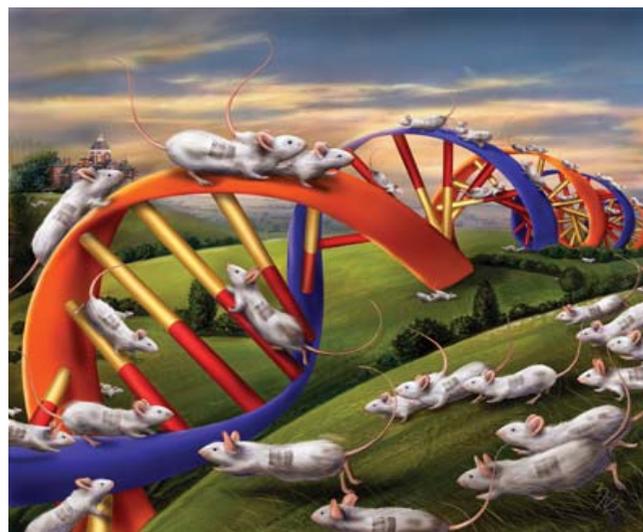




18 апреля 16.00
Конференц-зал ИЦИГ

Публичная лекция Базовкиной Дарьи

Молекулярная генетика поведения грызунов



Структура лекции

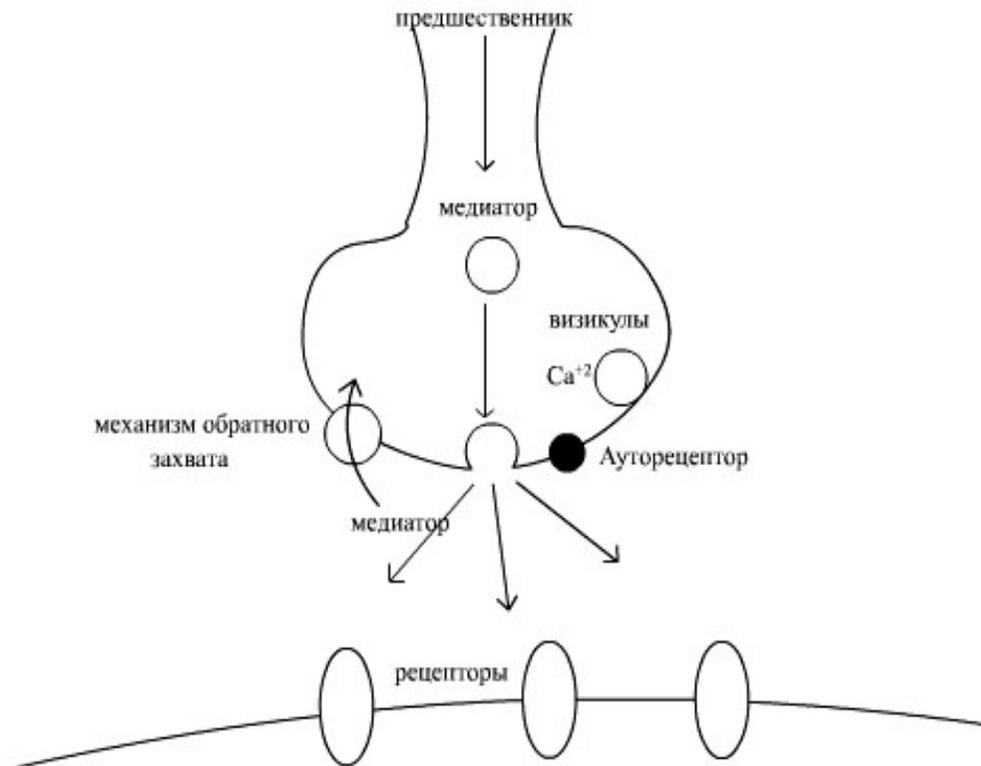
- Генетические подходы, применяемые в нейрогеномике поведения: 1. «от гена к поведению»; 2. «от поведения к гену»;
- **Генетический контроль некоторых видов поведения у грызунов;**
- Моделирование нервных и психических болезней человека на грызунах.

Нейромедиаторы – биологические активные химические вещества, посредством которых осуществляется передача электрического импульса от нейрона.

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕДИАТОРОВ

- **Аминокислоты (ГАМК, аспартат, глутамат, глицин, гистамин, таурин).**
- **Ацетилхолин.**
- **Моноамины (адреналин, норадреналин, дофамин, серотонин).**
- **Пептиды (>2000).**
- **Пурины (аденозин, АМФ, АДФ, АТФ и др.).**

СТРОЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СИНАПСА



Типичный химический синапс состоит из пре- и постсинаптической частей, разделенной щелью.

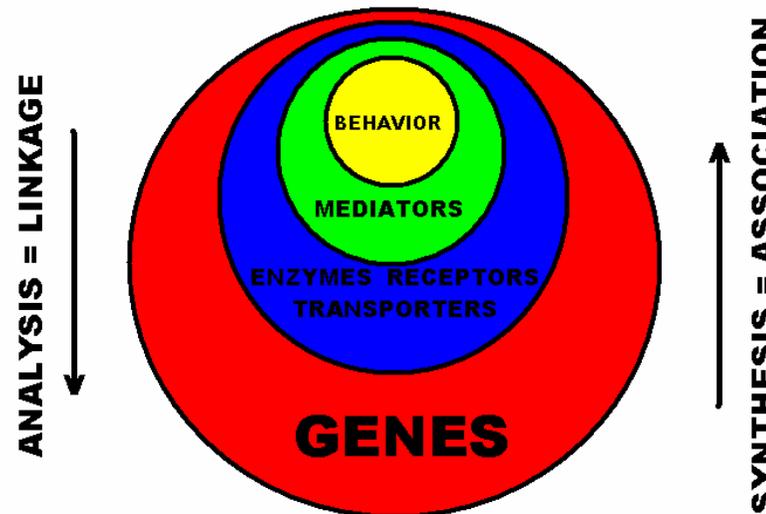
- В пресинаптическом нейроне происходит синтез медиатора, депонирование его в везикулы, транспорт их в места синаптического контакта и секреция медиатора в щель при деполяризации окончания.
- При секреции мембрана везикулы сливается с цитоплазматической мембраной и медиатор освобождается во внеклеточное пространство. Этот процесс катализируется ионами Ca²⁺.
- Секреция медиатора регулируется пресинаптическими рецепторами.
- Секретированный медиатор взаимодействует с постсинаптическими рецепторами и передает сигнал постсинаптическому нейрону.
- Затем избыток медиатора удаляется из синаптической щели.

