Поэтому мы исследовали как повлияла интеграция трансгена на сплайсинг гена *Cntn5* у трансгенных мышей, а также провели оценку морфофункциональных характеристик, на которых могли сказаться изменения активности гена *Cntn5*.

Ген *Cntn5* входит в суперсемейство иммуноглобулинов, отвечающих за клеточное взаимодействие (Ogawa et al., 1996; Zuko et al., 2013). Характерной чертой контактинов является большой размер – порядка 1.2 М bp в случае *Cntn5*. Всего описано шесть схожих по структуре генов контактинов, которые экспрессируются в основном в нейронах головного (Kleijer et al., 2015) и спинного мозга (Ashrafi et al., 2014) и регулируют образование синапсов между нейронами, обеспечивая различные аспекты нервной деятельности. Контактин-5 экспрессируется главным образом в центральной нервной системе (Ogawa et al.,

1996), а его максимальная экспрессия обнаруживается у эмбрионов мышей начиная с 16-го дня и на 2-й день после рождения (Li et al., 2003). Зоны наибольшей экспрессии в мозге – таламус, кортекс, хвостатое ядро и скорлупа. Экспрессия *Cntn5* начинается на поздних стадиях эмбриогенеза и сохраняется после рождения. Единственный описанный нокаут по гену *Cntn5* у мышей был получен в лаборатории К. Watanabe, в которой была создана трансгенная линия со вставкой кассеты tau-LacZ-neo после первого кодирующего экзона *Cntn5*, что привело к полной инактивации гена (Li et al., 2003). Данные, опубликованные этой группой ученых, характеризуют влияние нокаута на деятельность нервной системы, в частности на формирование слуховой системы (Li et al., 2003). Психоневрологические эффекты генов контактинов находят подтверждение в популяционных исследованиях, которые показывают, что у людей полиморфизмы данной группы генов, включая и *Cntn5*, ассоциируются с расстройствами аутистического спектра (Fernandez et al., 2008; Morrow et al., 2008; Burbach, van der Zwaag, 2009; Roohi et al., 2009; Van Daalen et al., 2011; Zuko et al., 2011, 2013; Nava et al., 2013), с дефицитом внимания и гиперреактивностью (Lionel et al., 2011), нервной анорексией (Nakabayashi et al., 2009).

Вместе с тем установлено, что полиморфизмы *Cntn5* ассоциированы также со склонностью к ожирению и предрасположенностью к артериальной гипертензии (Nikpay et al., 2012). Эти эффекты могут иметь нейрогенную природу, но нельзя исключить и прямого влияния полиморфизмов *Cntn5* на функционирование внутренних органов, вовлеченных в процессы жирового обмена и гомеостатическое регулирование гемодинамики. Возможность такого эффекта следует из анализа баз данных (FANTOM5, GeneAtlas), согласно которым экспрессия *Cntn5* обнаруживается не только в мозге, но и во многих других тканях тела. Таким образом, полученная нами линия мышей GM9 с интеграцией трансгена в интрон гена контактин-5 на хромосоме 9 (Burkov et al., 2013) становится перспективным объектом для изучения особенностей экспрессии гена *Cntn5*, а также для анализа метаболических и гемодинамических последствий направленных изменений данного гена.

Методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ФИЦ ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010).

Подопытных животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках (OptiMice) при температуре 24 °С, фотопериоде 14С:10Т, влажности 40–50 % и свободном доступе к воде и корму. Для кормления использовали брикетированные корма SNIFF (Германия) и ЧАРА, («Ассортимент – Агро», Россия) в соотношении 50:50, деионизированную воду обогащали солями в соответствии с требованиями к воде, используемой для поения SPF-мышей. Подстилочным материалом служили обеспыленная березовая крошка (ООО Альбион, Новосибирск). Все подопытные животные были свободны от видоспецифических патогенов (specific pathogen free – SPF).

В работе были использованы трансгенные мыши B6;CB-Cntn5^{Tg(gCsn1s1-hCsf2)lclg} (номенклатура по (Montoliu, Whitelaw, 2011)), несущие интеграцию генетической конструкции pGoatcasGMCSF в гене *Cntn5* (Burkov et al., 2013), далее будет использовано краткое обозначение линии – GM9.

Животных для фенотипирования получали скрещиванием мышей линий C57BL/6 (B6) и GM9. От 32 пар было получено 278 потомков, которые после генотипирования были разделены на три группы: мыши дикого типа (B6), гетерозиготы (B6/GM9) и гомозиготы (GM9). В возрасте трех недель животных взвешивали и рассаживали в клетки однополыми группами по пять–шесть особей. Фенотипирование проводили на самцах в возрасте 11–13 нед. Исследования выполняли в светлое время суток с 10:00 до 16 ч.

