

УДК 577.2+577.29

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА МУЛЬТИМЕРИНА-1 В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ МЫШЕЙ КАК РЕЗУЛЬТАТ ГЕНОМНОЙ МОДИФИКАЦИИ ЛОКУСА АЛЬФА-СУНУКЛЕИНА

© 2020 г. К. Д. Чапров^{1,2,*}, В. В. Голоборщев^{2,3}, Т. В. Тарасова^{1,2}, Е. В. Тетерина¹,
М. В. Корокин⁴, В. О. Солдатов⁴, М. В. Покровский⁴, В. Г. Кучеряну³,
член-корреспондент РАН С. Г. Морозов³, Р. К. Овчинников¹

Поступило 10.06.2020 г.

После доработки 25.06.2020 г.

Принято к публикации 25.06.2020 г.

Мультимерин-1 (*Mmgn-1*) – белок, содержащийся в тромбоцитах и эндотелии кровеносных сосудов. Его функция и роль в патологии окончательно не изучены. Модификации локуса альфа-синуклеина (*Snca*), расположенного в геноме мыши на расстоянии 160 Кб от *Mmgn-1*, могут влиять на активность *Mmgn-1*. Нами была исследована экспрессия *Mmgn-1* в коре головного мозга трех линий мышей с нокаутом *Snca*: *B6(Cg)-Snca^{tm1.2Vlb}/J*, *B6;129-Snca^{tm1Sud}/J* и *B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J*. У *B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J* мышей, в геноме которых принесенная последовательность содержит бактериальный ген *neo* и активный промотор фосфолипидкиназы (*Pgk1*), ориентированный в направлении гена *Mmgn-1*, выявлено 35-кратное повышение уровня мРНК для *Mmgn-1*. Обнаруженный нами эффект влияния этих посторонних последовательностей на регуляторные элементы гена *Mmgn-1* следует учитывать при работе с альфа-синуклеин нокаутной линией *B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J*, которая широко используется в лабораториях мира для исследования механизмов нейродегенерации.

Ключевые слова: мультимерин-1, генетический нокаут, альфа-синуклеин

DOI: 10.31857/S2686738920050078

Физиологические функции высокомолекулярного растворимого белка мультимерина-1 (*Mmgn-1*), известного так же под названием эластинового микрофибрилярного интерфейсера 4 (*elastin microfibril interfacier 4 – EMILIN-4*), до конца не исследованы. Описанная у мышей линии *C57BL/6J-OlaHsd* спонтанная делеция генетического локуса, в котором располагается ген, кодирующий *Mmgn-1*, не ведет к выраженному фенотипу, из чего следует, что его отсутствие может быть компенсировано в процессе эмбрионального развития [1]. Однако детальный анализ методом микрокомпьютерной томографии (μ СТ) костных тканей *C57BL/6J-OlaHsd* мышей выявил снижение массы губчатого вещества эпифизов

трубчатых костей, а гистологическое исследование клеточного состава костей показало повышенное содержание остеобластов при снижении их минерализации [2]. Это наблюдение и тот факт, что уровень экспрессии гена *Mmgn-1* в костных тканях достаточно высок, явилось основанием для исследования его участия в метаболических процессах в остеобластах и формировании костей. В большом количестве белок *Mmgn-1* содержится так же в эндотелии кровеносных сосудов и в альфа-гранулах тромбоцитов. Он синтезируется на достаточно высоком уровне в мегакариоцитах и был выявлен на поверхности активированных тромбоцитов в комплексе с фактором фон Виллебранда [3].