Особенности регуляции поведения

- **Системы молекулярных механизмов, регулирующих поведение, вырожденные. Имеется избыточность, и существует множество дублирующих механизмов.**
- **Плейротропия - одна и та же молекулярная система участвует в регуляции многих форм поведения.**

Генетические подходы, применяемые в нейрогеномике поведения

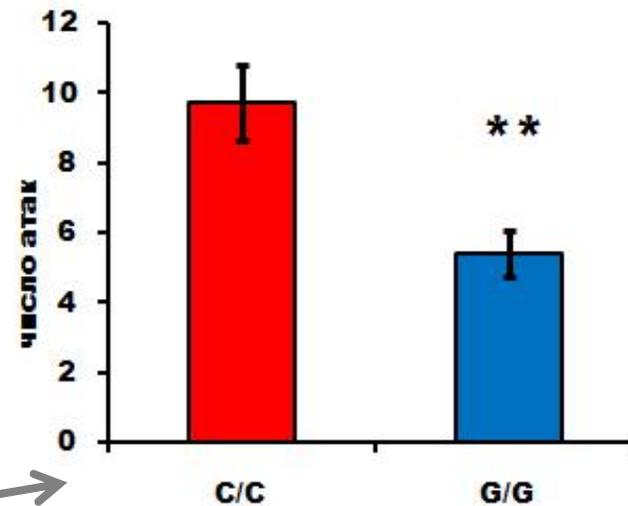
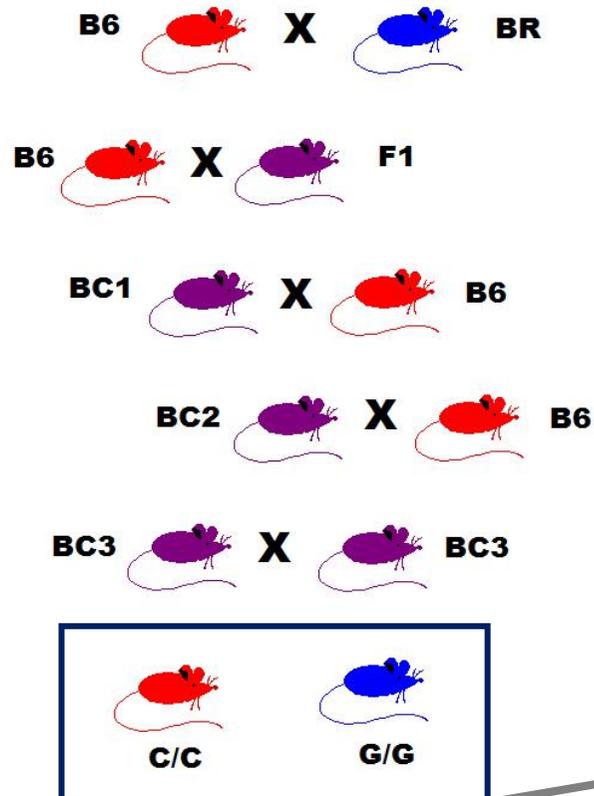
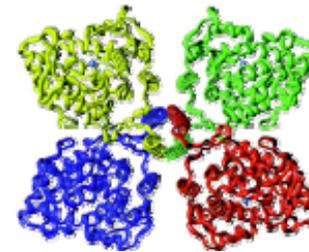
- Подход «от гена к поведению»: исследование функции гена на молекулярном и физиологическом уровне с последующим анализом влияния этого гена на поведение;
- Подход «от поведения к гену»: изучение генетической компоненты изменчивости поведения с последующим более детальным анализом феноменологии на уровне отдельных хромосом, генных комплексов или же отдельных генов.



Подход «от гена к поведению».

Метод конгенных линий

Функциональная мутация в 11 экзоне гена *tph2* (C1473G полиморфизм) мыши приводит к замене Pro447/Arg в тетрамеризационном домене, что в свою очередь приводит к снижению синтеза серотонина.



Подход «от гена к поведению».

Нокаутные и трансгенные мыши.

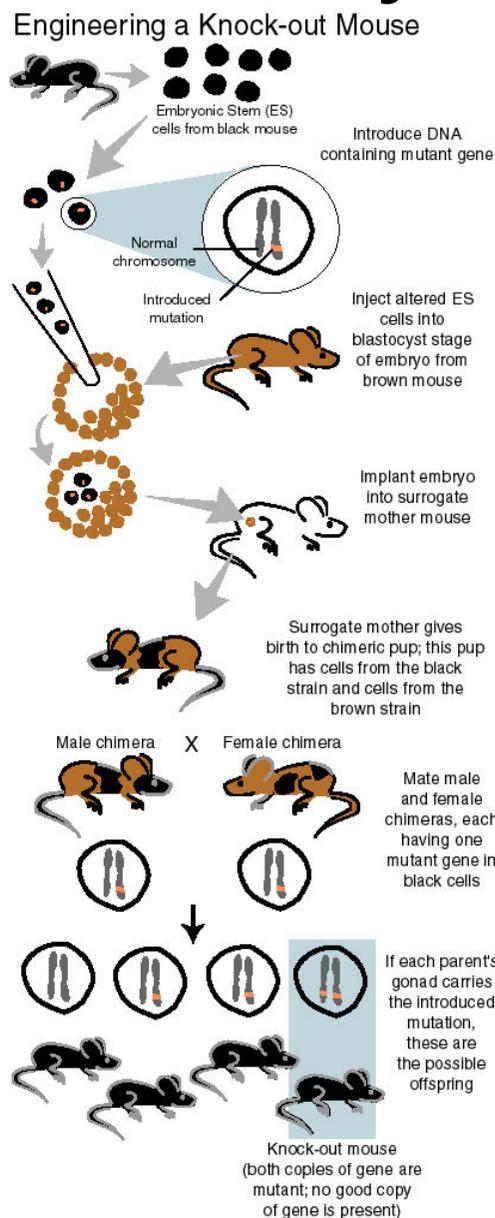


Схема получения нокаутных мышей

В эмбриональные стволовые клетки мышей некоторой чистой (то есть генетически однородной) линии (в данном случае — черного цвета) вводят фрагмент ДНК, содержащий мутантный (поврежденный) ген.

Этот фрагмент встраивается в хромосомы — нередко только в одну из двух гомологичных хромосом клетки.

Полученные мутантные стволовые клетки вводят в зародыши мышей другой линии (в данном случае — бурый) на ранней стадии развития и имплантируют эти зародыши в организм суррогатной матери.

Рождаются химерные мыши, некоторые из которых (те, у кого предшественники половых клеток развились из инъецированных стволовых клеток) производят исключительно черное потомство.

Если у каждой из таких мышей мутантный ген имеется в одной из двух гомологичных хромосом, то, в соответствии с менделевским расщеплением, приблизительно половину их потомства составят носители мутантного гена, а четверть — гомозиготы, имеющие мутантный ген в обеих хромосомах пары и, соответственно, не имеющие ни одной копии нормального (неповрежденного) гена.

Потомство таких гомозигот будет чистой линией мышей, нокаутных по данному гену.

Иллюстрация с сайта www.fhcrc.org © 2007 Fred Hutchinson Cancer Research Center

Мыши, нокаутные по

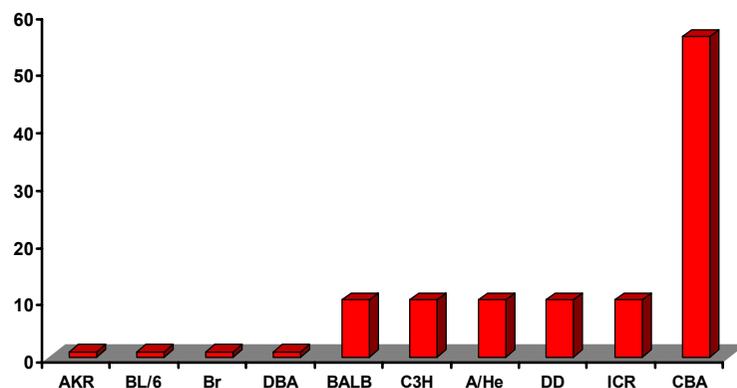
- гену рецептора серотонина 5-НТ1А характеризуются повышенной тревожностью,
- гену 5-НТ1В рецептора отличаются высоким уровнем агрессии,
- гену транспортера дофамина (ДАТ) повышенной двигательной активностью (5-6 раз более подвижны, чем животные дикого типа).