ПЦР для определения трансгенных животных. Генотипирование трансгенных мышей проводили с помощью полимеразной цепной реакции. Кончики хвостов мышей 1–3 мм лизировали в 100 мкл буфера PBNB (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 2.5 mM MgCl₂; 0.45 % v/v Nonidet P40 (NP40); 0.45 % v/v Tween 20) с добавлением протеиназы К (конечная концентрация – 1 мг/мл). Пробирки инкубировали при температуре 56 °С в течение 12–16 ч с последующей инактивацией протеиназы (95 °С, 10 мин). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1× ПЦР буфер (65 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16 mM (NH₄)₂SO₄ и 0.01 % Tween 20), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM каждого дезоксинуклеотида (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) и по 0.4 мкМ каждого из праймеров. В реакционную смесь добавляли 0.5 ед. Taq ДНК полимеразы и 1 мкл выделенной геномной ДНК. Условия ПЦР включали денатурацию геномной ДНК при 95 °С в течение 3 мин, с последующей амплификацией (35 циклов): денатурация при 95 °С – 30 с, отжиг праймеров при температуре 60 °С – 30 с, элонгация при 72 °С – 30 с. После стадии амплификации следовала финальная элонгация при 72 °С в течение 3 мин. ПЦР проводили на автоматическом амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Последовательности праймеров были следующие: праймер mTg (трансген) – 5'-CTGA CACTACTTCCACSTTCTCCCC-3'; праймер 1F (аллель дикого типа) – 5'-ATCTTGCTTTTCGGGAGCGT-3'; праймер 4R (участок генома рядом с 5'-концом трансгена) – 5'-TTGGGTACACAATGCCTGCAA-3' (Биоссет, Новосибирск).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР на кДНК *Cntn5*. РНК была выделена из целых органов гомозиготной трансгенной и нетрансгенной мышей (головной мозг, почка, сердце) линии C57BL/6. В дополнение к этому была

выделена РНК из культуры ЭС клеток мыши (линия 129/Sv). Для выделения РНК использовали TRI reagent (Sigma-Aldrich, США). Небольшие кусочки органов гомогенизировали в стеклянных гомогенизаторах Даунса и обрабатывали 500 мкл TRI reagent. Выделение РНК проводили по протоколу производителя (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>). После необходимых этапов выделения и очистки осадок РНК растворяли в 100 мкл mQ воды. Раствор РНК хранили при –80 °С.

Для синтеза кДНК использовали набор реактивов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, США). 1 мкг РНК добавляли в реакционную смесь (20 мкл), содержащую 1× буфер (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 1 mM каждого дезоксинуклеотида (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ), 1 ед. ингибитора РНКазы (RiboLock RNase Inhibitor), 5 мкМ выродженных праймеров (random hexamer primers), 200 ед. обратной транскриптазы (RevertAid M-MuLV RT). Условия реакции обратной транскрипции: 5 мин при 25 °С, 1 ч при 42 °С, 5 мин при 70 °С.

ОТ-ПЦР-анализ кДНК *Cntn5* проводили с использованием праймеров из статьи (Namba et al., 2013). Последовательности праймеров: 5'-TGGATTTCTTCACTTGATTC-3' (F) и 5'-CACCCCTCTTGCCGCAG-3' (R). Эти праймеры комплементарны экзонам 8–10 *Cntn5* (если считать от первого кодирующего экзона). Для анализа транскрипции также были использованы праймеры на экзоны до интеграции трансгена (экзоны 1 и 2), а также на экзоны после сайта интеграции (экзоны 3 и 4). Последовательности этих праймеров: 5'-CCAGGAGCGGCCTGTGACTA-3' (2F); 5'-AGTGGTACTGCTGAGCTGCC-3' (2R); 5'-CTGGCCTTCCCGCACTGAGA-3' (3R). Состав ОТ-ПЦР реакции был такой же, как и при ПЦР для генотипирования трансгенных мышей (см. выше). В реакцию брали 1 мкл кДНК. Условия ОТ-ПЦР: исходная денатурация при 95 °С в течение 3 мин, с последующей амплификацией (35 циклов), денатурация при 95 °С – 30 с, отжиг праймеров при температуре 58 °С, элонгация при 72 °С – 1 мин. Финальная элонгация после окончания амплификации – 3 мин.

Качество выделенной кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров на мРНК гена *β-актина* мыши. Последовательности использованных праймеров: Actb 5'-ACGCACGATTCCTCTCAGC-3', Actbr 5'-GGCCAGAGCAAGAGAGGTATCC-3'.

