

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВОСПРОИЗВОДИМЫХ ФОРМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

© 2020 г. О. Е. Редина^{1,2,*}, В. А. Девяткин^{1,2}, Н. И. Ершов¹, А. Л. Маркель^{1,2}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский государственный университет, кафедра молекулярной биологии
и биотехнологии, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: oredina@ngs.ru

Поступила в редакцию 18.02.2019 г.

После доработки 21.03.2019 г.

Принята к публикации 09.04.2019 г.

В работе проведен анализ распределения полиморфных локусов у крыс разных гипертензивных линий. При анализе транскрибируемых локусов крыс НИСАГ (ISIAH) и соответствующих им локусов 11 других гипертензивных линий/сублиний крыс максимальная частота встречаемости одинаковых SNPs у разных линий составила 0.58 (т.е. у семи из 12 гипертензивных линий/сублиний). Анализ геномных последовательностей 11 гипертензивных линий/сублиний крыс, моделирующих разные формы гипертензии, также не выявил ни одного SNP, общего для всех 11 взятых в анализ гипертензивных линий/сублиний крыс. Анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что артериальная гипертензия является генетически гетерогенным заболеванием.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, полиморфизм, линии гипертензивных крыс, генетическая гетерогенность.

DOI: 10.31857/S0016675820020101

Изучение генетических основ проявления полигенных социально значимых заболеваний — важная задача современной медицинской генетики. Известно, что в развитии полигенных заболеваний значительную роль может играть полиморфизм, как в кодирующих, так и в регуляторных последовательностях генов. Идентификация генетических вариантов, ассоциированных с развитием полигенных заболеваний, помогает определению генетической базы патологии [1, 2] и служит выявлению молекулярных мишеней для разработки новых лекарственных препаратов, а также помогает наметить наиболее рациональные подходы к лечению и профилактике [3].

Артериальная гипертензия (АГ), или гипертоническая болезнь — широко распространенное заболевание, основным признаком которого является стабильное повышение артериального давления (АД). В человеческой популяции моногенно контролируемые формы АГ встречаются чрезвычайно редко, в большинстве случаев проявление АГ контролируется полигенно. В базе данных RGD (<https://rgd.mcw.edu/>) в настоящее время представлено более 700 генов, ассоциированных с патогенезом АГ, тем не менее изучение генетической природы АГ остается актуальной проблемой.

Известно, что на развитие АГ существенное влияние могут оказывать наряду с генетическими также средовые факторы. Чтобы исключить влияние последних, изучение генетической основы заболевания проводят на разных линиях крыс, моделирующих АГ и содержащихся на строго контролируемой диете и в константных средовых условиях [4].

Ранее методом RNA-Seq были проведены поиск нуклеотидных вариантов (SNPs), специфических для крыс линии НИСАГ (ISIAH) с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией, и сравнение найденных SNPs с данными секвенирования геномов 42 других линий и сублиний крыс, имеющихся в базах данных, 11 из которых известны как гипертензивные. Были показаны значительные отличия генотипа крыс НИСАГ от генотипов всех проанализированных гипертензивных линий/сублиний крыс. Работа позволила выявить 1849 SNPs, специфических для крыс линии НИСАГ, а также 158 SNPs, встречающихся только у гипертензивных линий крыс, но не встречающихся у других линий крыс с нормальным уровнем АД [5]. Последняя группа из 158 SNPs является наиболее интересной для поиска общих, либо наиболее часто встречающихся нук-

леотидных вариантов, ассоциированных с гипертензией. С учетом того, что разные модели АГ, представленные разными гипертензивными линиями, могут иметь специфический набор полиморфных локусов, целью настоящей работы было проведение анализа распределения полиморфных локусов у крыс разных гипертензивных линий. Предполагалось найти ряд полиморфных сайтов, свойственных всем без исключения гипертензивным, но не нормотензивным, линиям с тем чтобы идентифицировать некое “генетическое ядро” АГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подробное описание методики проведения анализа транскриптома (RNA-Seq) было сделано ранее [5]. Коротко: RNA-Seq анализ был проведен у самцов гипертензивной линии крыс НИСАГ/Icgn (наследуемая индуцируемая стрессом артериальная гипертензия, ISIAH – в англоязычной литературе) и WAG/GSto-Icgn (Wistar Albino Glaxo). Последние использованы как нормотензивный контроль. Крысы были получены из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН, где они содержались в стандартных условиях и получали стандартный полнорационный корм и воду без ограничения. В каждой экспериментальной группе было по шесть животных. От каждого животного в RNA-Seq анализ брали образцы пяти тканей (ствол мозга, гипоталамус, надпочечник, корковое и мозговое вещество почки). Секвенирование всех тканей проводили отдельно. Эксперимент был выполнен в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных и одобрен биоэтическим комитетом ИЦиГ СО РАН.