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НОКАУТ: ЗА И ПРОТИВ

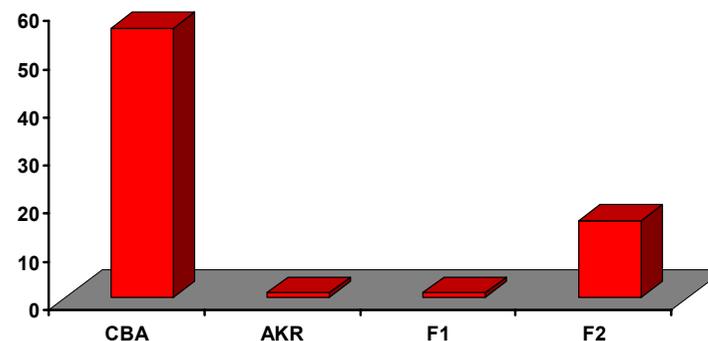
- Позволяет исследовать значение отдельного гена.
- Влияние нокаута на поведение в общем совпадает с эффектами антагонистов.
- Позволяет выявить молекулярные механизмы действия препаратов.
- **Активация компенсаторных механизмов.**
- **Нокауты по некоторым генам не выживают.**

Подход «от поведения к гену». Сравнение инбредных линий. Гибридологический анализ.

Сравнение процента каталептиков у мышей инбредных линий



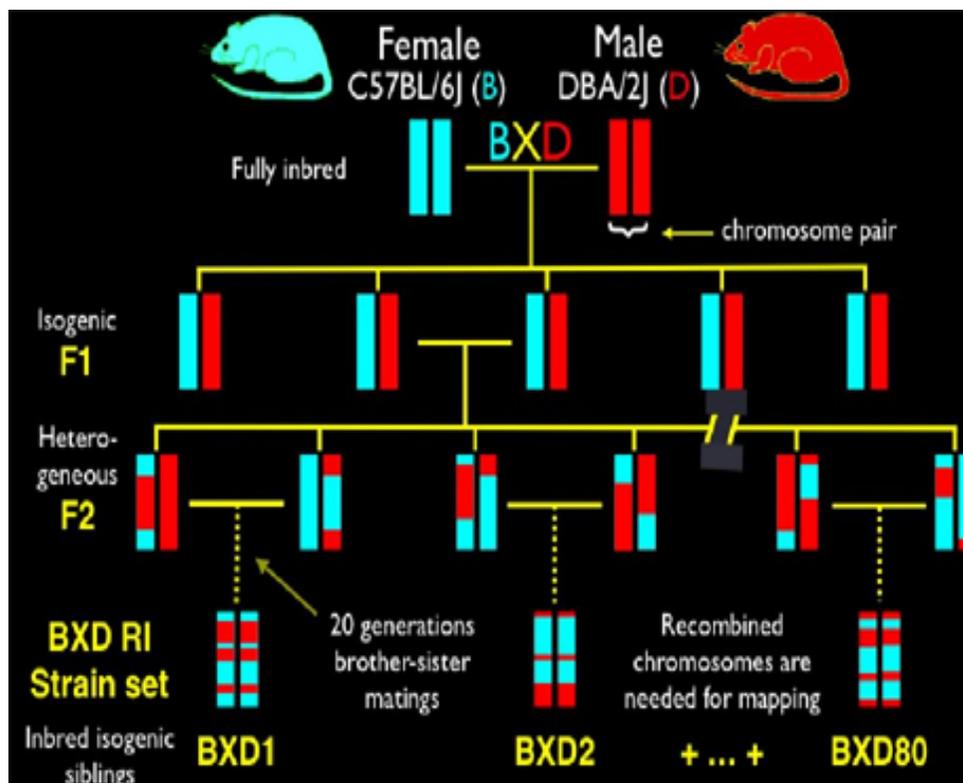
Гибридологический анализ



Таким образом, каталепсия является моно- или олигогенным рецессивным аутосомным признаком с пенетрантностью, равной 54%

Подход «от поведения к гену».

Метод рекомбинантных инбредных линий.

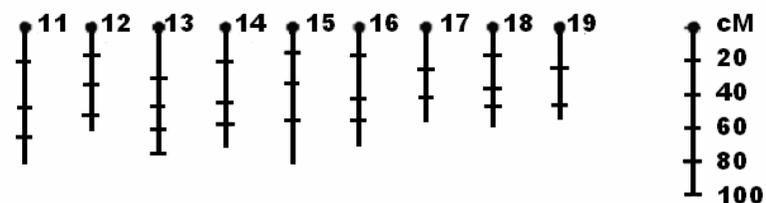
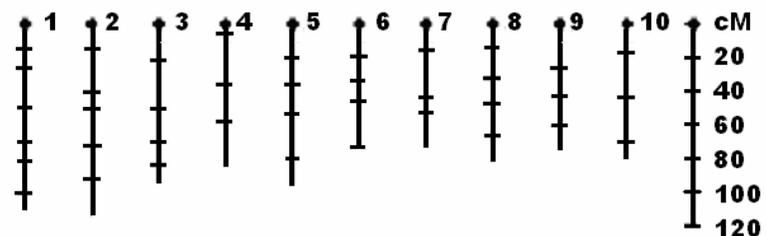


- позволяет выявить участие небольшого числа «главных» генов;
- получают на основе популяции гибридов F2;
- каждая RI представляет собой «зафиксированный» в гомозиготном состоянии один из вариантов расщепления признаков.

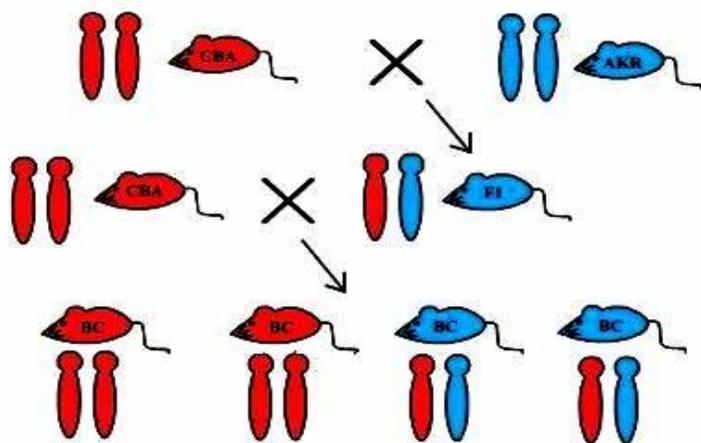
Подход «от поведения к гену». QTL анализ

- Самый распространенный и мощный метод генетического картирования сложных признаков.
- Основан на измерении сцепления признака с серией полиморфных маркеров (например, микросателлитов), покрывающих геном.
- QTL - область генома с высоким сцеплением анализируемого признака.
- Нейрогены, локализованные в QTL, рассматриваются как гены-кандидаты.
- QTL достаточно эффективен для выявления действия главных генов, т.е. вносящих основной вклад в формирование признака.

