

Цикл бодрствование—сон и экспериментальные модели мутаций по гену *Panx1*

В.М. КОВАЛЬЗОН^{1, 2*}, А.А. ЛАТЫШКОВА^{2, 3}, А.Д. КОМАРОВА^{2, 3}, Ю.В. ПАНЧИН^{2, 3}

¹ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» РАН, Москва, Россия; ²ФГБУН «Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича» РАН, Москва, Россия; ³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Цель исследования. Проверка ранее высказанного авторами предположения, что мутация гена *Panx1* (паннексин-1) может играть важную роль в развитии нарушений цикла бодрствование—сон. **Материал и методы.** Исследование проведено на мышах, нокаутных по гену *Panx1*. В экспериментах использовали непрерывную круглосуточную регистрацию ЭЭГ и двигательной активности. **Результаты и заключение.** Установлено статистически значимое повышение представленности бодрствования за счет снижения фазы медленного сна (по сравнению с контролем), особенно выраженное в темный период суток, а также повышение двигательной активности. Результаты сопоставляются с данными, полученными в ходе обследования недавно описанной в литературе больной с гомозиготной мутацией по этому гену. Обсуждается возможная физиологическая роль белка паннексина-1 в норме и при патологии.

Ключевые слова: бодрствование—сон, генетические заболевания, экспериментальные модели.

Sleep-wake cycle and experimental models of *Panx1* mutations

V.M. KOVALZON, A.A. LATYSHKOVA, A.D. KOMAROVA, YU.V. PANCHIN

Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Kharkhevich Institute of Information Transmission of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; Belozerskiy Institute of Physical-Chemical Biology of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Objective. To test the hypothesis of a possible role of the *Panx1* (pannexin-1) mutation in changing the sleep — wake cycle. **Material and methods.** Continuous 24 h recording of the EEG and movement activity in *Panx1* knockout and wild type mice was performed. **Results and conclusion.** A significant increase in wake percentage at the expense of a decrease in slow-wave sleep was found in knockout mice as compared to the control ones. The difference was especially pronounced during the 12-h dark period in the chamber. Also, an increase in the movement activity was clearly seen in knockout mice. The results are compared to a recent case-report of a homozygote's mutation in this gene. The role of *Panx1* protein in normal as well as pathological physiology is discussed.

Keywords: sleep-wake, genetic disease, experimental models.

Введение

Недавно группой канадских и американских исследователей [1] была впервые описана 17-летняя пациентка туарецкого происхождения с гомозиготной точечной мутацией гена паннексин-1 (*Panx1*) — заменой гуанина на аденин в положении 650, что приводит к замене Arg на His в положении 217 в экспрессируемом белке. В результате этот белок теряет способность к нормальному фолдингу и, соответственно, свою функцию. У больной была выявлена мультисистемная дисфункция, включающая умственную отсталость, глухоту, кифосколиоз (горбатость) и недоразвитие яичников. Предполагается, что первопричиной этой глобальной патологии является нарушение функционирования паннексина-1 — белка, обнаруженного группой российских исследователей в 2000 г. [2]. Столь тяжелые по-

следствия единичной точечной мутации (однонуклеотидного полиморфизма) — редкое явление в медицинской генетике; они указывают на исключительно важную роль гена *Panx1* в развитии организма.

В геномах млекопитающих имеется 3 гена семейства паннексинов. Паннексины могут быть вовлечены в регуляцию многих важных биологических функций, а также в реализацию ряда патологических механизмов. Паннексины могут играть ключевую роль в межклеточной коммуникации, так как способны формировать щелевые контакты между клетками; функционируют в наружной мембране клетки в виде полуканалов, которые обладают высокой проницаемостью для пуринов (АТФ) и ряда других сигнальных молекул. Эти свойства определяют ключевое значение паннексинов в пара- и аутокринной системах [3, 4]. Несмотря на то что опыты, направленные на поиск фено-

типических эффектов, связанных с функцией паннексинов, обнаруживают достоверные изменения в работе отдельных систем и органов, животные, нокаутные по гену *Panx1*, фертильны и внешне сходны с контрольными. Почему фенотип отсутствия паннексина-1 у человека выражен сильнее, чем у животных, остается неясным.

Паннексины присутствуют в различных органах и тканях млекопитающих, причем экспрессия паннексина-1 в головном мозге — одна из самых высоких. Нервные и глиальные клетки экспрессируют этот белок уже на ранних стадиях эмбрионального развития, так что формирование дефектных клеточных каналов может влиять на нейрональное развитие и дифференцировку. Нарушение функционирования образуемых паннексинаом-1 мембранных каналов может приводить к снижению поступления АТФ в межклеточную среду головного мозга. Внеклеточный АТФ, в свою очередь, является источником аденозина — важнейшего регулятора цикла бодрствование—сон [5]. В связи с этим заметим, что в упомянутой работе [1] о нарушении у больной этого цикла не сообщалось.

