

УДК 577.29

МУТАНТНЫЕ МЫШИ *wal* ИМЕЮТ МУТАЦИЮ, АССОЦИИРОВАННУЮ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

© 2021 г. Э. С. Чермных^{1,*}, Д. М. Щепетов¹, член-корреспондент РАН Е. А. Воротеляк¹

Поступило 21.10.2020 г.

После доработки 31.10.2020 г.

Принято к публикации 31.10.2020 г.

Мутация *waved alopecia (wal)* возникла у мышей спонтанно. Фенотипически мутация *wal* в гомозиготном рецессивном состоянии проявляется волнистым шерстным покровом. Со временем развивается частичное облысение, что приводит к разрежению шерстного покрова у мышей. Молекулярная природа генетического повреждения *wal* до сих пор остается неизвестной, однако определены координаты локуса, в котором находится ген *wal* – участок хромосомы длиной около 10 млн п.о. на 14-й хромосоме у мыши. Мы исследовали локус *wal* с помощью секвенирования экзонов генов-кандидатов, в которых ожидали обнаружить мутацию, а также провели полногеномное секвенирование в попытке идентифицировать причину мутации *wal*. Последовательности экзонов генов-кандидатов, расположенных в данной области, не несли изменений, которые могли бы повлечь изменение структуры белка. Однако вне зоны *wal* была обнаружена мутация в гене *Slc9a9*, вероятно, не связанная с фенотипом *wal*. По данным литературы мутация в гене *Slc9a9* приводит к расстройствам аутистического спектра. Это впервые обнаруженная спонтанная мутация в гене *Slc9a9* у мышей.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, мутантные мыши, расстройства аутистического спектра, *Slc9a9*

DOI: 10.31857/S2686738921020050

Спонтанно возникающие мутации у мыши служат основой для понимания функции генов на протяжении более 100 лет. Спонтанная мутация *waved alopecia (wal)* была исследована и описана Сорокиной и Бландовой в 80-х годах XX века. У мутантных мышей *wal/wal* формируется волнистый шерстный покров, через месяц после рождения количество волосяных фолликулов резко снижается, а оставшиеся фолликулы деформируются и не продуцируют здоровых нормальных волос (Сорокина, Бландова, 1980). В возрасте 2 мес у мышей наблюдается алопеция, которая представляет собой разреженный волосяной покров, образуются дермальные кисты. Облысение не затрагивает область головы и хвоста (Сорокина, Бландова, 1980; Nakamura et al., 2001). Ген *wal* действует в эктодермальных клетках волосяного фолликула (Малинина и др 1999). По данным Сорокиной и Бландовой ген *wal* расположен на 14-й хромосоме на расстоянии 47.0 сМ (Sorokina, Blandova, 1985). Ближайшими соседними картиро-

ванными генами рядом с локусом *wal* являются гены *Pgia29* и *Klf12* (Нестерова, 2010).

Первичной задачей нашего исследования было выявление причины мутантного фенотипа мыши *wal/wal* на молекулярном уровне, а именно поиск мутантного гена и выявление типа мутации. В ходе работы нам не удалось детектировать изменений ДНК в зоне *wal*, которые приводили бы к изменению структуры белков, закодированных в соответствующем локусе. Однако у мышей *wal* обнаружена мутация в гене *Slc9a9*, ассоциированная с расстройствами аутистического спектра.

В работе были исследованы мыши *wal*, полученные в Институте общей генетики и мыши *wal*, приобретенные в питомнике “Андреевка” ФГБУН “Научный центр биомедицинский технологий” ФМБА России. Для того чтобы добиться наибольшей генетической идентичности между мутантной линией мышей *wal* и референсной Balb/c и сузить вариации генома вне локуса *wal*, мы провели возвратное скрещивание (бэккросс) этих линий. Мутантное потомство бэккросса линии *wal/wal* на исходную Balb/c отбирали по характерному волнистому фенотипу (рис. 1). В первую очередь мы исследовали гены-кандидаты, ассоциированные с мутацией в локусе *wal*. В локус *wal* входит 8 генов: *Pcdh9*, *Klhl1*, *Dach1*, *Mzt1*, *Bora*, *Dis3*, *Pibf1* и *Klf5*. Проанализировав данный локус,

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Коляцова РАН, Москва, Россия

*e-mail: elinachermnykh@mail.ru



Рис. 1. Фенотип мышей *wal*. Для сравнения на фото представлены здоровая мышь Balb/c (снизу) и мышь с мутацией *wal* (сверху).