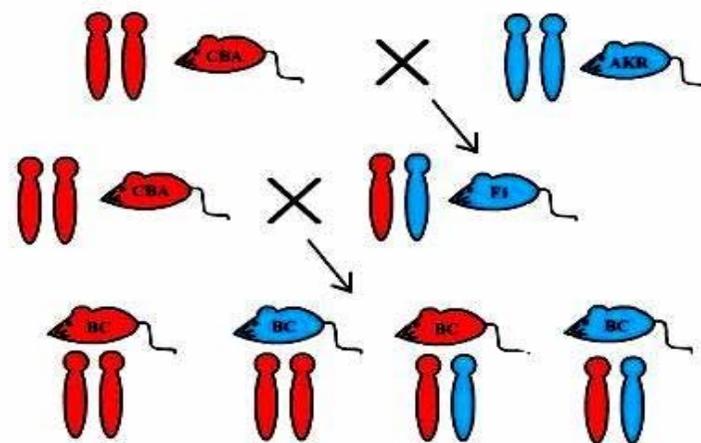
Подход «от поведения к гену». QTL анализ



Наличие сцепления



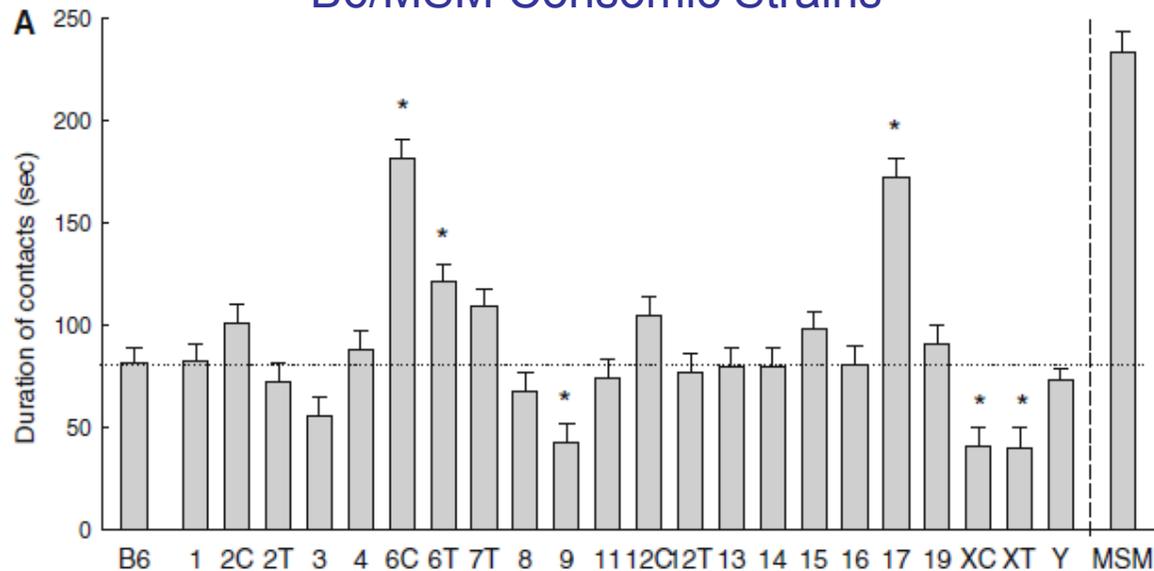
Отсутствие сцепления



Подход «от поведения к гену».

Consomic strains

Генетическое картирование социального поведения с помощью мышиных B6/MSM Consomic Strains

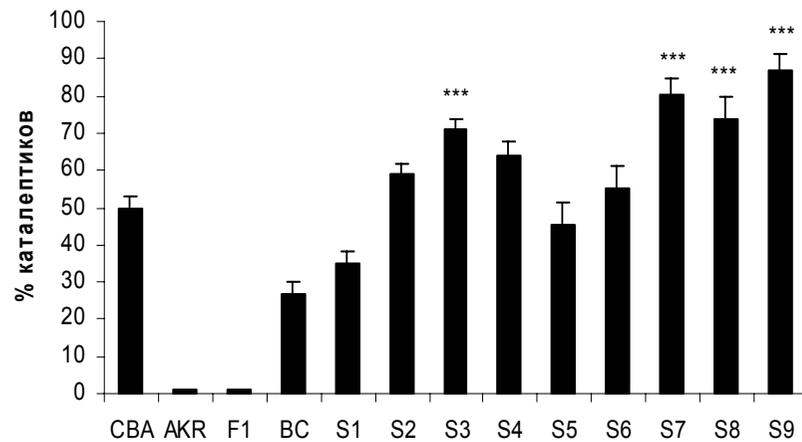


- Consomic strains представляют собой набор линий с одинаковым генетическим бэкграундом за исключением одной хромосомы (для каждой линии), которая была заменена на соответствующую хромосому другой инбредной линии;
- В указанном примере каждая consomic strain обозначается B6-ChrN^{MSM}, где N означает номер хромосомы, перенесенной от инбредной линии MSM.

Подход «от поведения к гену».

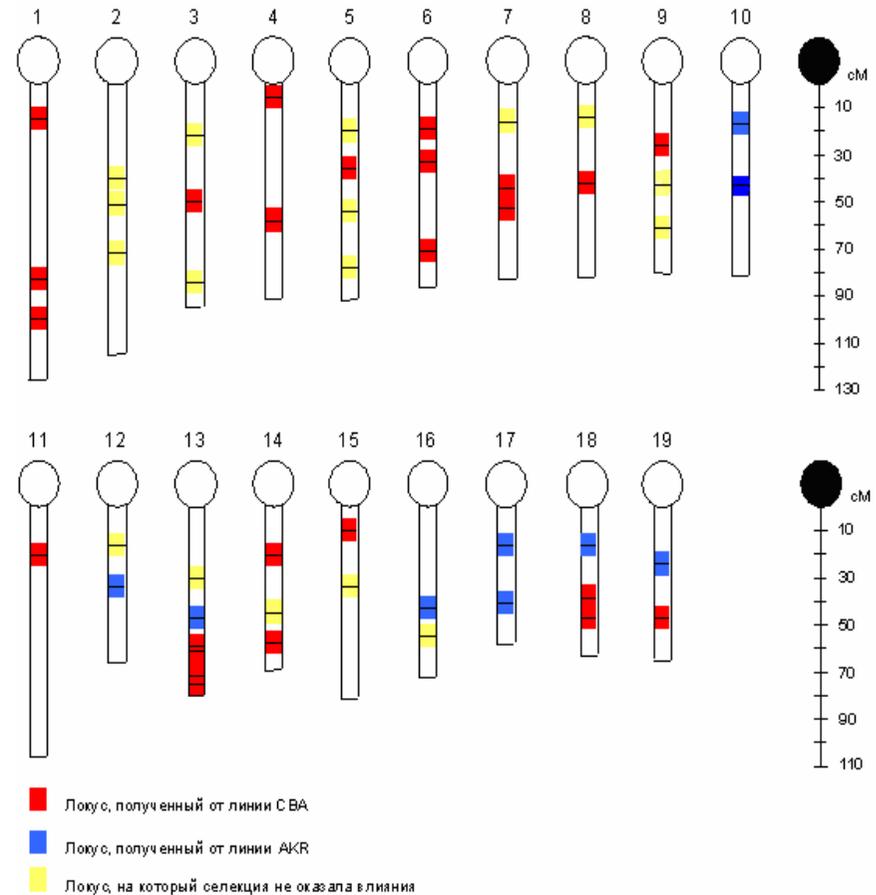
Селекционный эксперимент

Динамика изменения доли каталептиков в процессе селекции мышей на каталепсию



*** $p < 0.001$ по сравнению с линией CBA

Полигенный контроль каталепсии у мышей



Исследование спонтанной активности в домашней клетке

Table 1: Comparison of the spontaneous home-cage activity in the parental strains, B6xKJR F₁ and B6xKJR F₂

	Average value				H ²
	C57BL/6J	KJR	B6xKJR F ₁	B6xKJR F ₂	
THA	46.5 (8.9)	122.3 (15.9)*	120.5 (19.1)*	98.0 (31.0)	0.62

Table 2: QTL for spontaneous home-cage activity

QTL	Chr.	Markers (position (cM))	
		Proximal	Distal
<i>Hylaq1</i>	2	D2Mit126 (48.5)	D2Mit423 (69.1)
<i>Hylaq2</i>	2	D2Mit22 (73.4)	D2Mit29 (92.3)
<i>Hylaq3</i>	10	D10Mit73 (48.6)	D10Mit180 (56.2)

Table 3: QTLs related to locomotor activity overlapping to *Hylaq1* and *Hylaq2* region on Chr 2.