Цель настоящего исследования — проверка высказанного авторами ранее [6] предположения, что мутация *Panx1* может играть важную роль в нарушении регуляции цикла бодрствование—сон.

Материал и методы

Для проверки гипотезы на первом этапе исследования в качестве объекта исследования были выбраны взрослые (2–3-месячные, весом 25–30 г) мыши-самцы линии C57BL/6J (контроль) и выведенные от этой линии нуль-нокаутные взрослые самцы *Panx1* [7].

Под авертиновым наркозом животным были вживлены 4 эпидуральных нихромовых электрода в лобные и те-

менные отделы коры мозга и референсный электрод в носовую кость. После операции животных помещали в индивидуальные звукоизолированные боксы при постоянном световом режиме 12/12: 09:00—21:00 ч — яркий (150 лк) белый свет, 21:00—09:00 ч — слабый (15 лк) — красный и температуре 22—24 °С. Вода и пища были доступны животным постоянно. По истечении недельного периода восстановления начинали непрерывную круглосуточную регистрацию полисомнограммы (ПСГ), включающей 2 канала ЭЭГ и запись механограммы (двигательной активности), а также видеорегистрацию поведения животных. Каждое животное было подсоединено посредством гибкого кабеля к входу миниатюрного автономного цифрового телеметрического усилителя биопотенциалов размером 30×25×4 мм и весом 5 г (конструкция А.А. Трошенко), снабженного 3-мерным акселерометром. Плата усилителя соединена эластичной связью с источником питания, и вместе с ним подвешена к штанге над камерой посредством вращающегося карабина. Такая конструкция дает возможность регистрировать ПСГ, не ограничивая свободу перемещений животного, и позволяет плате усилителя биопотенциалов со встроенным акселерометром свободно колебаться в трех плоскостях и реагировать даже на небольшие движения мыши. ЭЭГ регистрировали с частотой дискретизации 250 Гц, а двигательную активность — 50 Гц. Сигналы усилителя передавались на регистрирующий компьютер по каналу blue tooth. Визуальный полуавтоматический анализ полученных ПСГ по 20-секундным эпохам проводили с помощью специальной программы, созданной на базе EDF браузера с открытым кодом [8]. По общепринятым критериям для грызунов выделяли состояния бодрствования, медленного и быстрого сна, что было описано нами ранее [9].

Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни (*U*-тест).