Анализ RNA-Seq проводили в ЗАО “Геноаналитика” (Москва, РФ). Все образцы анализировались как биологические повторы. Использовали: Dynabeads mRNA Purification Kit (Ambion, США) для получения мРНК и NEBNext mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina (NEB, США) для получения кДНК библиотек. Секвенирование кДНК библиотек проводили на платформе Illumina. Полученные данные картировали на референсный геном крысы (Rnor_5.0/gn5) с помощью программы TopHat2 (v2.0.13) [6]. Аннотацию генов проводили в базе данных NCBI Gene. Качество картированных данных оценивали с помощью модуля ‘CollectRnaSeqMetrics’ в пакете программ Picard (v2.4.1) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). С помощью модуля Picard ‘MarkDuplicates’ из картированных данных в формате bam, полученных для пяти различных тканей каждого животного, удаляли потенциальные ПЦР-дубликаты, после чего использовали модуль Picard ‘MergeSa-

mFiles’ для объединения данных по каждому животному в один пул.

Транскриптомные данные крыс НИСАГ и WAG выравнивались на референсный геном gn5 (strain BN/NhsdMcwi). Для каждой особи был получен GVCF-файл отличий от референса, после чего все GVCF обеих линий одновременно были генотипированы (joint genotyping) относительно этого референса. Определение SNPs проводили в пакете программ GATK (Genome Analysis Toolkit) [7] с учетом параметров фильтрации недостоверных позиций, согласно рекомендациям разработчиков для данных RNA-Seq. Дополнительно использовали следующие критерии: отобраны только те позиции, генотип которых установлен хотя бы для трех животных в каждой из экспериментальных групп, так чтобы генотип НИСАГ был гомозиготным по альтернативному аллелю (Alt1/Alt1) во всех детектированных образцах, а генотип WAG не содержал этого аллеля (Alt1/* и */Alt1) во всех детектированных образцах. Покрытие генотипов Alt1/Alt1 должно было составлять ≥ 10 хотя бы в одной из библиотек НИСАГ.

Для определения SNPs, встречающихся только у гипертензивных линий крыс, проводили сравнение полученного для крыс НИСАГ списка нуклеотидных замен с данными, имеющимися в базе RGSC (Rat Genome Sequencing Consortium) для последовательностей геномов 42 линий и сублиний [8], среди которых были 11 линий/сублиний, моделирующих различные формы гипертензии (FHH/EurMcwi, LH/MavRrrc, MHS/Gib, SBH/Ygl, SHR/OlaIpcv, SHRSF/Gla, SHR/NCrPrin, SHR/NHsd, SHR/OlaIpcvPrin, SS/Jr, SS/JrHsd-Mcwi), 10 линий крыс (FHL/EurMcwi, LN/MavRrrc, LL/MavRrrc, MNS/Gib, SBN/Ygl, SR/Jr, WKY/N, WKY/Gla, WKY/NCrI, WKY/NHsd), которые принято использовать в качестве нормотензивного контроля, а также 21 линия крыс (ACI/N, ACI/EurMcwi, BBDP/Wor, BN-Lx/Cub, BN-Lx/CubPrin, BN/SsN, BUF/N, DA/BklArbNsi, F334/N, F344/NHsd, F344/NCrI, SUO_F344, GK/Ox, LE/Stm (SOLiD), LEW/CrI, LEW/NCrIBR, LE/Stm (Illumina), M520/N, MR/N, WAG/Rij, WN/N), используемых в экспериментальных исследованиях, не связанных с гипертензией.

В настоящей работе использовали часть ранее полученных данных (см. сайт ФИЦ ИЦиГ СО РАН, дополнительный файл_2, <http://icg.nsc.ru/isiah/snp-2/>), которые представляют собой список SNPs, встречающихся только у гипертензивных линий крыс, а также геномные данные перечисленных выше 11 линий/сублиний, моделирующих различные формы гипертензии, полученные из базы RGSC (Rat Genome Sequencing Consortium) [8]. Сравнение однонуклеотидных замен, найденных у крыс НИСАГ/Icgn и WAG/GSto-Icgn, с генотипами 42 линий/сублиний проводилось