QTL	Position (cM)	Phenotype	Reference
<i>Actre2</i>	40–60	locomotor activity in response to alcohol challenge compared	[17,27]
<i>Etahr</i>	48	locomotor activity in response to alcohol challenge compared	[28]
<i>Cplaq7</i>	53	circadian period of locomotor activity	[29,30]
<i>Actre3</i>	62–64	locomotor activity at later time intervals following ethanol challenge (10–15 min)	[17]
<i>Actre4</i>	64–66	locomotor activity at later time intervals following ethanol challenge (15–20 min)	[17]
<i>Rrod2</i>	74	rotarod performance at day 2	[6]
<i>Slms2</i>	80	pleiotropic effects on sensitivity to locomotor stimulants, ethanol and allopregnanolone	[31]
<i>Nilac3</i>	83.1	locomotor activity after nicotine administration	[7]
<i>Dloc1</i>	84.2	duration of locomotor activity	[6]

Агрессивное поведение

- Определяет структуру сообщества и является фактором микроэволюции;
- Обеспечивает изоляцию группы в пределах одной популяции, что препятствует перемешиванию групп при встрече их на одной территории;
- Препятствует проникновению в данное сообщество чужих особей.

КЛАССИФИКАЦИЯ ФОРМ АГРЕССИИ

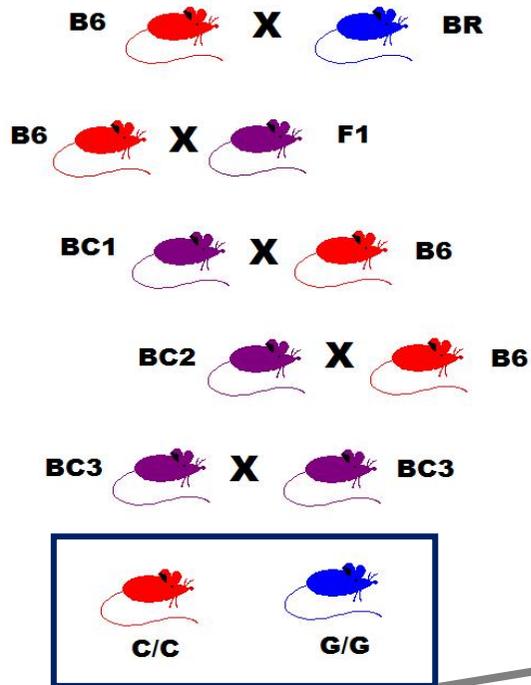
- Агрессия хищника
- Межсамцовая
- Защита территории
- Адресованная человеку
- Вызванная страхом
- Защита детенышей

ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ МЕЖСАМЦОВОЙ АГРЕССИИ

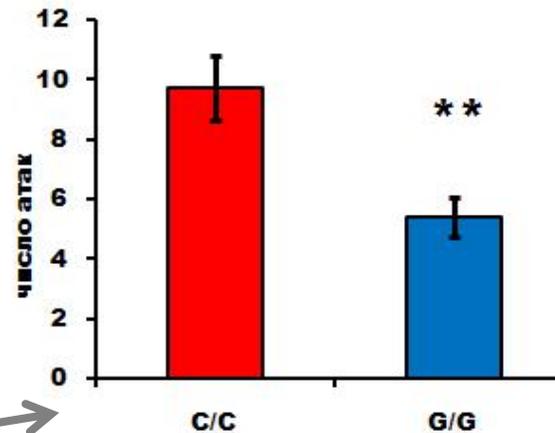
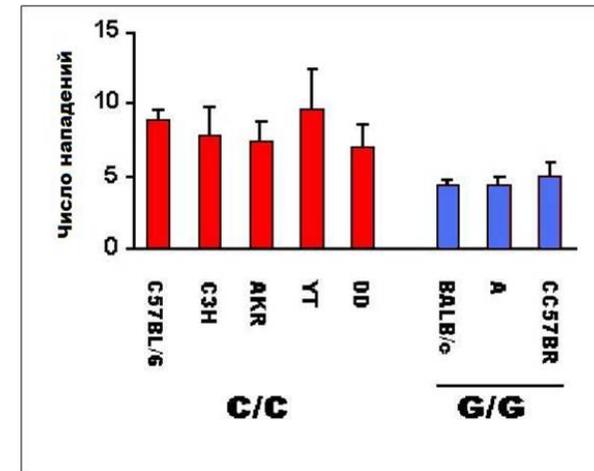
- Аденозин 2a рецептор
- Андроген рецептор
- Кальций/кальмодулин киназа
- Андроген рецептор
- Кальций/кальмодулин киназа II
- Энкефалин
- Рецептор эстрогена
- Гистаминовый 1 рецептор
- 5-HT1B рецептор
- MAO A
- NSAM
- Нейролекин-1 рецептор
- NO синтетаза
- Окситоцин
- Стероид сульфотаза
- Область хромосомы Y
- Такинин 1 рецептор
- триптофангидроксилаза2
- T фактор роста α