У мышей с делецией локуса *Mmgn-1* обнаружены изменения в системе гемостаза, в частности, нарушение агрегации тромбоцитов и формирования тромба, а добавление мультимерина в *in vitro* экспериментах нивелировало эти нарушения [4]. В плазме крови *Mmgn-1* не детектируется рутинными методами, но повышение его содержания в клеточной фракции крови больных острым миелоидным лейкозом (*acute myelogenous leukemia AML*) коррелирует с низким шансом ремиссии,

¹ Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, Россия

² Cardiff University, School of Biosciences, Cardiff, United Kingdom

³ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт фармакологии живых систем, Белгород, Россия

*e-mail: chaprov@ipac.ac.ru

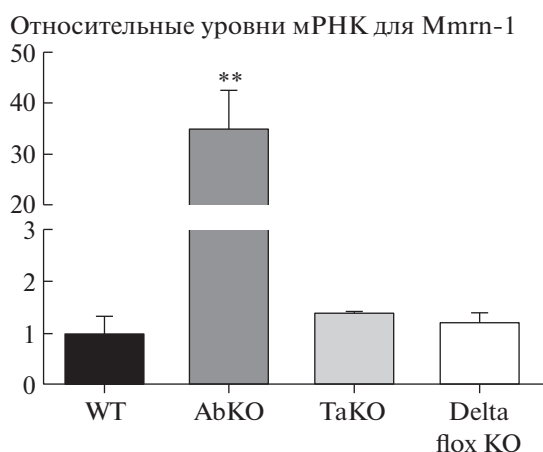


Рис. 1. Сравнительный анализ уровней экспрессии гена *Mmrgn-1* в трех линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина. Содержание мРНК для *Mmrgn-1* определено методом количественного ОТ-ПЦР в реальном времени в тканях коры головного мозга мышей B6;129X1-*Sncatm1Rosl/J* (AbKO), B6;129-*Sncatm1Sud/J* (TaKO), B6(Cg)-*Sncatm1.2Vlb/J* (delta flox KO) и контрольных мышей дикого типа (WT). $M \pm SEM$, $n = 6$ для каждой группы; ** $p < 0.01$ при сравнении AbKO с остальными группами. One-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test.

более высоким риском рецидива заболевания и плохой выживаемостью пациентов [5].

Исследования нарушения функции *Mmrgn-1* в экспериментальных животных выполнены в основном с использованием линии мышей C57BL/6J-OlaHsd [6]. В геноме этой линии мышей спонтанная делеция протяженного участка размером 350 т.п.н. [1] включает помимо гена альфа-синуклеина (*Snca*), еще и *Mmrgn-1* поскольку эти гены расположены в непосредственной близости (около 160 т.п.н.) один от другого. Поскольку белку α -синуклеину (α -syn), являющемуся важным компонентом телец Леви, отводится важная роль в патогенезе болезни Паркинсона, было независимо создано несколько линий мышей с генетическими модификациями локуса *Snca* [7].

Нельзя исключить влияния вносимых модификаций на прилежащие области генома. В данной работе нами было проведено сравнительное исследование уровней экспрессии *Mmrgn-1* в трех линиях мышей с делецией *Snca*: B6;129X1-*Sncatm1Rosl/J* [AbKO] полученной из лаборатории A. Rosenthal [8], B6;129-*Sncatm1Sud/J* [TaKO], полученной из лаборатории T. Sudhof [9] и B6(Cg)-*Sncatm1.2Vlb/J* [delta flox KO], полученной из лаборатории V. Buchman [10, 11].

Чтобы выяснить, могут ли различные модификации *Snca* локуса влиять на экспрессию гена *Mmrgn-1*, расположенного всего в 160 Kb от *Snca*, нами было исследовано содержание мРНК

Mmrgn-1 в коре головного мозга методом ОТ-PCR в реальном времени.

Из тканей коры головного мозга самцов в возрасте 3 месяцев выделяли тотальную РНК с помощью наборов RNeasy Plus Mini (Qiagen, Германия) по инструкции производителя. 2 мкг полученной РНК использовали для синтеза комплементарной цепи ДНК в реакции обратной транскрипции и последующей амплификации реагентами qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколу производителя в режиме реального времени в установке BioRad CFX 96 (BioRad, США). Использовали праймеры: *Mmrgn1*-for: 5'-GGACACTGGCTCTCATTTAC-3' и *Mmrgn1*-rev: 5'-CAGCATTGGATGTCTTCTGAG-3'. В качестве референсного гена внутреннего контроля использовали глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФДГ) мыши. Последовательности праймеров:

*q_m_GAPDH*_for: 5'-CACTGAGCATCTCCCTCACA-3' и

*q_m_GAPDH*_rev: 5'-GTGGGTGCAGCGAAC-TTTAT-3'.