Измерение массы тела и содержания жира. Самцы – 16 (++) , 15 (–/+) и 16 (–/–) генотипов были взвешены в возрасте 3 нед в момент отъема от матерей и в возрасте 11–13 нед в день измерения содержания жира. Содержание жира и тощую массу определяли методом магниторезонансной спектроскопии с помощью низкочастотного ЯМР спектрометра (EchoMRI, США).

Измерение показателей кровообращения. У самцов генотипов B6 (15), B6/GM9 (16) и GM9 (16) в возрасте 11–13 нед были измерены систолическое и диастолическое давление, частота сердечных сокращений и объемная скорость кровотока в сосудах хвоста. Измерения выполнены на ненаркотизированных животных с помощью системы неинвазивного определения перечисленных выше

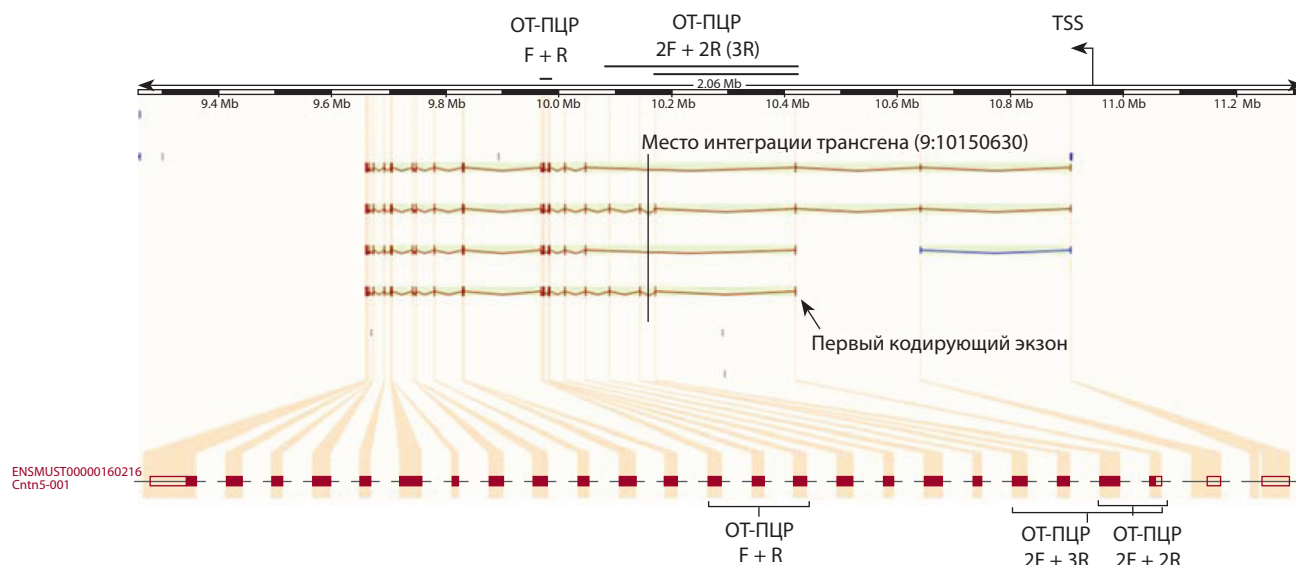


Рис. 1. Схема гена мыши *Cntn5* (ENSMUSG00000039488, ensembl.org) с указанием сайта интеграции и праймерами для ОТ-ПЦР. TSS – сайт начала транскрипции.

гемодинамических параметров (CODA, Kent Scientific Corporation, США). За 5 мин до измерения животное помещали в ограничивающий движения пенал (рестриктор), который находился на подогреваемом столике (37 °С). За каждый сеанс проводили 20 измерений. Качество измерений контролировали по графикам. Значения, искаженные помехами, обусловленными подвижностью животных в рестрикторе или движениями хвоста, исключали из дальнейшего анализа. Для привыкания к процедуре измерения каждое животное тестировали трижды – по одному сеансу в день. При анализе результатов использовали данные последнего измерения.

Статистика. Для определения статистической значимости различий между исследуемыми генотипами использовали однофакторный дисперсионный анализ и метод множественного сравнения средних (LSD-тест). Значения выражали как среднее ± SE.