Роль гена *trh2* в регуляции межсамцовой агрессии

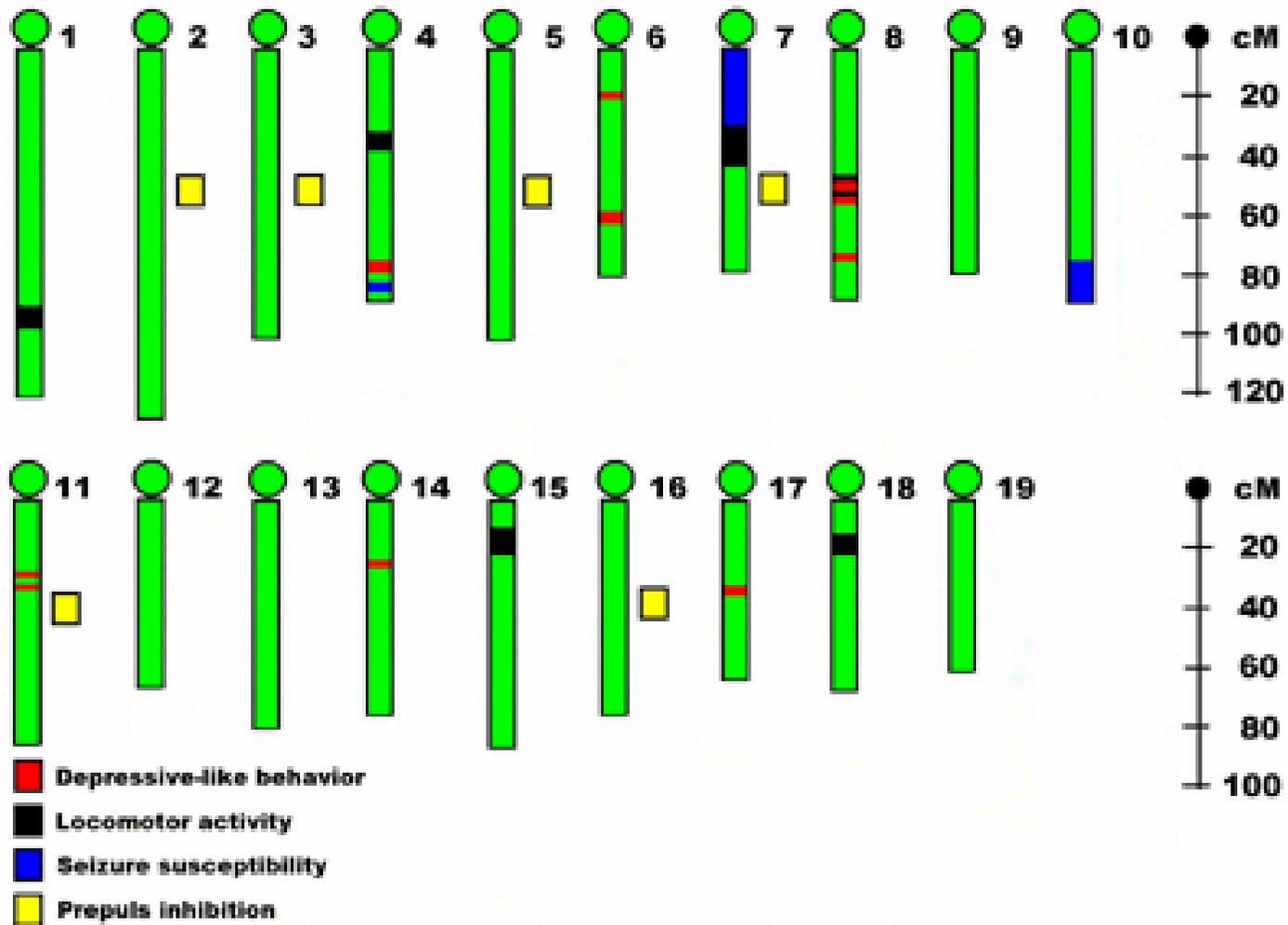
Доказательство сцепления полиморфизма C1473G с интенсивностью агрессии



АССОЦИАЦИЯ ЧИСЛА ДРАК С C1473G ПОЛИМОРФИЗМОМ



Полигенный контроль поведения у мышей



Генетические модели нервных и психических болезней

- Классификация основана на механизмах и симптоматике.

Нейродегенеративные:

- болезнь Паркинсона или паркинсонизм,
- хорея Гентингтона (Хантингтона),
- болезнь Альцгеймера или старческое слабоумие (сенильная деменция).

Психические:

- аутизм,
- чрезмерная агрессия,
- депрессия.

КРИТЕРИИ ВАЛИДНОСТИ

- **Face validity** – поведенческие и эндокринные характеристики модели должны напоминать симптоматику моделируемой патологии.
- **Construct validity** – модель должна моделировать механизмы патологии, т.е. должна согласоваться с существующими представлениями о механизме патологии.
- **Predictive validity** – фармакологические воздействия должны сходным образом влиять на характеристики модели и на симптоматику патологии

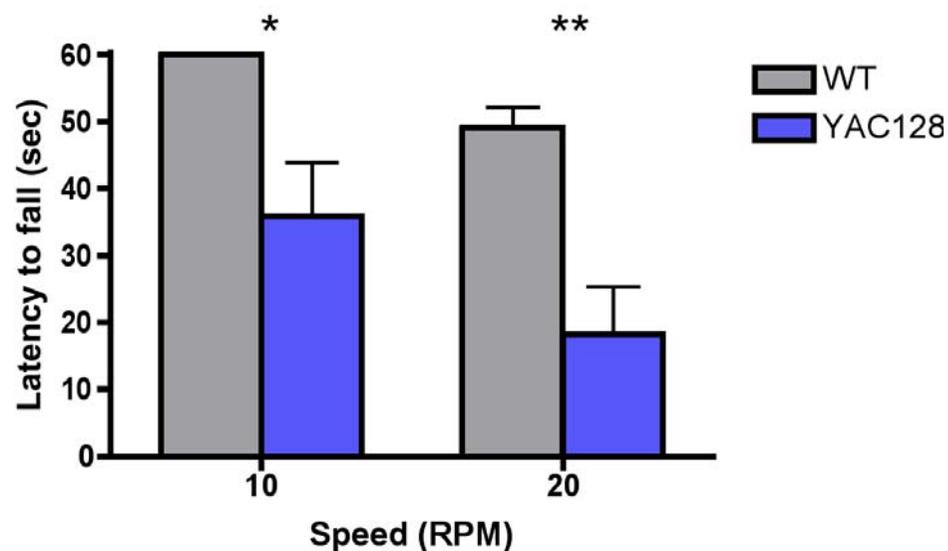
Хорея Гентингтона (Хантингтона)

- Риск 1 на 10 000. Первые симптомы наблюдаются в возрасте 35-45 лет. Летальный исход через 15 лет после начала.
- Характеризуется дискинезией по типу хореи (вычурные вальсирующие движения рук и ног) и на последних стадиях выраженным слабоумием. Постепенно появляются проблемы с памятью, могут возникнуть депрессия, эмоциональный дефицит, агрессия, навязчивые идеи, проблемы с узнаванием других людей.
- Возникновение хореи связывают с экспансией **CAG повторов в первом экзоне гена Huntingtin (HTT)**, расположенном на коротком плече 4 хромосомы — 4p16.3 и кодирующем белок хантингтин. Нормальное число повторов 6-35, а при хорее 36-121, что приводит к синтезу дефектного белка. Такая измененная форма называется мутантной HTT (мHTT) и вызывает разрушение определенных типов нейронов. Нейроморфологическая картина характеризуется атрофией стриатума, а на поздней стадии также атрофией коры головного мозга.
- Нарушение взаимодействия ГАМК и дофамина.

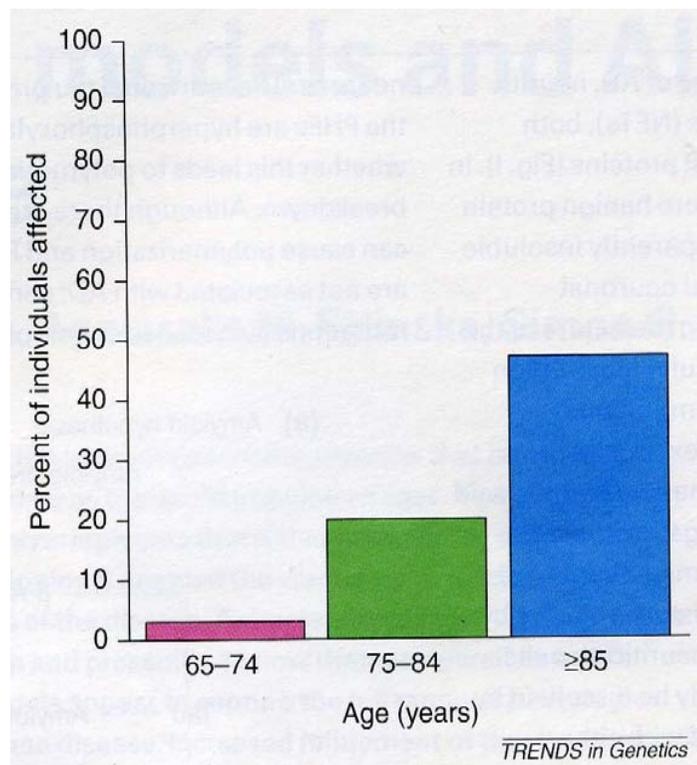
Моделирование ХГ: трансгенные мыши YAC128

- С помощью YAC вектора этим мышам был введен ген *HTT* со вставкой 128 CAG повторов;
- С 2х месячного возраста: дефицит моторных функций, умеренные нарушения когнитивных способностей, депрессивноподобное поведение;
- Разрушение нейронов в стриатуме.