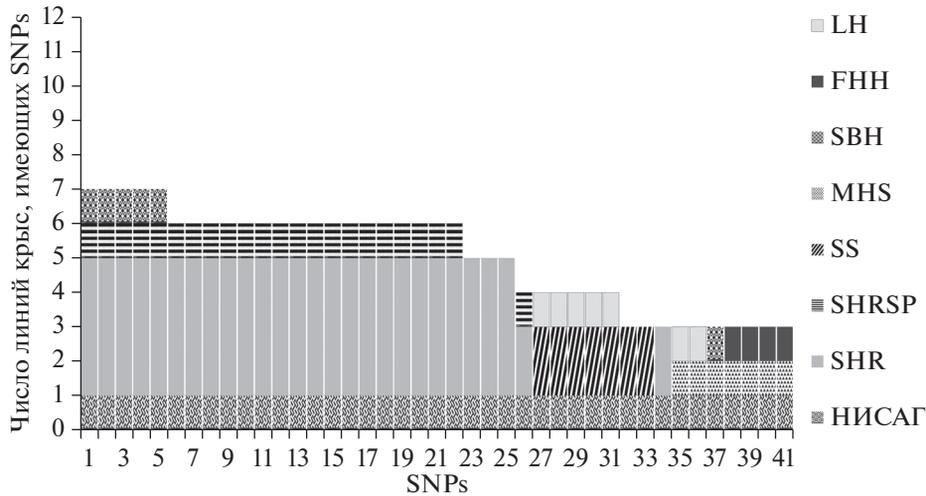


Рис. 1. Встречаемость SNPs, детектированных у нескольких из 12 гипертензивных линий/сублиний крыс. Сравнение проведено только по геномным локусам, соответствующим локусам, секвенированным при транскриптомном анализе крыс НИСАГ. Сублинии показаны одинаковой штриховкой.

только по геномным локусам, соответствующим локусам, секвенированным при транскриптомном анализе крыс НИСАГ/Icgn и WAG/Gsto-Icgn. При анализе геномных данных крыс 11 гипертензивных линий/сублиний использовали следующие критерии: были отобраны только те позиции, генотип которых хотя бы у одной из гипертензивных линий был установлен как Alt1/Alt1 или Alt1/* и не встречался у крыс остальных 31-й линии.

Классификация нуклеотидных замен и их эффекты описывались в программе SnpEff (http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff_manual.html). Определение возможных эффектов замены аминокислоты на функции белка проводили в программе SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) [9]. Гены, ассоциированные с гипертонией, выявляли согласно данным базы Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mcg.edu/>). При проведении анализа главных компонент в качестве меры расстояния использовали результаты анализа идентичности аллелей по состоянию (identity-by-state, IBS), полученные в пакете SNPRelate в программной среде R [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск общих SNPs на уровне транскрибируемых локусов крыс НИСАГ и 11 других гипертензивных линий/сублиний крыс

Был проведен анализ встречаемости 158 SNPs, которые были детектированы только у гипертензивных линий крыс (у крыс НИСАГ, а также у одной или нескольких из 11 других гипертензивных линий/сублиний крыс), но не были найдены в генотипах других линий крыс, используемых как нормотензивный контроль или для проведения

других экспериментов, не связанных с гипертонией. Анализ показал, что 117 SNPs из 158 (т.е. 74%) встречаются у крыс НИСАГ и только у какой-либо одной из других взятых в анализ гипертензивных линий/сублиний. Остальные 41 SNPs, детектируемые у крыс НИСАГ, характерны одновременно для двух или более линий/сублиний других гипертензивных крыс (рис. 1). Однако не было найдено ни одного SNP общего для всех гипертензивных линий, включая линию НИСАГ. Наиболее часто встречающиеся SNPs были найдены не более чем у семи из 12 проанализированных линий/сублиний гипертензивных крыс, при этом следует отметить, что пять из них были представлены сублиниями крыс, полученных из линии SHR. Таким образом, в исследуемой выборке максимальная частота встречаемости общих SNPs у 12 гипертензивных линий/сублиний составила 0.58. Характеристики 41 SNPs, наиболее часто встречающихся у гипертензивных крыс, представлены в табл. 1.

Среди генов, представленных в табл. 1, имеются два гена (*Tjp2*, tight junction protein 2; *Hmgcr*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase), аннотированных в базе данных RGD как ассоциированные с гипертонией. Однако согласно анализу в программе SIFT встречающиеся в последовательностях этих генов мутации не должны существенно изменять структуру и/или функции кодируемых ими белков.

Единственным геном в табл. 1, имеющим несинонимичную замену (с.499C>T, р.Arg167Cys), которая предположительно может оказывать негативный эффект на структуру и/или функции белка (SIFT score = 0.047), является ген *Ccdc28b* (coiled-coil domain containing 28B). Этот полимор-

Таблица 1. Характеристика 41 SNPs, встречающихся у крыс НИСАГ и у 11 других линий/сублиний гипертензивных крыс