Результаты

Генотипирование трансгенных мышей линии GM9. У мышей линии GM9 (Burkov et al., 2013) трансген *pGoatcasGMCSF* был встроен в интрон гена *Cntn5* на хромосоме 9 (9:10150630) (рис. 1). Сайт интеграции расположен внутри интрона размером примерно 29 т. п. н., при этом размер встройки предположительно составляет около 14 т. п. н. Для генотипирования были подобраны праймеры на участок между 5'-границей трансгена и геномом (трансгенный аллель), а также на участок интрона гена *Cntn5* (нормальный, неповрежденный аллель). Некоторые затруднения создал тот факт, что трансген встроился в ретротранспозон (LINE/L1), который имеет гомологию порядка 90 % с другими родственными последовательностями в геноме, поэтому праймеры для генотипирования подбирались с учетом мутаций в конкретном мобильном элементе. Сначала образцы ДНК из хвостов мышей анализировали на наличие трансгенного аллеля (праймеры mTg + 4R), а затем всех животных, позитивных по встрой-

ке трансгена, также проверяли на наличие у них аллеля *Cntn5* дикого типа (праймеры 1F + 4R) (рис. 2).

ОТ-ПЦР анализ экспрессии гена *Cntn5* в трансгенных мышах. Ожидалось, что интеграция большого фрагмента экзогенной ДНК (14 т. п. н.) в сопоставимый по размеру интрон гена *Cntn5* (29 т. п. н.) повлияет на экспрессию гена. Однако предварительный анализ транскрипции гена *Cntn5* показал, что встройка трансгена не привела к исчезновению транскриптов гена *Cntn5* в мозге (рис. 3, экзоны 8–10 и 1–2). Ранее экспрессия *Cntn5* была описана лишь для головного и спинного мозга. Интересно, что мы детектировали транскрипты *Cntn5* в почках и сердце (но не в эмбриональных стволовых клетках), при этом экспрессия гена в сердце была снижена. Для более детального анализа были выбраны праймеры на экзоны *Cntn5*, которые расположены возле сайта интеграции и подвергаются альтернативному сплайсингу (см. рис. 1) (NM_001170787.1, NM_001033359.2). Мы подтвердили, что мРНК *Cntn5* присутствует в мозге трансгенных животных, но количество изоформ у мутантных мышей было ниже (рис. 3). В то же время данный участок мРНК *Cntn5* отсутствовал в почках и сердце трансгенных животных. Для более точного определения нарушений сплайсинга и транскрипции гена *Cntn5* в трансгенных мышах линии GM9 потребуются дополнительные эксперименты.

Масса тела и жировой обмен. Однофакторный дисперсионный анализ показал значимое влияние генотипа на массу тела самцов в возрасте 3 нед ($F_{2,46} = 7.53$, $p = 0.0015$). Самцы мутантного (GM9) генотипа имели меньшую 10.3 ± 0.35 массу тела по сравнению с самцами дикого типа (B6) 12.3 ± 0.37 , $p = 0.0005$ и гетерозиготами (B6/GM9) 11.8 ± 0.40 , $p = 0.008$ (LSD-тест). Различия по массе тела между генотипами B6 и GM9 сохранялись и в возрасте 11–13 нед (рис. 4).

Самцы мутантного генотипа (GM9) в этом возрасте имели меньшую по сравнению с диким генотипом (B6) массу тела, а гетерозиготы занимали промежуточное по-