Проведенный анализ относительных уровней экспрессии *Mmrgn-1* в трех линиях мышей с генетическим нокаутом *Snca* показал, что его уровень был повышен в 35 раз у мышей линии AbKO, в то время как у delta flox KO и TaKO мышей он практически не отличался от уровня экспрессии *Mmrgn-1* в коре головного мозга контрольных дикого типа (рис. 1). Технология конструирования исследованных нокаутных линий включала использование эмбриональных стволовых клеток на стадии гомологической рекомбинации альфа-синуклеинового локуса с последующей селекцией клонов по продукции введенного в составе таргетной кассеты бактериального гена *neo*. При этом непосредственные модификации прилежащих к гену *Snca* последовательностей различались (рис. 2). Так, в линии AbKO после удаления второго и третьего экзонов альфа-синуклеина с прилегающими последовательностями (размер делеции порядка 3.2 Kb) в модифицированном локусе оставался фрагмент плазмидного вектора pGT-N39 размером 1.9 Kb, содержащий кодирующую часть гена *neo* под промотором мышиного гена фосфолипидкиназы *Pgk1* (рис. 2). В нокаутной линии TaKO так же удалены второй и третий экзоны *Snca* с прилегающими участками, и общий размер делеции составил 3.9 Kb. Оставшаяся в модифицированном локусе генома посторонняя последовательность включала фрагмент плазмиды pTK-Neo3A, содержащий ген *neo* под промотором мышиного гена субъединицы A полимеразы II *Polr2a* (рис. 2).

Важно отметить, что ориентации *neo* кассеты в геномах AbKO и TaKO линий различались. В случае AbKO ген *neo* расположен дистальнее гена

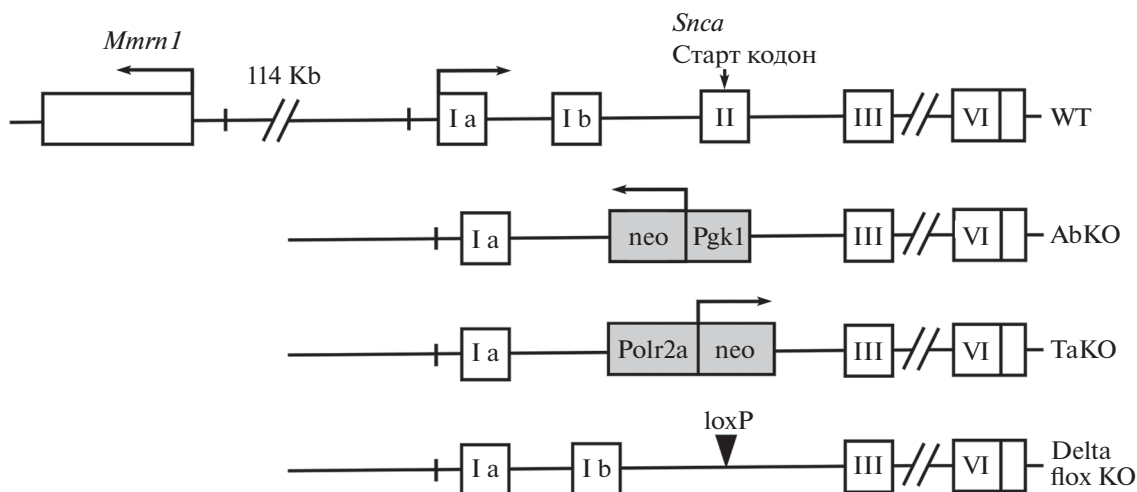


Рис. 2. Схема модификаций локуса *Snca* гена в нокаутных линиях мышей. Закрашены привнесенные в мышинный геном посторонние последовательности: ген *neo*, *LoxP* сайт и промоторы генов фосфоглицераткиназы (*Pgk1*) и субъединицы А полимеразы II (*Polr2a*). Стрелками указано направление транскрипции.