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SnprEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Akt1s1</i>	1, 101913691	—	Synonymous variant	c.171C>T	p.Ala57Ala	1.000, tolerated	0.25(3/12)	SS/Jr SS/JrHsdMcowi НИСАГ/1cgn
<i>Rcn3</i>	1, 102142070	—	3 prime UTR variant	c.*174dupC			0.25(3/12)	SS/Jr SS/JrHsdMcowi НИСАГ/1cgn
<i>Grb2</i>	10, 104085931	—	3 prime UTR variant	c.*424delG			0.25(3/12)	SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin НИСАГ/1cgn
<i>Thrb</i>	15, 12953654	—	3 prime UTR variant	c.*2392A>G			0.25(3/12)	LH/MavRirc MHS/Gib НИСАГ/1cgn
<i>Thrb</i>	15, 12953856	—	3 prime UTR variant	c.*2190T>C			0.25(3/12)	LH/MavRirc MHS/Gib НИСАГ/1cgn
<i>Bivra</i>	3, 126087217	—	5 prime UTR variant	c.-25_-24delAC			0.25(3/12)	MHS/Gib SBH/Ygl НИСАГ/1cgn
<i>Dst</i>	9, 37702470	—	Missense variant	c.9010C>A	p.Arg3004Ser		0.25(3/12)	FHH/EurMcowi MHS/Gib НИСАГ/1cgn
<i>Dst</i>	9, 37702497	—	Synonymous variant	c.8983C>A	p.Arg2995Arg		0.25(3/12)	FHH/EurMcowi MHS/Gib НИСАГ/1cgn
<i>Dst</i>	9, 37704092	—	Missense variant	c.7388C>T	p.Thr2463Ile		0.25(3/12)	FHH/EurMcowi MHS/Gib НИСАГ/1cgn
<i>Dst</i>	9, 37704660	—	Missense variant	c.6820G>A	p.Asp2274Asn		0.25(3/12)	FHH/EurMcowi MHS/Gib НИСАГ/1cgn

Таблица 1. Продолжение

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SnPEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Wac</i>	17, 62660946	rs8165343	Downstream gene variant	c.*3186C>T			0.33(4/12)	LH/MavRirc SS/Jr SS/JrHsdMewi НИСАГ/1cgn
<i>Bsdc 1</i>	5, 151409923	rs198680609	3 prime UTR variant	c.*471G>A			0.33(4/12)	SHRSP/Gla SHR/NCrPrin SHR/OlalpevPrin НИСАГ/1cgn
<i>Arhgap20-Fdx1</i>	8, 54948485	—	Intergenic region	n.54948485_54948486insT			0.33(4/12)	LH/MavRirc SS/Jr SS/JrHsdMewi НИСАГ/1cgn
<i>Fdx 1</i>	8, 54961118	—	Intron variant	c.452+1694C>T			0.33(4/12)	LH/MavRirc SS/Jr SS/JrHsdMewi НИСАГ/1cgn
<i>Fdx 1</i>	8, 54965432	—	Intron variant	c.323-2491G>A			0.33(4/12)	LH/MavRirc SS/Jr SS/JrHsdMewi НИСАГ/1cgn
<i>Fdx 1</i>	8, 54968746	—	Intron variant	c.322+2167C>T			0.33(4/12)	LH/MavRirc SS/Jr SS/JrHsdMewi НИСАГ/1cgn
<i>Tjp2#</i>	1, 249250919	rs198341700	Synonymous variant	c.1326G>A	p.Thr442Thr	0.537, tolerated	0.42(5/12)	SHR/Olalpev SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlalpevPrin НИСАГ/1cgn

Таблица 1. Продолжение

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SnрEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Tjp2</i> [#]	1, 249259080	rs198995028	Missense variant	c.767G>A	p.Arg256His	0.391, tolerated	0.42(5/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin HISAG/Icgn
<i>Cyld-ps I-Xkr4</i>	5, 20190727	rs197762208	Intergenic region	n.20190727G>A		0.42(5/12)		SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin HISAG/Icgn
<i>RGDI561149</i>	5, 151142214	rs198649532	Missense variant	c.2327C>T	p.Ser776Leu	0.593, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Rbbp4</i>	5, 151240901	rs197189353	Synonymous variant	c.873G>A	p.Thr291Thr	1.000, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Zbtb80s</i>	5, 151262942	rs106772412	Synonymous variant	c.144C>G	p.Thr48Thr	1.000, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn

Таблица 1. Продолжение

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SnrEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Zbtb80s</i>	5, 151268427	—	Downstream gene variant	c.*413C>T			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Bsdc1</i>	5, 151395575	—	Synonymous variant	c.618A>C	p-Ala206Ala	1.000, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Bsdc1</i>	5, 151409509	—	3 prime UTR variant	c.*57A>C			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Bsdc1</i>	5, 151409595	—	3 prime UTR variant	c.*143C>T			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Bsdc1</i>	5, 151409864	—	3 prime UTR variant	c.*412C>T			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn

Таблица 1. Продолжение

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SnPEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Bsdcl</i>	5, 151409889	—	3 prime UTR variant	c.*437C>T			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla NISCAG/Icgn
<i>Fam167b</i>	5, 151512027	—	Downstream gene variant	c.*124A>G			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla NISCAG/Icgn
<i>Iqcc</i>	5, 151549776	—	Synonymous variant	c.405T>C	p.Ser135Ser	0.491, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla NISCAG/Icgn
<i>Iqcc</i>	5, 151549815	—	Synonymous variant	c.366A>G	p.Pro122Pro	0.278, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla NISCAG/Icgn
<i>Ccdc28b</i>	5, 151553858	—	Missense variant	c.499C>T	p.Arg167Cys	0.047 , deleterious	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla NISCAG/Icgn

Таблица 1. Продолжение

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SnrEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Krtab</i>	5, 151581788	—	3 prime UTR variant	c.*478G>A		NA	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Zfp317</i>	8, 19967180	—	Missense variant	c.296G>T	p.Arg99Leu	0.132, tolerated	0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Zfp26</i>	8, 21506216	—	3 prime UTR variant	c.*610delA			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Zfp26</i>	8, 21506513	—	3 prime UTR variant	c.*314G>A			0.50(6/12)	SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn
<i>Fech</i>	18, 59153047	—	3 prime UTR variant	c.*702G>A			0.58(7/12)	SBH/Ygl SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla HISAG/Icgn

Таблица 1. Окончание

Символ гена	Хромосома, позиция	ID	SprEff, классификация	Замена		SIFT Score, классификация	Частота встречаемости у гипертензивных линий	Линии крыс
				нуклеотида	аминокислоты			
<i>Fech</i>	18, 59153211	—	3 prime UTR variant	c.*538G>A			0.58(7/12)	SBH/Ygl SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla НИСАГ/Icgn
<i>Fech</i>	18, 59153450	—	3 prime UTR variant	c.*299A>G			0.58(7/12)	SBH/Ygl SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla НИСАГ/Icgn
<i>Col4a3bp</i>	2, 46477897	—	5 prime UTR variant	c.-327delC			0.58(7/12)	SBH/Ygl SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla НИСАГ/Icgn
<i>Hmgcr</i> #	2, 46599439	—	Synonymous variant	c.1641A>G	p.Gly547Gly	1.000, tolerated	0.58(7/12)	SBH/Ygl SHR/OlaIpcv SHR/NCrPrin SHR/NHsd SHR/OlaIpcvPrin SHRSP/Gla НИСАГ/Icgn

Примечание. ID — идентификационный номер, прочерк обозначает отсутствие ID.
Гены, ассоциированные с гипертонией, согласно базе данных RGD.

Таблица 2. Встречаемость SNPs в геномах анализируемых линий/сублиний гипертензивных крыс

Число линий/сублиний, имеющих SNPs	Число общих SNPs	Встречаемость SNPs в линиях/сублиниях гипертензивных крыс										
		FHH/EurMcowi	LH/MavRrrc	MHS/Gib	SBH/Ygl	SHR/OlaIpcv	SHRSP/Gla	SHR/NCrIPrin	SHR/NHsd	SHR/OlaIpcvPrin	SS/Jr	SS/JrHsdMcowi
2	9653	801	1077	2575	1907	424	1622	129	113	494	4939	5225
3	6795	39	6054	197	255	146	271	215	244	278	6328	6358
4	9402	10	163	107	53	9153	185	9226	9160	9226	161	164
5	50612	110	3	7	17	50602	50490	50611	50605	50607	3	5
6	2464	88	159	142	2038	2463	2463	2462	2462	2463	19	25
7	264	142	6	5	231	261	264	263	264	263	31	118
8	175	0	165	10	1	174	175	175	175	175	175	175

физм встречается как у крыс НИСАГ, так и у четырех сублиний крыс со спонтанной гипертензией (SHR/OlaIpcv, SHR/NCrIPrin, SHR/NHsd, SHR/OlaIpcvPrin), а также у крыс SHRSP/Gla, характеризующихся спонтанной гипертензией и склонностью к инсультам.

Поиск общих SNPs при полногеномном анализе 11 гипертензивных линий/сублиний крыс

Поскольку при сравнении нуклеотидных вариантов, находящихся в геномных локусах, соответствующих локусам, секвенированным при транскриптомном анализе крыс НИСАГ, не было найдено ни одного SNP общего для всех 12 гипертензивных линий/сублиний, возник вопрос о том, существуют ли в полном геноме общие SNPs, свойственные всем без исключения гипертензивным, но не нормотензивным, линиям. Для определения общих SNPs на геномном уровне был проведен сравнительный анализ имеющихся в базе RGSC геномных последовательностей 11 гипертензивных линий/сублиний крыс (FHH/EurMcowi, LH/MavRrrc, MHS/Gib, SBH/Ygl, SHR/OlaIpcv, SHRSP/Gla, SHR/NCrIPrin, SHR/NHsd, SHR/OlaIpcvPrin, SS/Jr, SS/JrHsdMcowi), моделирующих различные формы гипертензии. Для проведения этого анализа были отобраны только те нуклеотидные варианты, которые встречались в геномах гипертензивных линий/сублиний (в гомозиготном или в гетерозиготном состоянии), но не встречались у крыс других 31-й линии с нормальным уровнем АД.