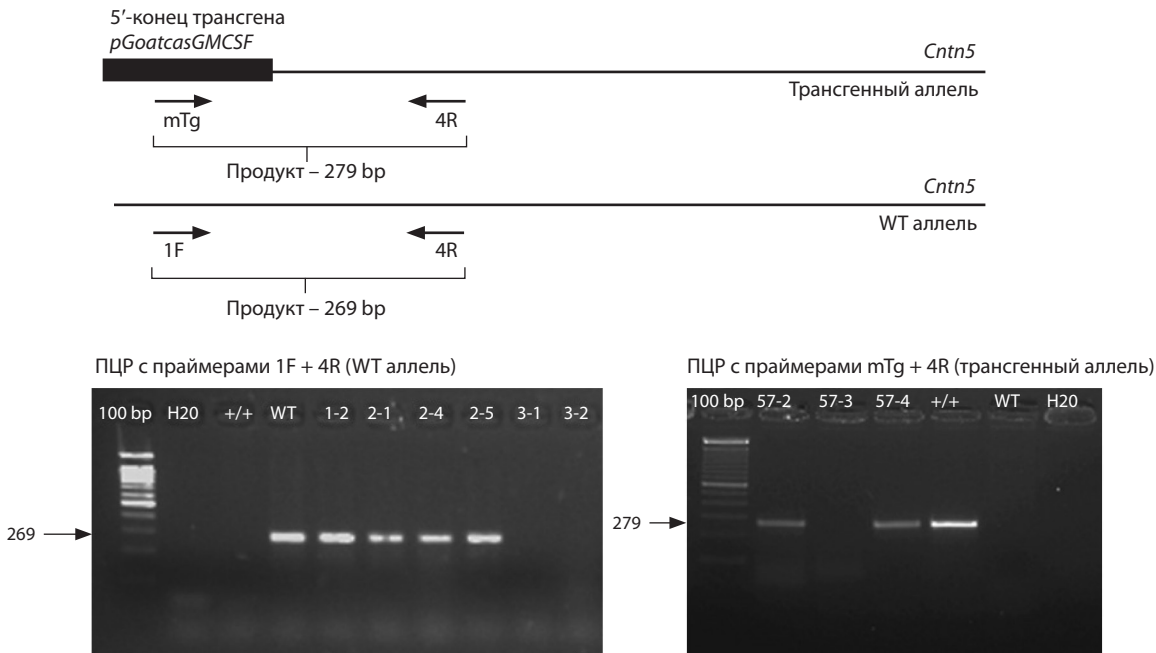


Рис. 2. Генотипирование трансгенных мышей.

Представлены схема и результаты ПЦР для некоторых образцов ДНК, выделенной из хвостов анализируемых животных. ПЦР с праймерами mTg и 1F для детекции аллеля *Cntn5* со встройкой трансгена, а пара праймеров, 1F и 4R, – для аллеля дикого типа. 100 bp – маркер длины; +/+ – гомозигота по трансгену; WT – мышь дикого типа; H2O – отрицательный контроль.

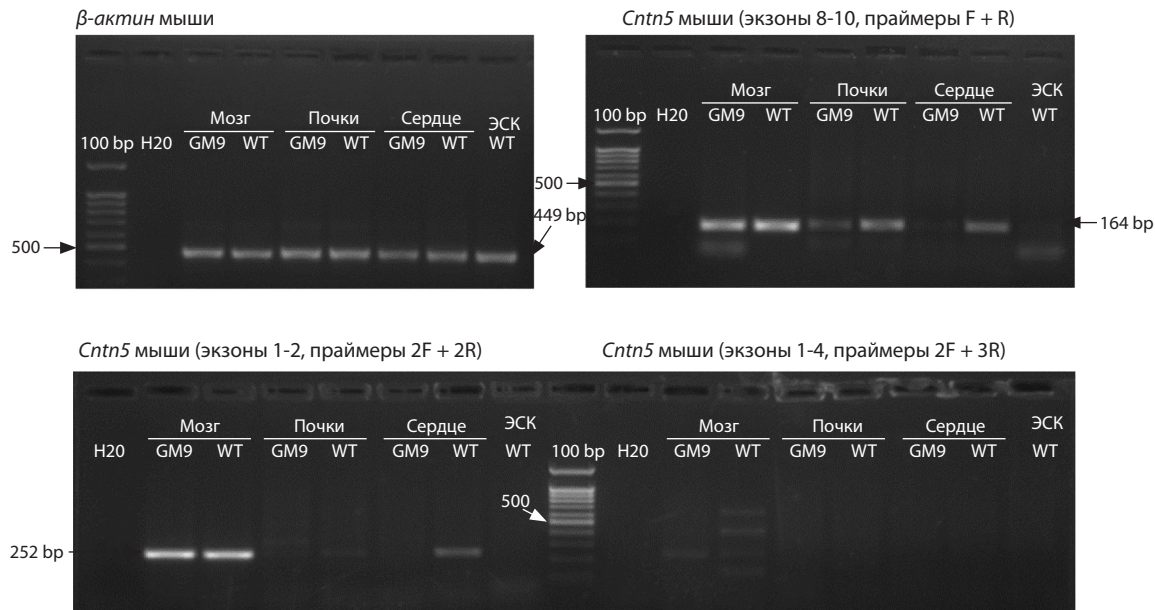


Рис. 3. ОТ-ПЦР на мРНК гена *Cntn5* в некоторых органах трансгенной (GM9, гомозигота) и нетрансгенной (WT) мышей. 100 bp – маркер длины, ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

ложение. Исследованные генотипы различались между собой и по содержанию жира. Самцы B6 достоверно отличались от GM9 по средним значениям абсолютной и относительной массы жира (см. рис. 4). Абсолютное и относительное содержание жира у гетерозигот значимо не отличалось от значений, характерных для B6 и GM9. Абсолютные величины тощей массы достоверно не различались у самцов исследованных генотипов, тогда как

относительная доля тощей массы была максимальной у самцов GM9.