Snca и ориентирован в обратном направлении по отношению к модифицированному гену. В геноме ТаКО мышей промотор каскады *neo* лежит проксимальнее по отношению к промотору *Snca* и ориентирован в том же направлении (рис. 2). В третьей анализированной нами линии – delta flox KO – делеция *Snca* гена была проведена с минимальными модификациями локуса. Из генома мыши был удален третий экзон, содержащий START-кодон, и небольшой участок прилегающей интронной последовательности размером всего 1.1 Kb, что существенно меньше, чем в линиях AbKO и ТаКО. Более того, и ген *neo*, и все значимые посторонние последовательности были удалены из модифицированного локуса полученных мышей. Единственной привнесенной вставку, оставшейся в геноме delta flox KO мышей, является лишь *LoxP* сайт размером 34 bp (рис. 2).

Эти данные указывают на то, что функционально активный промотор рGT-N39 каскады в геноме линии AbKO [8], ориентированный в направлении *Mmrn-1*, мог оказывать активирующий эффект на регуляторные последовательности этого гена. А ориентированный в обратном от гена *Mmrn-1* направлении промотор из вектора рТК-Neo3A в конструкции ТаКО [9] обладал существенно меньшим воздействием на экспрессию гена *Mmrn-1*. В новой же нокаутной линии delta flox KO [10, 11] экспрессия гена *Mmrn-1* практически не отличалась от экспрессии в немодифицированном геноме мышей дикого типа на том же генетическом фоне (рис. 1).

Биоинформационный анализ показал, что потенциальные регуляторные последовательности располагаются между генами *Snca* и *Mmrn-1*, а

также в интронах *Mmrn-1*. В частности, между генами находятся два промотор-фланкирующих домена, а внутри *Mmrn-1* есть два энхансера и два сайта связывания репрессора транскрипции CTCF, который вовлечен в регуляцию архитектуры хроматина и является разграничителем между эу- и гетерохроматином [12].

Полученные данные позволяют с высокой степенью вероятности предположить, что именно нарушения в работе регуляторных элементов генома являются причиной измененной экспрессии *Mmrn-1* у AbKO мышей.

Несмотря на то, что нокаутная линия мышей AbKO (B6;129X1-*Snca*^{tm1Rosl}/J) широко используется в лабораториях мира для исследования нейродегенерации, подробный анализ уровня экспрессии *Mmrn-1* ранее выполнен не был.

Работы с животными проводили в соответствии с приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики”.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование финансировано грантом РФФ 19-14-00064, биоинформационный анализ – грантом РФФИ 18-04-00515. Разведение и содержание животных было с использованием оборудования ЦКП ИФВ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Specht C.G., Schoepfer R. Deletion of multimerin-1 in α -synuclein-deficient mice. // *Genomics*. 2004. V. 83. № 6. P.1176–1178. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.014>
2. Liron T., Raphael B., Hiram-Bab S., et al. Bone loss in C57BL/6J-OlaHsd mice, a substrain of C57BL/6J car-