мы выбрали потенциального гена-кандидата — протокадгерин *Pcdh9*, повреждение в котором может приводить к нарушениям в коже и ее придатках. Гены *Pcdh20* и *Pcdh17* не входят в локус *wal*, но располагаются вблизи, поэтому также были отобраны нами в качестве кандидатов. Мы провели секвенирование по Сенгеру экзонов указанных генов-кандидатов с целью выявления мутации, которая может привести к изменению структуры белка. Однако генных вариаций, приводящих к изменению структуры белка, обнаружено не было, последовательности генов *Pcdh9*, *Pcdh17* и *Pcdh20* полностью соответствовали стандартным референсным последовательностям этих генов у мыши (GRCm38/mm10), указанных в базе UCSC.

Поскольку остальные гены локуса *wal* не представляли интереса (нарушения в некоторых из них не совместимы с жизнью, в остальных — не затрагивают кожу), мы предположили, что мутация может быть ассоциирована с регуляторной областью гена или его интронными участками и провели полногеномное секвенирование мышей *wal* в сравнении с мышами линии Balb/c.

Было проведено полногеномное секвенирование двух образцов мышей *wal* и контрольной мыши Balb/c. Биоинформатическую обработку проводили, сравнивая геномы 3 особей, — первичную мышь *wal*, мышь *wal*, полученную в результате бэккросса и мышь Balb/c, а также проводили выравнивание на стандартную референсную последовательность генома мыши (GRCm38/mm10).

Координаты локуса *wal* включают примерно 10 млн п.о. (chr14:91,114,870–100,150,000). Пред-

положив, что координаты могут быть неточными, мы расширили зону поиска на 10 млн п.о. В геномном интервале chr14:85,000,000–105,000,000, где ранее был картирован локус *wal*, у мутантной мыши мы не обнаружили вариантов, приводящих к изменению последовательностей белковых продуктов генов (миссенс, нонсенс, делеций и инсерций в кодирующих участках генов, мутаций в канонических сайтах сплайсинга, мутаций в старт- и стоп-кодонах), что подтвердило результаты секвенирования по Сенгеру. Не было найдено ни одной мутации структурного гена и на протяжении всей хромосомы 14. При поиске рассматривались только варианты, присутствующие у мутантных образцов в гомозиготном состоянии и отсутствующие у контрольного образца.

Среди остальных вариантов была проведена фильтрация по следующим параметрам: зиготность: гомозиготное состояние; ненахождение в участках однонуклеотидных и прочих повторов (в частности, по данным RepeatMasker); отсутствие варианта в базе dbSNP и у мышей различных линий, в том числе Balb/cJ, согласно базе Sanger Institute Mouse Genome Projects; нуклеотидная консервативность позиции у млекопитающих не менее 90%, по данным множественного выравнивания геномов MultiZ 60-Way. С учетом этих критериев нами не обнаружено генетических изменений в интронных областях и в межгенных участках в интервале chr14:85,000,000–105,000,000, которые могли бы уложиться в простую молекулярную модель, объясняющую природу облысения мышей *wal*.

Интересно отметить, что у мышей описана мутация гена *Scel* (белок sciellin), фенотипически схожая с мутацией *wal* (Baden et al., 2005). Белок sciellin является структурным белком роговой оболочки терминально дифференцированных кератиноцитов (Kvedar et al., 1992), был картирован на 14-й хромосоме рядом с областью *wal*. Однако у исследованных нами мышей этот белок не затронут. Также в исследованиях с помощью иммуногистохимического анализа было показано, что мыши *wal* синтезируют полноценный белок sciellin (Baden et al., 2005).