Сердечно-сосудистая система. Результаты межгрупповых сравнений (LSD-тест) показали, что систолическое и диастолическое давление, частота сердечных сокращений и объемная скорость кровотока у самцов мутантного генотипа (GM9) были выше, чем у дикого генотипа (B6). Гетерозиготы по всем исследованным показателям сер-

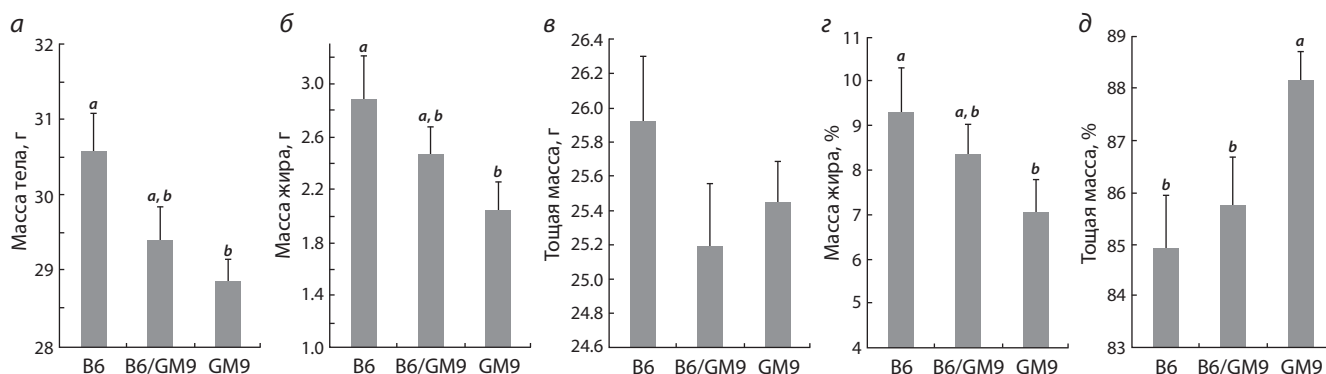


Рис. 4. Влияние нокаута гена контактин-5 на массу и композицию тела у взрослых мышей (11–13 нед).

а – масса тела; б – общее содержание жира; в – тощая масса; г – содержание жира в % от массы тела, д – тощая масса в % от массы тела.

Здесь и на рис. 5: B6 – особи дикого типа; B6/GM9 – гетерозиготные особи; GM9 – гомозиготные особи. а, а, б; б – достоверно различающиеся средние, а по сравнению с б ($p < 0.05$, LSD-тест).

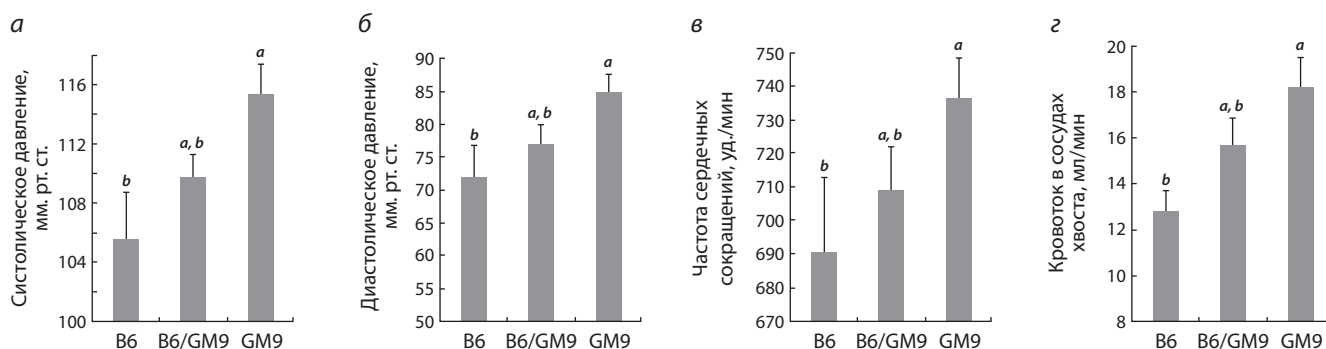


Рис. 5. Влияние нокаута гена контактин-5 на показатели кровообращения у взрослых мышей (11–13 нед).

а – систолическое давление; б – диастолическое давление; в – частота сердечных сокращений; г – объемная скорость кровотока в сосудах хвоста.

дечно-сосудистой деятельности не отличались от особей дикого и мутантного генотипов (рис. 5).