Оценка генетического сходства и различий геномов гипертензивных крыс была проведена с использованием многомерного шкалирования

(рис. 2). Анализ показал существенные различия между линиями и сходство между сублиниями.

Всего было проанализировано 253950 SNPs, из них 174585 нуклеотидных вариантов (68.7%) встречались только у одной из проанализированных гипертензивных линий/сублиний, а 79365 SNPs встречались хотя бы у двух гипертензивных линий/сублиний. Из данных, представленных в табл. 2, видно, что общие SNPs были найдены не более чем у восьми из 11 проанализированных линий/сублиний гипертензивных крыс, т.е. максимальная частота встречаемости SNPs составила 0.73 и обусловлена, в первую очередь, генетическим родством различных сублиний линии SHR. Таким образом, при анализе геномов 11 гипертензивных линий/сублиний крыс, моделирующих разные формы гипертензии, не было найдено ни одного SNP, общего для всех 11 взятых в анализ гипертензивных линий/сублиний крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ

Линия крыс НИСАГ является уникальной линией, моделирующей стресс-чувствительную форму АГ, что делает ее ценным дополнением к имеющемуся набору экспериментальных моделей АГ [4, 11, 12]. Ранее нами было показано, что по сумме SNPs, детектированных в транскрибируемых локусах, генотип крыс НИСАГ значительно отличается от генотипов других гипертензивных линий крыс. Тем не менее была найдена группа из 158 SNPs, которые были детектированы только у гипертензивных линий/сублиний крыс, но не встречались у других известных линий крыс, используемых в экспериментах, не связанных с повышенным АД [5]. В настоящей работе мы показали, что среди этих 158 SNPs нет ни од-

ного общего для всех 12 гипертензивных линий/сублиний крыс, взятых в анализ. Были определены нуклеотидные варианты, наиболее часто встречающиеся в транскриптомах крыс НИСАГ и других 11 линий/сублиний гипертензивных крыс, которые в настоящее время исследуются с целью установления генетических основ гипертонической болезни человека.

Среди SNPs, наиболее часто встречающихся у гипертензивных крыс (табл. 1), следует отметить наличие несинонимичной замены в последовательности гена *Ccdc28b* (coiled-coil domain containing 28B), которая предположительно может оказывать негативный эффект на структуру и/или функции кодируемого этим геном белка. До настоящего времени ген *Ccdc28b* не был ассоциирован с гипертонией. Однако эта мутация оказалась одной из наиболее часто встречающихся среди тех, которые были обнаружены только у гипертензивных крыс и не встречаются в генотипах линий крыс с нормальным уровнем АД. Кроме крыс НИСАГ данная замена была также найдена у всех сублиний, полученных из линии SHR, включая крыс SHRSP.

О функциях белка, кодируемого геном *Ccdc28b*, известно мало. Предполагается, что белок CCDC28B участвует в структурном формировании цилий и может оказывать модифицирующий эффект у пациентов с синдромом Барде–Бидля [13]. Цилии (реснички или жгутики) представляют собой эволюционно консервативные органеллы, расположенные на апикальной поверхности эукариотических клеток. В организме человека цилии присутствуют практически на всех типах клеток и обеспечивают как движение одиночных клеток и течение различных тканевых жидкостей, так и сенсорные функции.

Синдром Барде–Бидля является заболеванием, к диагностическим признакам которого относятся такие как ожирение, сердечно-сосудистая патология (гипертрофия межжелудочковой перегородки и дилатационная кардиомиопатия), дегенерация сетчатки глаза [14], а также гипертония и заболевания почек [15]. Безусловно, следует учитывать то, что синдром Барде–Бидля является генетически гетерогенным заболеванием [16], тем не менее снижение экспрессии *Ccdc28b* у рыбок данио рерио (zebrafish) приводит к дефектному цилиогенезу и к появлению многочисленных фенотипических дефектов, среди которых отмечают и нарушение функции почек [13]. Наличие функциональной связи между уровнем экспрессии гена *Ccdc28b* и нарушением функции почек, т.е. признаком, часто сопровождающим развитие АГ, позволяет сделать предположение о том, что найденный SNP в последовательности гена *Ccdc28b*, присутствующий в генотипах нескольких линий гипертензивных крыс (НИСАГ, SHR и SHRSP),

но не встречающийся у крыс с нормальным уровнем АД, может быть потенциально интересным для изучения его влияния на развитие АГ как у модельных животных, так и у человека.