Интересной находкой, хоть вероятно и не имеющей отношения к основному фенотипу, явилась мутация в гене *Slc9a9*, находящемся вне локуса *wal* на другой хромосоме. Выявленный в гомозиготном состоянии вариант chr9:95019132G>GA (инсерция одного нуклеотида — аденина) расположен в 10 экзоне гена *Slc9a9* и приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с 374 кодона (p.Asn374fs, ENSMUST00000033463) (рис. 2).

Эта мутация была обнаружена как у исходной мутантной мыши *wal*, так и у полученной после бэккросса. Из литературы известно, что мыши, нокаутные по гену *Slc9a9*, демонстрируют, в чис-

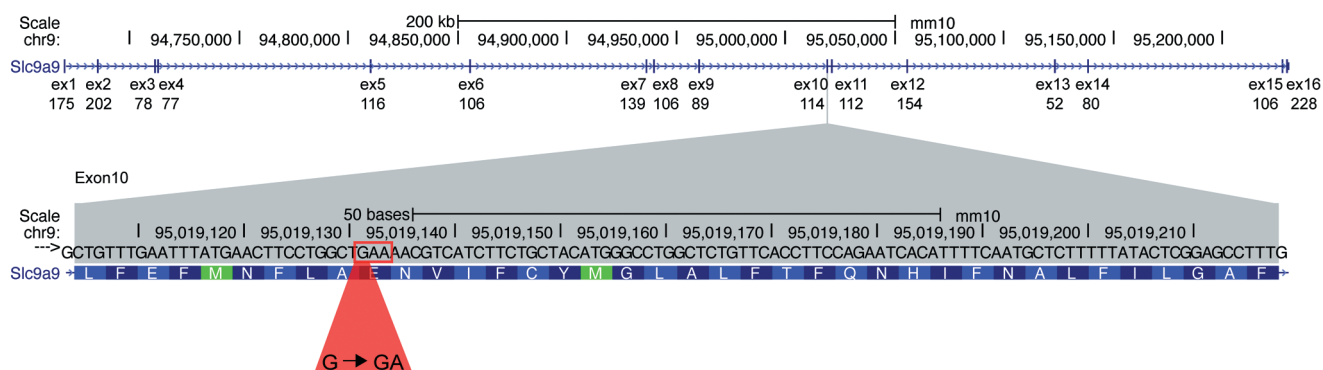


Рис. 2. Молекулярная природа мутации в гене *Slc9a9*. Выявленный в гомозиготном состоянии вариант chr9:95019132G>GA (инсерция одного нуклеотида – аденина) расположен в 10 экзоне гена *Slc9a9* и приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с 374 кодона. Координаты даны по сборке генома GRCm38/mm10 из браузера UCSC. Экзоны пронумерованы, цифры под экзонами указывают на их длину.

ле ряда прочих признаков, нарушения поведения, сходные с расстройствами аутистического спектра, и другие нейropsychиатрические нарушения, но признаки алопеции не проявляют (Patak et al., 2016; Yang et al., 2016; Ullman et al., 2018). По совокупности сведений вариант следует расценивать как вероятно патогенный в статусе вторичной (случайной) находки. В мировой литературе еще не описаны мыши со спонтанной мутацией в гене *Slc9a9*, однако генно-инженерные мутанты созданы (Yang et al., 2016; Ullman et al., 2018).