Обсуждение

Как было описано ранее, у трансгенных мышей линии GM9 трансген *pGoatcasGMCSF*, встроенный внутри гена контактин 5, функционировал так же, как и при интегрировании в другие области генома. Было показано, что у линии GM3 трансген локализован в гене *Prkcb1* (хромосома 7), у линии GM11 – в некодирующем участке хромосомы 9, а у линии GM20 – в мобильном SINE-элементе хромосомы 6. Это свидетельствует о том, что место интеграции изучаемых трансгенов в реципиентный геном не оказывает существенного влияния на экспрессию исследованных генно-инженерных конструкций (Burkov et al., 2013). Важно отметить отсутствие эктопической экспрессии трансгена в линии GM9 и, соответственно, влияния рекомбинантного белка GM-CSF на гемопоэтические и другие физиологические показатели у трансгенных животных (Burkov et al., 2013). Линия трансгенных мышей GM9 может быть интересна для изучения роли сплайсинга в функции гена *Cntn5* в мозге и других тканях тела. Мы показали, что интеграция трансгена в интрон *Cntn5* приводит к нарушению сплайсинга центральных

экзонов, следствием чего, возможно, является и снижение общего количества транскриптов в тканях тела, что было обнаружено для сердца. Для выяснения этих вопросов необходимо провести анализ экспрессии различных изоформ *Cntn5* в специфических отделах мозга и других органов животных.

Функциональная значимость изоформ контактина-5 становится предметом комплексного изучения лишь в последнее время. Тем не менее проведенное нами фенотипирование мышей линии GM9 показывает, что генно-инженерное изменение экспрессии гена *Cntn5* отражается на количественных характеристиках таких физиологически значимых процессов, как накопление жира и функционирование сердечно-сосудистой системы. Мутантные мыши (GM9) характеризуются меньшей по сравнению с особями дикого типа (B6) массой тела. Эти отличия, выраженные в момент отъема от матерей, сохраняются и у взрослых особей. Причем весовая разница между генотипами определяется не столько отставанием мутантов в развитии скелета и мышц, образующих в сумме тощую массу, сколько существенно меньшим накоплением жира. Исследуемые линии показывают также статистически значимые различия по параметрам, характеризующим интенсивность кровообращения. Значения

артериального давления у мышей дикого типа (B6) соответствуют величинам, характерным для данной линии (Mattson, 2001). Мутантные мыши (GM9) превосходят особей дикого типа (B6) по значениям артериального давления, частоте сердечных сокращений и скорости кровотока в сосудах хвоста. Следует отметить, что гетерозиготные особи показывают промежуточные значения между мутантами и диким типом по всем измеренным морфофункциональным параметрам.

Проведенное исследование является реализацией принципа «черного ящика» в приложении к расшифровке функциональной значимости как отдельных генов, так и генных сетей, в формировании которых эти гены участвуют. Наши результаты показывают, что инсерционный мутагенез гена контактин 5 дает целый спектр фенотипических эффектов. Эти эффекты, а именно изменения липидного обмена и параметров гемодинамики, согласуются с эпидемиологическими наблюдениями, в которых отмечаются ассоциации полиморфизмов гена *Cntn5* со склонностью людей к ожирению и с предрасположенностью к артериальной гипертензии (Nikray et al., 2012). Высокая социальная значимость данных полиэтиологических патологий (ожирение и гипертензия) и недостаточное понимание их генетической детерминации указывают на необходимость детализации процессов, предопределяющих ассоциации индивидуальных вариаций экспрессии гена *Cntn5* с предрасположенностью к заболеваниям. Принципиально важно, что для продвижения в данном направлении, которое имеет не только теоретическую, но и прикладную значимость, создана доступная для исследований новая линия животных с целевой мутацией гена контактин-5.

Благодарности

Экспериментальная часть исследования и анализ результатов выполнены при поддержке Российского научного фонда – проект 16-14-00095. Приобретение лабораторных животных и использование инструментальных ресурсов было обеспечено средствами государственного задания по проекту № 0324-2015-0004.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Ashrafi S., Betley J.N., Comer J.D., Brenner-Morton S., Bar V., Shimoda Y., Watanabe K., Peles E., Jessell T.M., Kaltschmidt J.A. Neuronal Ig/Caspr recognition promotes the formation of axoaxonic synapses in mouse spinal cord. *Neuron*. 2014;81(1):120-129.

Burbach J.P.H., van der Zwaag B. Contact in the genetics of autism and schizophrenia. *Trends Neurosci*. 2009;32:69-72.

Burkov I., Serova I., Battulin N., Smirnov A., Babkin I., Andreeva L., Dvoryanchikov G., Serov O. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice. *Transgenic Res*. 2013;22(5):949-964.