Сравнительный анализ полных геномных последовательностей 11 гипертензивных линий/сублиний крыс, моделирующих разные формы гипертонии, показал, что общие SNPs были найдены не более чем у восьми из 11 проанализированных линий/сублиний гипертензивных крыс. Этот результат позволяет говорить о том, что АГ является генетически гетерогенным заболеванием. Такой вывод, полученный при анализе транскриптомных и геномных данных нескольких линий/сублиний крыс, созданных в результате селекции для изучения молекулярно-генетических механизмов развития разных форм гипертонии, вероятно, может быть верным и для человека.

Известно, что несмотря на существование множества вариантов лечения АГ многие пациенты имеют неподдающийся медикаментозному контролю повышенный уровень АД при использовании схем из трех и более антигипертензивных препаратов разных классов [1, 17]. Распространенность такой резистентной к лечению АГ составляет 13.7% [18]. Таким образом, можно предполагать, что и в человеческой популяции АГ является генетически гетерогенным заболеванием, не имеющим единой этиологической базы. Безусловно, следует согласиться с мнением о том, что потребность в контроле АД у пациентов с резистентной к лечению гипертонией может быть решена путем разработки новых лекарств, которые предназначены для лечения гипертонии и сопутствующих заболеваний, таких как сердечная недостаточность, хронические заболевания почек и сахарный диабет [17]. Однако на основании полученных нами результатов, представленных в настоящей работе, следует согласиться и с ранее высказанным предположением о том, что АГ является генетически гетерогенным расстройством, лечение которого можно улучшить, если подбирать лекарства на основе генодиагностики конкретного пациента [19] или хотя бы с учетом генетической изменчивости в определенной популяции, т.е. для определенной группы населения, что является более реальной задачей [20].

Работа поддержана бюджетными проектами 0324-2019-0041 и 0324-2019-0042. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015). Вычислительный анализ данных проводили с использованием ресурсов ССКЦ ИВМиМГ СО РАН.

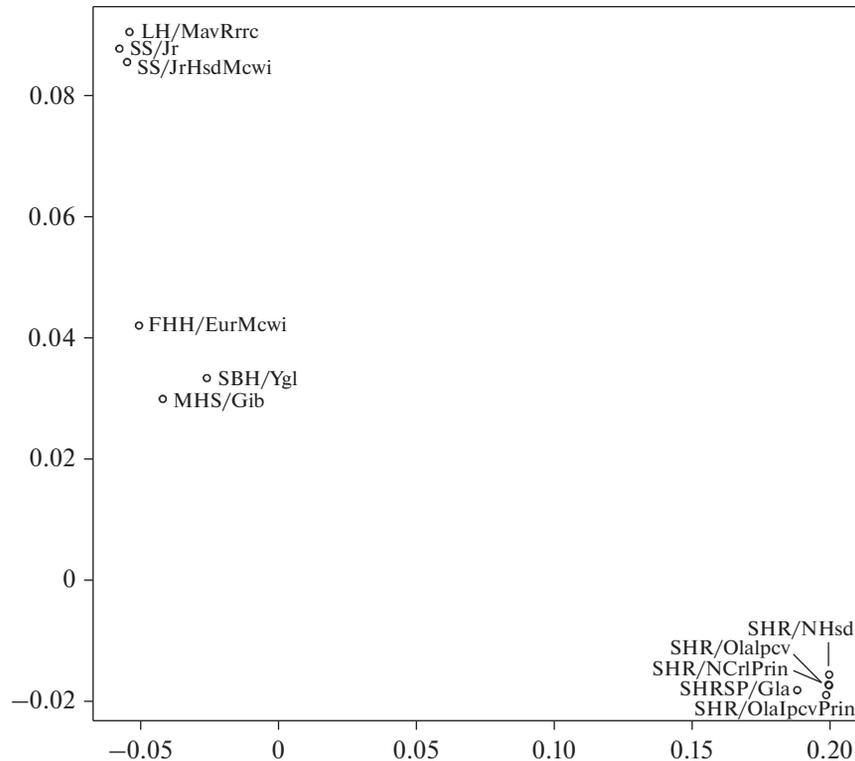


Рис. 2. Анализ генетического сходства геномов 11 гипертензивных линий/сублиний крыс по выявленным SNPs. Оценка расстояний проведена методом многомерного шкалирования с использованием в анализе идентичности аллелей по состоянию.