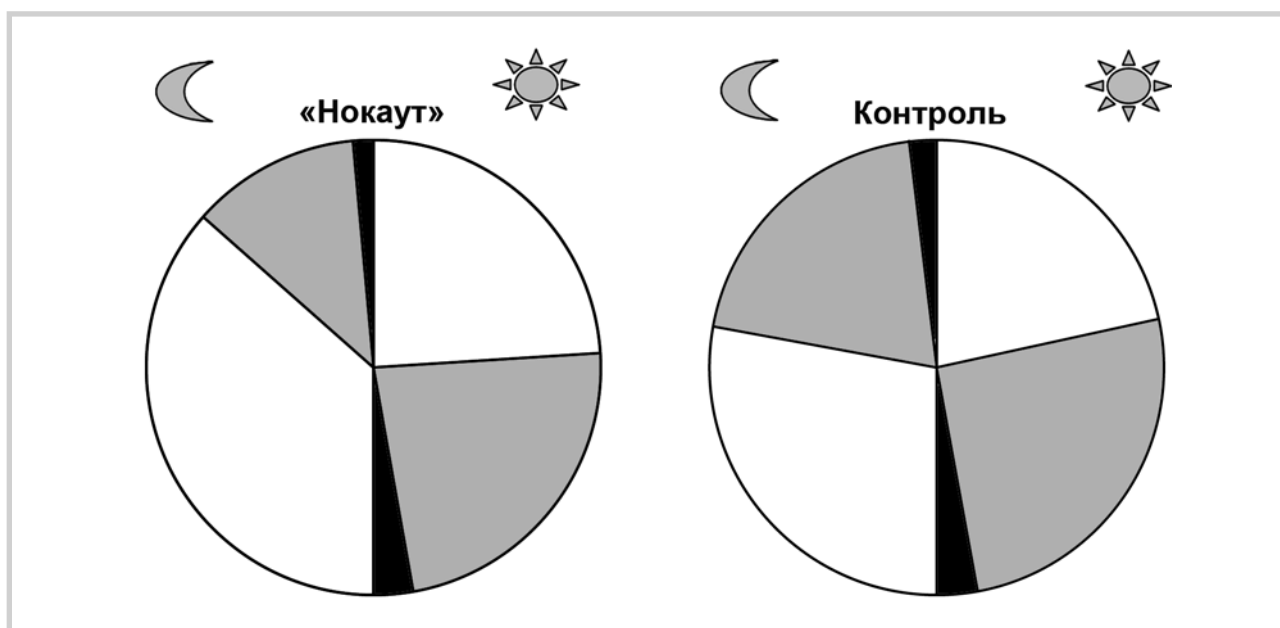


Рис. 1. Бодрствование (белые сектора), медленный сон (заштрихованные сектора) и быстрый сон (черные сектора) у нокаутных по гену *Panx1* (левая диаграмма; $n=13$) и контрольных (правая диаграмма; $n=10$) мышей в 12-часовой темный (левая половина каждой диаграммы, отмечено знаком месяца) и 12-часовой светлый (правая половина каждой диаграммы, отмечено знаком солнца) период суток (по [8], с изменениями).

Результаты

Как видно из рис. 1, у «нокаутных» мышей был отмечен более высокий процент представленности бодрствования в светлый (+12%; $p < 0,05$) и особенно в темный (+32%; $p < 0,01$) период суток в камере по сравнению с контролем. Соответственно, происходило снижение представленности медленного сна как в светлый (–10%; $0,05 < p < 0,06$), так и в темный (–40%; $p < 0,01$) 12-часовой период у «нокаутных» мышей по сравнению с контрольными особями. Следует отметить, что у «нокаутных» мышей суммарная продолжительность бодрствования превышала суммарную продолжительность сна не только в темный, но и в светлый период суток, что нетипично для ночных грызунов [10]. Быстрый сон снижался по представленности на 30% в темный период суток и повышался на 10% в светлый период у «нокаутных» мышей по сравнению с контрольными. Спектральный состав ЭЭГ статистически значимо не различался между «нокаутными» и контрольными мышами.

Двигательная активность у «нокаутных» мышей была значительно выше, чем у контрольных, и в темный, и в светлый период суток в камере, как по своей продолжительности, так и по интенсивности (рис. 2).

Была проведена также 6-часовая депривация сна в светлый период суток с помощью «мягкого» поведенческого метода пробуждений [10] (покачивание клеток, постукивание по стенкам, поддувание животных струей воздуха из резиновой груши и т.п.) на фоне регистрации ПСГ. Однако сравнение продолжительности и структуры сна в его «отдаче» не выявило статистически значимых различий между «нокаутными» и контрольными животными.

Обсуждение

Таким образом, в настоящем исследовании были выявлены значительные структурные различия цикла бодрствования—сон между мышами, лишенными гена *Panx1* и контрольными особями, а именно: повышение у первых представленности (суммарной продолжительности) бодрствования и уровня двигательной активности и, соответ-

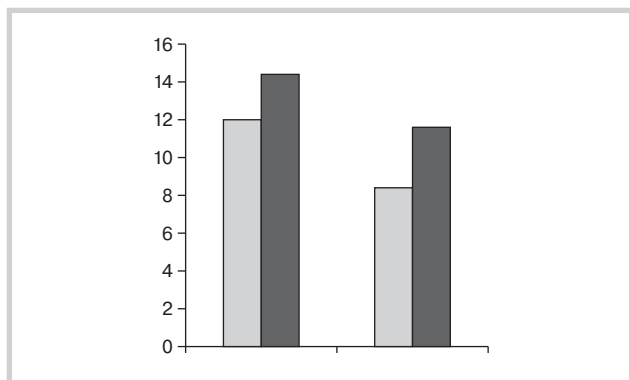


Рис. 2. Двигательная активность (по оси ординат в процентах относительно максимально возможного отклонения акселерометра) нокаутных по гену *Panx1* (левая пара столбиков; $n=13$) и контрольных (правая пара столбиков; $n=13$) мышей в светлый (светлые столбики) и темный (темные столбики) периоды суток.

Различие между левой и правой парой столбиков достоверно, $p < 0,01$; U-тест (по [8], с изменениями).