Gogliotti R.G., Lutz C., Jorgensen M., Huebsch K., Koh S., Didonato C.J. Characterization of a commonly used mouse model of fear reveals increased seizure susceptibility and heightened fear response in FVB/N mice. *Neurobiol. Dis*. 2011;43(1):142-151. DOI 10.1016/j.nbd.2011.03.002.

Fernandez T., Morgan T., Davis N., Klin A., Morris A., Farhi A., Lifton R.P., State M.W. Disruption of Contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 2008;82:1385.

Fu C., Begum K., Overbeek P.A. Primary ovarian insufficiency induced by Fanconi anemia E mutation in a mouse model. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0144285. DOI 10.1371/journal.pone.0144285.

Kleijer K.T., Zuko A., Shimoda Y., Watanabe K., Burbach J.P. Contactin-5 expression during development and wiring of the thalamocortical system. *Neuroscience*. 2015;310:106-113.

Li H., Takeda Y., Niki H., Ogawa J., Kobayashi S., Kai N., Akasaka K., Asano M., Sudo K., Iwakura Y., Watanabe K. Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition molecule NB-2. *Eur. J. Neurosci*. 2003;17(5):929-936.

Lionel A.C., Crosbie J., Barbosa N., Goodale T., Thiruvahindrapuram B., Rickaby J., Gazzellone M., Carson A.R., Howe J.L., Wang Z., Wei J., Stewart A.F., Roberts R., McPherson R., Fiebig A., Franke A., Schreiber S., Zwaigenbaum L., Fernandez B.A., Roberts W., Arnold P.D., Szatmari P., Marshall C.R., Schachar R., Scherer S.W. Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Sci. Transl. Med*. 2011;3(95):95ra75. DOI 10.1126/scitranslmed.3002464.

Mattson D.L. Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *Am. J. Hypertens*. 2001;14:405-408.

Morrow E.M., Yoo S.Y., Flavell S.W., Kim T.K., Lin Y., Hill R.S., Mukkaddes N.M., Balkhy S., Gascon G., Hashmi A., Al-Saad S., Ware J., Joseph R.M., Greenblatt R., Gleason D., Ertelt J.A., Apse K.A., Bodell A., Partlow J.N., Barry B., Yao H., Markianos K., Ferland R.J., Greenberg M.E., Walsh C.A. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008;321:218-223.

Nakabayashi K., Komaki G., Tajima A., Ando T., Ishikawa M., Nomoto J., Hata K., Oka A., Inoko H., Sasazuki T., Shirasawa S. Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers. *J. Hum. Genet*. 2009;54:531-537.

Nava C., Keren B., Mignot C., Rastetter A., Chantot-Bastarud S., Faudet A., Fonteneau E., Amiet C., Laurent C., Jacqueline A., Whalen S., Afenjar A., Périsset D., Doummar D., Dorison N., Leboyer M., Sifroi J.P., Cohen D., Brice A., Héron D., Depienne C. Prospective diagnostic analysis of copy number variants using SNP microarrays in individuals with autism spectrum disorders. *Eur. J. Hum. Genet*. 2013;975:1-8.

Nikray M., Seda O., Tremblay J., Petrovich M., Gaudet D., Kotchen T.A., Cowley A.W., Hamet P. Genetic mapping of habitual substance use, obesity-related traits, responses to mental and physical stress, and heart rate and blood pressure measurements reveals shared genes that are overrepresented in the neural synapse. *Hypertens. Res*. 2012;35:585-591.

Ogawa J., Kaneko H., Masuda T., Nagata S., Hosoya H., Watanabe K. Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain. *Neurosci. Lett*. 1996;218(3):173-176.

Roohi J., Montagna C., Tegay D.H., Palmer L.E., DeVincent C., Pomeroy J.C., Christian S.L., Nowak N., Hatchwell E. Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. *J. Med. Genet*. 2009;46:176-182.

Van Daalen E., Kemner C., Verbeek N.E., van der Zwaag B., Dijkhuizen T., Rump P., Houben R., van't Slot R., de Jonge M.V., Staal W.G., Beemer F.A., Vorstman J.A.S., Burbach J.P.H., van Amstel H.K.P., Hochstenbach R., Brilstra E.H., Poot M. Social responsiveness scale-aided analysis of the clinical impact of copy number variations in autism. *Neurogenetics*. 2011;12:315-323.

Zuko A., Bouyain S., van der Zwaag B., Burbach J.P.H. Contactins: structural aspects in relation to developmental functions in brain disease. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol*. 2011;84:143-180.

Zuko A., Kleijer K.T., Oguro-Ando A., Kas M.J., van Daalen E., van der Zwaag B., Burbach J.P. Contactins in the neurobiology of autism. *Eur. J. Pharmacol*. 2013;719(1-3):63-74.