Все принятые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ellinor P.T., Lunetta K.L., Glazer N.L. et al.* Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 3. P. 240–244. <https://doi.org/10.1038/ng.537>
2. *Low S.K., Takahashi A., Mushiroda T., Kubo M.* Genome-wide association study: a useful tool to identify common genetic variants associated with drug toxicity and efficacy in cancer pharmacogenomics // *Clin. Cancer Res.* 2014. V. 20. № 10. P. 2541–2552. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2755>
3. *Kingsmore S.F., Lindquist I.E., Mudge J. et al.* Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008. V. 7. № 3. P. 221–230. <https://doi.org/10.1038/nrd2519>
4. *Rapp J.P.* Genetic analysis of inherited hypertension in the rat // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. № 1. P. 135–172. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.135>
5. *Ershov N.I., Markel A.L., Redina O.E.* Strain-specific single-nucleotide polymorphisms in hypertensive ISIAH rats // *Biochemistry (Mosc.)*. 2017. V. 82. № 2. P. 224–235. <https://doi.org/10.1134/S0006297917020146>
6. *Kim D., Pertea G., Trapnell C. et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions // *Genome Biol.* 2013. V. 14. № 4. P. R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
7. *McKenna A., Hanna M., Banks E. et al.* The genome analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 9. P. 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
8. *Hermesen R., de Ligt J., Spee W. et al.* Genomic landscape of rat strain and substrain variation // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. № 357. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1594-1>
9. *Kumar P., Henikoff S., Ng P.C.* Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 7. P. 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
10. *Zheng X., Levine D., Shen J. et al.* A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 24. P. 3326–3328. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts606>
11. *Sarikonda K.V., Watson R.E., Opara O.C., Dipette D.J.* Experimental animal models of hypertension // *J. Am.*

- Soc. Hypertens. 2009. V. 3. № 3. P. 158–165.
<https://doi.org/10.1016/j.jash.2009.02.003>
12. *Bader M.* Rat models of cardiovascular diseases // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 597. P. 403–414.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-389-3_27
 13. *Cardenas-Rodriguez M., Osborn D.P., Irigoien F. et al.* Characterization of CCDC28B reveals its role in ciliogenesis and provides insight to understand its modifier effect on Bardet–Biedl syndrome // *Hum. Genet.* 2013. V. 132. № 1. P. 91–105.
<https://doi.org/10.1007/s00439-012-1228-5>
 14. *Elbedour K., Zucker N., Zalstein E. et al.* Cardiac abnormalities in the Bardet–Biedl syndrome: echocardiographic studies of 22 patients // *Am. J. Med. Genet.* 1994. V. 52. № 2. P. 164–169.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320520208>
 15. *Croft J.B., Swift M.* Obesity, hypertension, and renal disease in relatives of Bardet–Biedl syndrome sibs // *Am. J. Med. Genet.* 1990. V. 36. № 1. P. 37–42.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.1320360109>
 16. *Rahmouni K., Fath M.A., Seo S. et al.* Leptin resistance contributes to obesity and hypertension in mouse models of Bardet–Biedl syndrome // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. № 4. P. 1458–1467.
<https://doi.org/10.1172/JCI32357>
 17. *Oparil S., Schmieder R.E.* New approaches in the treatment of hypertension // *Circ. Res.* 2015. V. 116. № 6. P. 1074–1095.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303603>
 18. *Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E. et al.* Heart disease and stroke statistics–2017 Update: a report from the American heart association // *Circulation.* 2017. V. 135. № 10. P. e146–e603.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000485>
 19. *Mann S.J.* Neurogenic essential hypertension revisited: the case for increased clinical and research attention // *Am. J. Hypertens.* 2003. V. 16. № 10. P. 881–888.
 20. *Jazwinska E.C.* Exploiting human genetic variation in drug discovery and development // *Drug Discov. Today.* 2001. V. 6. № 4. P. 198–205.
[https://doi.org/S1359-6446\(00\)01642-1](https://doi.org/S1359-6446(00)01642-1)

Genetic Polymorphism of Experimentally Produced Forms of Arterial Hypertension

O. E. Redina^{a, b, *}, V. A. Devyatkin^{a, b}, N. I. Ershov^a, and A. L. Markel^{a, b}

^a*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch,
 Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Department of Molecular Biology and Biotechnology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: oredina@ngs.ru

The paper analyzes the distribution of polymorphic loci in rats of different hypertensive strains. When analyzing the transcribed loci of ISIAH rats and the corresponding loci of 11 other hypertensive strains/substrains of rats, the maximum frequency of occurrence of identical SNPs in different strains was 0.58 (i.e., in 7 of 12 hypertensive strains/substrains). The analysis of the genomic sequences of 11 hypertensive strains/substrains of rats, which model different forms of arterial hypertension, also did not reveal a single SNP common to all 11 hypertensive strains/substrains of rats taken in the analysis. Analysis of experimental data suggests that hypertension is a genetically heterogeneous disease.

Keywords: arterial hypertension, polymorphism, strains of hypertensive rats, genetic heterogeneity.