Поведение мышей в тесте «беговая дорожка»



БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

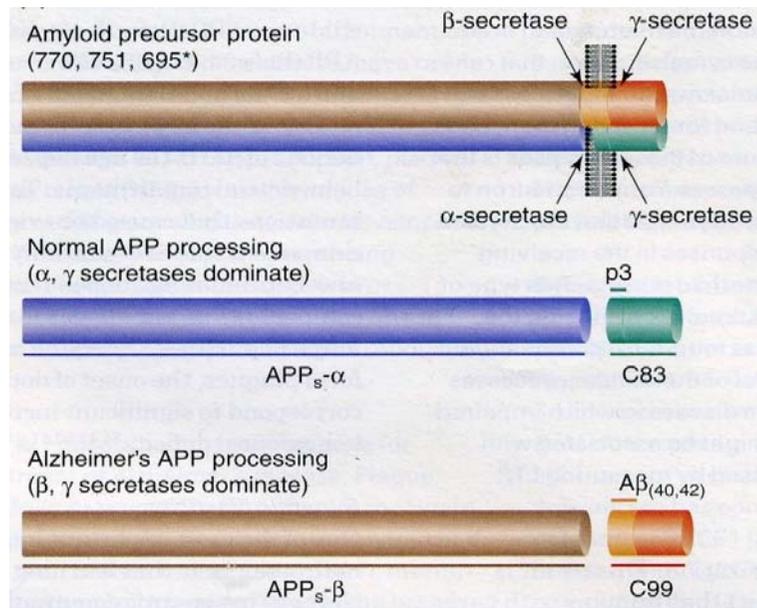


- как правило обнаруживается у людей старше 65 лет;
- клинические черты: значительное снижение большинства мыслительных способностей, памяти, раздражительность, агрессивность, нарушения речи и узнавания. Масса мозга уменьшается на 20-30%;
- средняя продолжительность жизни после установления диагноза около 7 лет.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

- дегенерация большого числа нейронов коры и гиппокампа;
- сенильные бляшки, состоящие из дегенерированных нервных волокон и β -амилоидных нитей, в коре и гиппокампе;
- фибриллярные пучки и тела Гирано, содержащие аномальный тау-протеин в гиппокампе.

ОБРАЗОВАНИЕ β -АМИЛОИДА



- Нормальное расщепление APP белка происходит α -секретазой, которая разрезает белок посередине β -амилоидного фрагмента.
- При болезни Альцгеймера работают в основном β - и γ -секретазы, которые образуют β -амилоид.

ФАКТОРЫ РИСКА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА



APP – ген предшественника β -амилоида, PSEN1 и PSEN2 – гены мембранных белков пресенилинов (1 и 2), регулирующих γ -секретазу, APOE ϵ 4 ген аполипопротеина E.

Моделирование болезни Альцгеймера: трансгенные мыши APP^{swe}/PS1^{dE9}

- Получены в результате двойного трансгенеза: они экспрессируют мутантный аллель гена APP человека и ген PS1 человека (пресенилин 1) с делецией в 9 экзоне.
- У 4месячных мышей в мозге начинают развиваться амилоидные бляшки.
- Нарушение когнитивных функций уже в возрасте 6 месяцев.
- Дефицит холинергической нейротрансмиссии, развивающийся с возрастом.

Нейродегенеративные заболевания

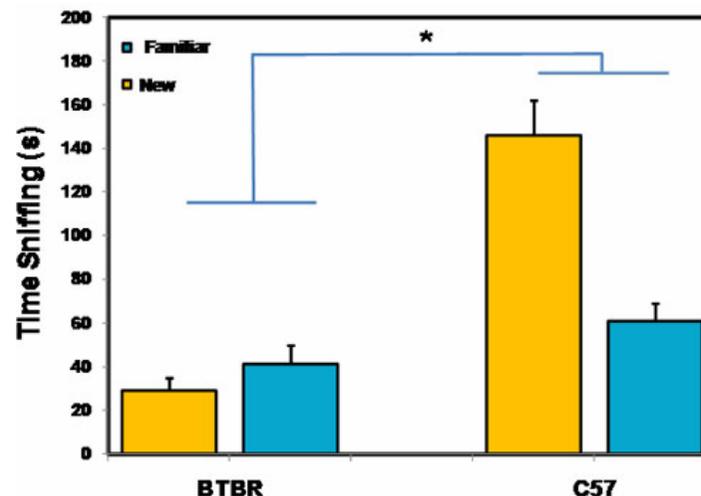
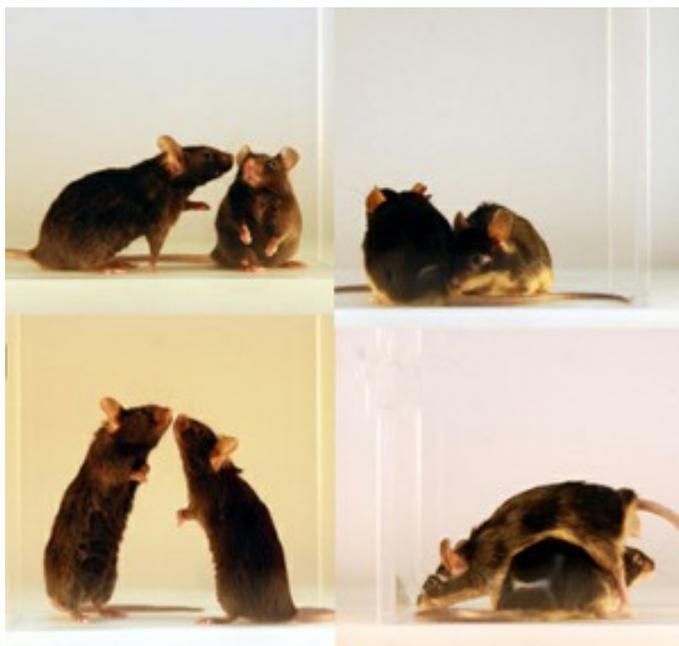
- В основе механизма болезней Хантингтона и Альцгеймера лежат нейродегенеративные процессы, связанные с существенной редукцией популяции нейронов мозга.
- Дисбаланс медиаторных систем, вызванный дегенерацией, является причиной наблюдаемых нарушений поведения и психики.

Аутизм - расстройство, характеризующееся

- недостатком социальных взаимодействий;
- нарушенной взаимной коммуникацией;
- ограниченностью интересов и повторяющимся репертуаром поведения.

Распространенность расстройств аутистического спектра составляет 6:1000.