- rying mutated alpha-synuclein and multimerin-1 genes. // *Journal of Cellular Physiology*. 2018. V. 233. № 1. P. 371–377.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25895>
3. *Jeimy S.B., Tasneem S., Cramer E.M., et al.* Multimerin 1. // *Platelets*. Taylor and Francis Ltd.; 2008. V. 19. P. 83–95.
<https://doi.org/10.1080/09537100701832157>
 4. *Reheman A., Tasneem S., Ni H., et al.* Mice with deleted multimerin 1 and α -synuclein genes have impaired platelet adhesion and impaired thrombus formation that is corrected by multimerin 1. // *Thrombosis Research*. 2010. V. 125. № 5.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.009>
 5. *Laszlo G.S., Alonzo T.A., Gudgeon C.J., et al.* Multimerin-1 (MMRN1) as novel adverse marker in pediatric acute myeloid leukemia: A report from the Children's Oncology Group. // *Clinical Cancer Research*. 2015. V. 21. № 14. P. 3187–3195.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2684>
 6. *Mekada K., Abe K., Murakami A., et al.* Genetic differences among C57BL/6 substrains. // *Experimental Animals*. 2009. V. 58. № 2. P. 141–149.
<https://doi.org/10.1538/expanim.58.141>
 7. *Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G.* The Synucleinopathies: Twenty Years on // *Journal of Parkinson's Disease*. 2017. V. 7(s1). P. 53–71.
<https://doi.org/10.3233/JPD-179005>
 8. *Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. // *Neuron*. 2000. V. 25. № 1. P. 239–252.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80886-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80886-7)
 9. *Schlüter O.M., Fornai F., Alessandri M.G., et al.* Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. // *Neuroscience*. 2003. V. 118. № 4. P. 985–1002.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00036-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00036-8)
 10. *Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A.A., et al.* A novel resource for studying function and dysfunction of α -synuclein: Mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression // *Scientific Reports*. 2015. V. 13. № 5. P. 16615.
<https://doi.org/10.1038/srep16615>
 11. *Roman A.Y., Limorenko G., Ustyugov A.A., et al.* Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated Snca gene and Rosa26-stop-lacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6 // *Transgenic Research*. 2017. V. 26. № 2. P. 301–307.
<https://doi.org/10.1007/s11248-016-9995-8>
 12. *Phillips J.E., Corces V.G.* CTCF: Master Weaver of the Genome // *Cell*. 2009. V. 137. № 7. P. 1194–1211.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.001>

INCREASED EXPRESSION OF THE MULTIMERIN-1 GENE IN ALPHA-SYNUCLEIN KNOCKOUT MICE

**K. D. Chaprov^{a,b,#}, V. V. Goloborshcheva^{b,c}, T. V. Tarasova^{a,b}, E. V. Teterina^a, M. V. Korokin^d,
V. O. Soldatov^d, M. V. Pokrovskiy^d, V. G. Kucheryanu^c,
corresponding member of the RAS S. G. Morozov^c, and R. K. Ovchinnikov^a**

^a *Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russian Federation*

^b *Cardiff University, School of Biosciences, Cardiff, United Kingdom*

^c *Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation*

^d *Research institute of Living Systems Pharmacology, Belgorod, Russian Federation*

[#] *e-mail: chaprov@ipac.ac.ru*

Multimerin-1 (Mmrn-1) is a soluble protein, also known as elastin microfibril interfacier 4 (EMILIN-4), found in platelets and in the endothelium of blood vessels. Its function and role in pathology are still not fully understood. Genetic modifications in alpha-synuclein gene (*Snca*) locus that mapped 160 Kb apart from *Mmrn-1* in mouse genome, could weigh with regulatory elements of *Mmrn-1* gene. We have studied the Mmrn-1 expression in brain cortex of three mouse lines with *Snca* knock-out: B6(Cg)-*Snca*^{tm1.2V1b}/J, B6;129-*Snca*^{tm1Sud}/J и B6;129X1-*Snca*^{tm1Rosl}/J. The 35-fold increase for Mmrn-1 mRNA level have been found in B6;129X1-*Snca*^{tm1Rosl}/J mice that carry in their genome foreign sequences including bacterial gene neo and a strong promoter of a mouse phosphoglycerate kinase (Pgk1) oriented towards *Mmrn-1* gene. This effect on regulatory elements of *Mmrn-1* gene as a result of modifications in *Snca* locus should be taken into consideration when using B6;129X1-*Snca*^{tm1Rosl}/J line, that is widely applied for study of neurodegeneration mechanisms.

Keywords: Multimerin-1, knock-out mice, α -synuclein