Таким образом, в геномном интервале chr14:85,000,000–105,000,000, где ранее был картирован локус *wal*, у мутантной мыши не обнаружено вариантов, приводящих к изменению последовательностей белковых продуктов генов. Вероятно, что у мутации нестандартный тип (например, вставка ретротранспозона в область регуляторного элемента). Можно также предположить, что локус определен неверно. Еще одной возможной причиной можно рассматривать ограничения биоинформатического анализа. Метод не позволяет выявлять вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод не предназначен для определения фазы пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления сложных хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

Мутация *wal* представляет большой интерес и заслуживает дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ф.А. Коновалову и Е. Толмачевой (Лаборатория Клинической Биоин-

форматики) за биоинформатическую обработку данных полногеномного секвенирования генома мыши.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sorokina J.D., Blandova Z.K. Waved alopecia // *Mouse News Lett.* 1985; 73: 23.
2. Сорокина Ю.Д., Бландова З.К. Наследственное изменение кожного и шерстного покрова у мышей BALB/c-walY. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных: *Материалы Всесоюз. конф. М.*, 1980: 79–80.
3. Nakamura M., Sundberg J.P., Paus R. Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables. // *Exp Dermatol.* 2001; 10 (6): 369–90. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2001.100601.x>
4. Малинина Н.А., Мартынова М.Ю., Конюхов Б.В. Мутантный ген *wal* действует в клетках волосных фолликулов. *Онтогенез.* 1999; 30 (5): 362–365.
5. Нестерова А.П. Взаимодействие мутантных генов *Fgf5go-Y*, *hr*, *we* и *wal*, нарушающих развитие и рост волос у мыши. 2010 год, Диссертация, кандидат биологических наук.
6. Kvedar J.C., Manabe M., Phillips S.B., Ross B.S., Baden H.P. Characterization of sciellin, a precursor to the cornified envelope of human keratinocytes. // *Differentiation.* 1992; 49 (3): 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1992.tb00667.x>
7. Baden H.P., Champliand M.F., Sundberg J.P., Viel A. Targeted deletion of the sciellin gene resulted in normal

- development and maturation. // *Genesis*. 2005; 42 (4): 219–228.
<https://doi.org/10.1002/gene.20133>
8. Patak J., Hess J.L., Zhang-James Y., Glatt S.J., Faraone S.V. SLC9A9 Co-expression modules in autism-associated brain regions. // *Autism Res*. 2017; 10 (3): 414–429.
<https://doi.org/10.1002/aur.1670>
 9. Yang L., Faraone S.V., Zhang-James Y. Autism spectrum disorder traits in Slc9a9 knock-out mice. // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2016; 171B (3): 363–376.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32415>
 10. Ullman J.C., Yang J., Sullivan M., Bendor J., Levy J., Pham E., Silm K., Seifkar H., Sohal V.S., Nicoll R.A., Edwards R.H. A mouse model of autism implicates endosome pH in the regulation of presynaptic calcium entry. // *Nat. Commun*. 2018; 9 (1): 330.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02716-5>

MUTANT WAL MICE HAVE MUTATION ASSOCIATED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

E. S. Chermnykh^{a, #}, D. M. Schepetov^a, and Corresponding Member of RAS E. A. Vorotelyak^a

^a *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: elinachermnykh@mail.ru*

The *waved alopecia (wal)* mutation arose spontaneously in mice. Phenotypically, the *wal* mutation in a homozygous recessive state is manifested by a wavy coat. Over time, partial baldness develops, which leads to a thinning of the coat in mice. The molecular nature of the genetic defect in *wal* is still unknown; however, the coordinates of the locus in which the *wal* gene is located, a chromosome section of about 10 million bp in length, has been determined on chromosome 14 in a mouse. We examined the *wal* locus by sequencing the exons of candidate genes in which the mutation was expected, and performed genome-wide sequencing to identify the cause of the *wal* mutation. The sequences of exons of candidate genes located in this region did not carry changes that could lead to a change in the structure of the protein. However, outside the *wal* zone, a mutation in the *Slc9a9* gene was found, which is probably not associated with the *wal* phenotype. According to the literature, a mutation in the *Slc9a9* gene leads to autism spectrum disorders. This is the first discovered spontaneous mutation in the *Slc9a9* gene in mice.

Keywords: whole genome sequencing, mutant mice, autism spectrum disorders, Slc9a9