ственно, сокращение медленного сна (особенно выраженное в темный период суток). Эти различия связаны в первую очередь с удлинением суммарного (за 12 ч) времени бодрствования с соответствующим сокращением сна. То, что этот эффект наиболее выражен в темное время суток, когда животные наиболее активны, а также наличие «отдачи» быстрого сна в светлое время, свидетельствует в пользу предположения, что выявленные эффекты в первую очередь связаны с повышением уровня бодрствования, а изменение структуры сна носит, скорее всего, ответный характер. Мыши без гена *Panx1* лишены одного из основных путей выхода АТФ в межклеточное пространство и, соответственно, у них снижена концентрация ее метаболита — аденозина, который общепризнан как один из важнейших модуляторов цикла бодрствование—сон [5]. Логично связать выявленные различия в структуре этого цикла у «нокаутных» и контрольных животных с гипотетическим снижением уровня внеклеточного аденозина в ключевых структурах головного мозга.

Другой способ понизить уровень внеклеточного аденозина — это заблокировать его белок-переносчик ENT1 (type 1 equilibrative nucleoside transporter). Следует отметить, что у мышей, нокаутных по гену *ENT1*, также отмечалось снижение представленности медленного сна по сравнению с контрольными животными, хотя оно было более выражено в светлый, а не в темный период, как в наших опытах [11]. Кроме того, «отдача» в ответ на депривацию сна у мышей, нокаутных по гену *ENT1*, не отличалась от контроля, как и в наших опытах [11]. Можно предположить, что оба способа выброса АТФ в межклеточное пространство могут компенсировать друг друга как в условиях нормы, так и патологии. Гипотеза о накоплении аденозина в «ключевых» точках межклеточного пространства головного мозга (базальная область переднего мозга и др.) в ходе продолжительного бодрствования является сейчас общепринятой, поэтому наши результаты по депривации сна, как и результаты [11], на первый взгляд, расходятся с этим предположением. Помимо возможности «компенсационного» накопления аденозина альтернативным путем нельзя исключить и того, что аденозин в этом процессе не задействован [12].

Однако обращает внимание, что наши эксперименты на мышах с гомозиготным нокаутом по гену *Panx1*, как и другие исследования на подобных моделях, не выявили столь драматичных изменений, какие отмечены у пациентки в указанной статье [1]. Мы обнаружили у этих мышей лишь повышение двигательной активности и представленности бодрствования с соответствующим снижением доли медленного сна. Эти изменения были особенно выражены в темный (активный) период суток. Возможные различия между нашей моделью и патологией у человека могут быть связаны с компенсаторным усилением экспрессии двух других паннексинов (*Panx2* и *Panx3*) у модельных объектов в ходе онтогенеза. Кроме того, экспрессия белка *Panx1* с нарушенной структурой, не способного к полноценному выполнению своих функций у больной, может быть по своим эффектам не тождественна полному его отсутствию у модельных животных. Тем не менее как клинические, так и экспериментальные данные свидетельствуют о важнейшей роли паннексина-1 в регуляции целого ряда функций организма, включая процессы бодрствования—сна. В дальнейшем мы планируем изучение описанной в статье [1] мультисистемной патологии на более адекватной модели

не с удалением, а с заменой нормального гена *Panx1* на дефектный.

Поскольку выяснилось, что мутации гена *Panx1* могут серьезно влиять на состояние человека, мы изучили набор таких мутаций, потенциально способных сказаться на работе данного белка. Всего в гене *Panx1* их найдено 3311, при этом 306 (303 положения) — в кодирующей части гена [13]. Большая часть этих мутаций синонимична, т.е. не приводит к замене кодируемой аминокислоты (88 штук), но есть и исключения: 6 нонсенс-мутаций (т.е. таких, в результате которых кодон теряет способность кодировать какую-либо аминокислоту, и становится стоп-кодоном, что приводит к преждевременному прерыванию синтеза данного белка) в положениях аминокислот 104, 127, 239, 300, 413, 418, а также 217 миссенс-мутаций (переключающих кодон на синтез другой аминокислоты). Найдены также 4 инделя (инсерций или делеций нескольких нуклеотидов) в районе положения аминокислот 197, 294, 298, 405, ведущие к мутации «сдвига рамки считывания» генома.

Часть вариаций (45 штук) обнаружены в проекте «1000 геномов» и их частота может быть оценена. Из них 12 синонимичны и особого интереса не представляют. Самая частая вариация встречается в положении 5, где у каждого 7 человек из 10 находится аминокислота глутамин, а у 3 — гистидин. Скорее всего, эта вариация не сказывается существенно на работе белка, поскольку гистидин в этом положении у других млекопитающих встречается чаще, чем глутамин. Особый интерес, на наш взгляд, может представлять мутация в первом кодоне, превращающая стартовый метионин в триптофан. Теоретически при такой замене синтез белка может либо вообще не состояться, либо начаться со следующего старт-кодона (ATG). Ближайший

ATG-кодон лежит на 108 нуклеотидов вправо, и синтез с этой позиции приведет к образованию укороченного белка, полностью лишённого внутриклеточного концевой N-фрагмента. (Структура белка паннексин-1 такова, что он содержит внутриклеточные концевые N- и C-фрагменты, 4 трансмембранных домена, 2 внеклеточные и 1 внутриклеточную петли). Такое изменение может радикально повлиять на функцию паннексина-1. Данная вариация встречается в проекте «1000 геномов» с частотой 0,0004. Ясно, что гомозигота по этой мутации будет встречаться очень редко, но несколько десятков таких случаев могут существовать в Российской Федерации, если мутация не ведет к смерти в гомозиготном состоянии.