Моделирование аутизма: мыши линии BTBR T+tf/J



- Дефицит социальных контактов
- Высокий уровень повторяющихся актов умыывания (self-grooming)

3 SNPs в кодирующей части гена *Kmo* были найдены только у линии BTBR по сравнению с другими 12ю инбредными линиями. Ген *Kmo* кодирует кинуренин 3-гидроксилазу, фермент, который вовлечен в синтез кинуреновой кислоты, высокий уровень которой в мозге был найден у больных с психическими расстройствами.

Reference SNP ID	Gene location	Allele	AA residue
rs32540044	Exon 9	C/T	C250R
rs32535929	Exon 13	A/G	K374R
rs32535930	Exon 13	C/T	L386F

Высокий уровень агрессии: мыши линии Tg8 (нокауты по гену MAO-A)

- Фермент MAO-A у мыши и человека кодируется генами, локализованными в X хромосомах;
- MAO-A осуществляет катаболизм моноаминов, таких как серотонин, норадреналин и дофамин.
- У линии мышей Tg8, нокаутных по гену MAO-A, полностью отсутствует активность этого фермента;

Поведение мышей Tg8:

- 100% агрессоров в линии Tg8 при 30% в контрольной линии C3H/He;
- Более короткий латентный период первой атаки;
- Сниженная исследовательская активность в тесте «свет-темнота».

Поведение мужчин голландского семейства с мутацией в гене MAO-A, которая приводила к обрыву синтеза белка:

- Повышенная агрессия;
- Пограничная умственная отсталость.



Депрессивные расстройства



- В развитых странах 12.7% мужчин и 21.3% женщин страдают депрессивными психозами.
- Депрессия характеризуется апатией, снижением интереса, чувством безысходности. Бредом собственной бесполезности, чувством вины суицидальными мыслями.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ДЕПРЕССИИ

Table 1: Overview of recent evidence for candidate genes for bipolar disorder (BPD)

Gene	Location	Functional significance	Supportive evidence
<i>DISC1</i>	1q42	Neuronal structural protein	Millar <i>et al.</i> (2004)
<i>DRD5</i>	4p16.1	DA system regulates emotion and motivation	Holmes <i>et al.</i> (2001)*
<i>DAT</i>	5p	Mediates reuptake of DA	Greenwood <i>et al.</i> (2001)
<i>HTR4</i>	5q	Encodes the 5-HT ₄ receptor, which influences DA secretion	Ohtsuki <i>et al.</i> (2002)
<i>GRIN1</i>	9q	Codes for a critical NMDA receptor subunit; lithium may act via NMDAR	Mundo <i>et al.</i> (2003)
<i>DRD4</i>	11p	DA system regulates emotion and motivation	Muglia <i>et al.</i> (2002)
<i>BDNF</i>	11p	Neuronal growth factor involved in stress and antidepressant response	Sklar <i>et al.</i> (2002), Neves-Pereira <i>et al.</i> (2002), Kernie <i>et al.</i> (2000)*, Dluzen <i>et al.</i> (2001)*, Lyons <i>et al.</i> (1999)*
<i>DRD2</i>	11q	DA system regulates emotion and motivation	Massat <i>et al.</i> (2002a)
<i>NCAM1</i>	11q	Involved in neuronal growth and pathway formation	Arai <i>et al.</i> (2004)
<i>P2RX7</i>	12q	Calcium-stimulated ATPase; influences neurotransmitter release and neurogenesis	Barden <i>et al.</i> (2004)
<i>G72/G30</i>	13q	<i>G72</i> interacts with D-amino acid oxidase; <i>G30</i> unknown	Hattori <i>et al.</i> (2003), Chen <i>et al.</i> (2004), Schumacher <i>et al.</i> (2004)
<i>HTR2A</i>	13q	May mediate effects of serotonin reuptake inhibitors	Ranade <i>et al.</i> (2003)
<i>GRIN2A</i>	16p	Glutamate receptor subunit	Itokawa <i>et al.</i> (2003)
<i>ADCY9</i>	16p	Second messenger in neuronal signaling; may be antidepressant target	Toyota <i>et al.</i> (2002b)
<i>5-HTT</i>	17q	Promoter alleles affect transcriptional efficiency of 5-HTT	Collier <i>et al.</i> (1996), Rotondo <i>et al.</i> (2002)
<i>CHMP1.5</i>	18p	Affects G-protein signaling	Berrettini (2003)
<i>COMT</i>	22q	<i>COMT</i> alleles affect enzymatic activity	Lachman <i>et al.</i> (1996), Rotondo <i>et al.</i> (2002)
<i>GRK3</i>	22q	Regulates homeostatic brain response to DA	Barrett <i>et al.</i> (2003), Niculescu <i>et al.</i> (2000)*
<i>GABRA3</i>	Xq	BPD may stem in part from GABA deficit	Massat <i>et al.</i> (2002b)
<i>MAOA</i>	Xp	Degrades DA, serotonin, norepinephrine	Preisig <i>et al.</i> (2000)

DISC1, disrupted-in-schizophrenia 1; DA, dopamine; *DRD*, dopamine D; *DAT*, dopamine transporter; *NMDAR*, *N*-methyl-D-aspartate receptors; *BDNF*, brain-derived neurotrophic factor; *NCAM1*, neural cell-adhesion molecule 1; *P2RX7*, purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7; *ADCY9*, adenylate cyclase type 9; *COMT*, catechol O-methyltransferase; *GRK3*, G-protein receptor kinase 3; *GABRA3*, gamma amino butyric acid receptor 3; GABA, gamma amino butyric acid.

*Animal study.

НОКАУТНЫЕ ЖИВОТНЫЕ КАК МОДЕЛИ ДЕПРЕССИИ

- Моделируют роль отдельных генов в механизме нарушений поведения и чувствительности к антидепрессантам.
- Следующие нокаутные мыши предложены как модели депрессии (Cryan, Mombereau, 2004)
- Серотонин: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT₇, SERT
- Норадреналин: DβH, α2A, α2C, NET
- MAO: MAO-A, MAO-B
- Опиаты: μ-рецептор, дельта опиоид рецептор
- ГАМК: ГД, ГАМКВ
- Глутамат: NMDA δ4 субъединица, mGluR7
- и еще по крайней мере 25 других генов.

НАСЛЕДСТВЕННАЯ КАТАЛЕПСИЯ У КРЫС ГК КАК СЕЛЕКЦИОННАЯ МОДЕЛЬ ДЕПРЕССИИ

FACE VALIDITY



- В популяции крыс Вистар около 10% животных сохраняют приданную им вертикальную позу более 20 с.
- Этот признак был усилен длительной селекцией и получена линия крыс ГК, в которой каталептическое замирание наблюдается более чем у 50% особей.

Признак	Эффект селекции
Двигательная активность в открытом поле (психомоторный дефицит)	↓
Неподвижность в тесте Порсолта (отчаяние, безысходность)	↑
Шок агрессия (раздражительность)	↑
Нервозность	↑
Медленно-волновой сон (бессонница)	↓
Парадоксальный сон	0

НАСЛЕДСТВЕННАЯ КАТАЛЕПСИЯ У КРЫС ГК КАК СЕЛЕКЦИОННАЯ МОДЕЛЬ ДЕПРЕССИИ

CONSTRUCT VALIDITY

Параметр	Эффект селекции
Дофамин	↓
Норадреналин	↓
Серотонин	↓
Кортикостерон	↓
Тироксин	↓

Вызванные селекцией нейрохимические и эндокринные изменения согласуются с предсказанными на основании существующих гипотез о механизмах депрессии.

PREDICTIVE VALIDITY