Вывод

В итоге можно сделать следующее заключение: 1) мутаций, влияющих на функции гена *Panx1*, мало, что может свидетельствовать о важности этого белка для нормального развития и функционирования организма человека; 2) наряду с описанной мутацией в положении 217 в популяции людей существуют и другие потенциально вредные мутации паннексина-1. Это означает, что число гомозигот, связанных с нарушением работы паннексина, может составлять десятки и даже сотни больных. Такие не выявленные пациенты могут находиться в настоящее время в различных психоневрологических стационарах, разбросанных по территории России.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект №17-15-01433).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shao Q, Lindstrom K, Shi R, Kelly J, Schroeder A, Juusola, Levine KL, Eseltine JL, Penuela S, Jackson MF, Laird DW. A Germline Variant in the PANX1 Gene Has Reduced Channel Function and Is Associated With Multisystem Dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(24):12432-12443. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.717934>
2. Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. A Ubiquitous Family of Putative Gap Junction Molecules. *Current Biology*. 2000;10(13):473-474. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00576-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00576-5)
3. Eseltine JL, Laird DW. Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends in Cell Biology*. 2016;26(12):944-955. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.06.003>
4. Shestopalov VI, Panchin YV. Pannexins and Gap Junction Protein Diversity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008;65(3):376-394. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7200-1>
5. Holst SC, Landolt HP. Sleep Homeostasis, Metabolism, and Adenosine. *Current Sleep Medicine Reports*. 2015;1(1):27-37. <https://doi.org/10.1007%2Fs40675-014-0007-3>
6. Shestopalov VI, Panchin Y, Tarasova OS, Gaynullina D, Kovalzon VM. Pannexins Are Potential New Players in the Regulation of Cerebral Homeostasis during Sleep-Wake Cycle. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11:210. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00210>
7. Dvorianchikova G, Ivanov D, Barakat D, Grinberg A, Wen R, Slepak VZ, Shestopalov VI. Genetic Ablation of Pannexin1 Protects Retinal Neurons from Ischemic Injury. *PLoS One*. 2012;7:e31991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031991>
8. Манолов А.И., Ковальзон В.М., Украинцева Ю.В., Моисеенко Л.С., Дорохов В.Б. Зависимость точности автоматического выделения состояния сна и бодрствования у мышей от спектральных характеристик электроэнцефалограммы. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2015;65(5):635-640. [Manolov AI, Kovalzon VM, Ukraintseva YV, Moiseenko LS, Dorokhov VB. Dependence of Accuracy of Automatic Sleep Scoring on Spectral Characteristics of Mice EEG. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2015;65(5):635-640. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/s0044467715040097>
9. Kovalzon VM, Moiseenko LS, Ambaryan AV, Kurtenbach S, Shestopalov VI, Panchin YV. Sleep-Wakefulness Cycle and Behavior in Pannexin1 Knockout Mice. *Behavioral Brain Research*. 2017;318:24-27. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.015>
10. Huber R, Deboer T, Tobler I. Effects of Sleep Deprivation on Sleep and Sleep EEG in Three Mouse Strains: Empirical Data and Simulations. *Brain Research*. 2000;857:8-19. <http://www.researchgate.net/publication/12614253>
11. Kim T, Ramesh V, Dworak M, Choi DS, McCarley RW, Kalinchuk AV, Bashier R. Disrupted Sleep-Wake Regulation In Type 1 Equilibrative Nucleoside Transporter Knockout Mice. *Neuroscience*. 2015;303:211-219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.037>
12. Blanco-Centurion C, Xu M, Murillo-Rodriguez E, Gerashchenko D, Shiromani AM, Salin-Pascual RJ, Hof PR, Shiromani PJ. Adenosine and Sleep Homeostasis in the Basal Forebrain. *Journal of Neuroscience*. 2006;26:8092-8100. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2181-06.2006>
13. NCBI, dbSNP. *Short Genetic Variations*. Accessed February, 21, 2017. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=24145