



На правах рукописи

КУЛИКОВ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ

ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗА – КЛЮЧЕВОЙ ФЕРМЕНТ БИОСИНТЕЗА
СЕРОТОНИНА : ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И АССОЦИАЦИЯ С
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ ЗАЩИТНОГО ПОВЕДЕНИЯ

(03.00 15 – генетика)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук

Новосибирск 2005

Работа выполнена в лаборатории нейрогеномики поведения Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Научный консультант:	доктор медицинских наук, профессор Попова Нина Константиновна Институт цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирск
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, профессор Бородин Павел Михайлович Институт цитологии и генетики СО РАН г. Новосибирск
	доктор биологических наук, профессор Савватеева-Попова Елена Владимировна Институт физиологии им И.П. Павлова РАН г. Санкт-Петербург
	член-корр. РАН, профессор Афтанас Любомир Иванович Институт физиологии СО РАН г. Новосибирск
Ведущее учреждение –	Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова г. Москва.

Защита состоится “30” “ноября” 2005 г. на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003 011 01) в Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу пр. академика Лаврентьева, 10, 630090, г. Новосибирск, т/ф (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики СО РАН.

Автореферат разослан “18” “окт.” 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук



Груздев А Д

2006-4
20617

2202283

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой генетики поведения, нейрогенетики и нейробиологии является изучение молекулярного механизма развертывания информации, записанной в молекуле ДНК, в сложный поведенческий признак (Бензер, 1975; Crabbe, 1999; McClearn, 1999; Boguski, Jones, 2004). В настоящее время не вызывает сомнения ключевая роль медиаторов головного мозга в регуляции поведения животных и человека в норме и патологии. Одним из классических медиаторов является серотонин (5-гидрокситриптамиин). Серотониновые нейроны лидируют по числу синаптических контактов (Jacobs, Azmitia, 1992). Кроме того, медиатор действует на 14 различных типов рецепторов, сопряженных со всеми основными механизмами внутриклеточной трансдукции сигнала (Saudou, Hen, 1994; Barnes, Sharp, 1999). Эти два фактора определяют удивительную полифункциональность серотонина – способность его контролировать большое количество различных процессов в ЦНС и форм поведения (Saudou, Hen, 1994; Попова, Куликов, 2003). С помощью фармакологических методов показано участие серотониновой системы в регуляции агрессивного, полового, пищевого и других форм поведения (Попова и др., 1978; Jacobs, Fornal, 1995; Lucki, 1998). Интерес к серотониновой системе мозга обусловлен еще и тем, что трансмембранный транспортер серотонина (Blakely et al., 1994, 1998; Blakely, 2001) и рецепторы 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} типов (Lucki et al., 1994; Blier, de Montigny, 1994; Eison, Mulins, 1996; Pineyro, Blier, 1999) вовлечены в молекулярный механизм действия антидепрессантов и анксиолитиков.

Ключевым ферментом биосинтеза серотонина является триптофангидроксилаза (ТПГ), катализирующая гидроксилирование триптофана в 5-гидрокситриптофан, – первую и лимитирующую стадию биосинтеза медиатора (Fitzpatrick, 1999).

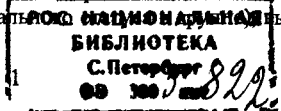
В 2003 году было показано существование двух изоформ ТПГ – ТПГ-1 и ТПГ-2, которые кодируются генами *tph1* и *tph2* (Walther et al., 2003). Изоформа, кодируемая геном *tph1*, экспрессируется только в периферических тканях, эпифизе и тучных клетках. В мозге синтез серотонина осуществляется изоформой, кодируемой геном *tph2* (Walther et al., 2003; Zhang et al., 2004).

Открытый в 2004 году ген *tph2* сразу же стал предметом интенсивного изучения. Были выявлены около 25 различных однокусных мутаций в гене *tph2* человека и показана ассоциация некоторых из этих мутаций с предрасположенностью к аффективным психозам (Breidenthal et al., 2004; De Luca et al., 2004; Harvey et al., 2004, 2004; Zill et al., 2004; Zhang et al., 2005). Однако до настоящего времени связь этих мутаций с активностью ТПГ в мозге установлена не была.

Несмотря на ключевую роль ТПГ в биосинтезе серотонина и в механизме передачи сигнала в серотониновом синапсе и на постулируемую связь изменений активности фермента с наследственными изменениями (и нарушениями) поведения, очень мало было известно о генетическом контроле активности фермента в мозге. Имеющиеся публикации демонстрируют только наличие межлинейных различий в активности фермента у мышей (Barchas et al., 1974; Diez et al., 1976; Natali et al., 1980; Klapp et al., 1981).

Ген, кодирующий ТПГ в мозге, традиционно рассматривается как ген-кандидат, вовлеченный в регуляцию поведения и психики (Nielsen et al., 1994; 1996; Veenstra-VanderWeele et al., 2000; Gingrich, Hen, 2001, De Luca et al., 2004; Zill et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Особое внимание привлекает возможная ассоциация ТПГ с выраженностью защитного поведения. Защитное поведение представляет собой комплекс эволюционно закрепленных врожденных реакций на неодушевленные и одушевленные угрожающие стимулы внешней среды. Можно выделить такие разновидности защитного поведения как защита самцом территории (или социальным животным) и защитная реакция, вызванная страхом



оборонительная агрессия, реакция активного избегания и реакция замирания (затаивание) (Dixon, 1998; Порова, 1999; Попова, 2004).

Генетико-молекулярные механизмы межсамцовой агрессии традиционно изучают на линейных мышах и гибридах (Махсон, 1992; 1999). Для изучения наследственных механизмов вызванной страхом агрессии на человека были созданы две модели доместикации – на серебристо-черных лисицах (Трут, 1978; 1981) и серых крысах-пасюках (Беляев, Бородин, 1982; Никулина и др., 1985). Классической моделью изучения реакции активного избегания являются Римские линии крыс RHA и RLA, различающиеся по выраженности реакции активного избегания в челночной камере (Overstreet, 1992). Наконец, для исследования генетического контроля реакции замирания (катаlepsии) была создана линия крыс ГК (Колпаков, 1990; Kolpakov et al., 1996). Другой моделью естественной катаlepsии является пипковая (pinch-induced) катаlepsия мышей (Amir et al., 1981; Ornstein, Amir, 1981).

Цель и задачи исследования. Основной целью исследования было изучение закономерностей генетического контроля активности ТПГ в мозге и выяснение роли фермента в генетическом и молекулярном механизмах регуляции выраженности различных форм защитного поведения. Были поставлены следующие задачи:

1. Изучить закономерности генетического контроля активности ТПГ в мозге мышей.
2. Исследовать генетический контроль межсамцовой агрессии у мышей и связь межсамцовой агрессии с активностью ТПГ в мозге.
3. Проанализировать участие ТПГ в процессе доместикации серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков.
4. Исследовать роль ТПГ мозга в механизме регуляции генетически детерминированных различий в проявлении реакции активного избегания у крыс.
5. Изучить генетический контроль катаlepsии мышей.
6. Выяснить связь ТПГ с наследственно детерминированными различиями в предрасположенности к катаlepsии мышей и крыс.

Научная новизна. Были выявлены два типа наследственной изменчивости активности ТПГ в мозге мышей: конститутивный и регуляторный. Конститутивная изменчивость обусловлена C1473G полиморфизмом в 11-ом экзоне гена *trph2*, а регуляторная изменчивость – наследственным полиморфизмом по степени фосфорилирования фермента.

Выявлена ассоциация интенсивности драк с полиморфизмом C1473G в гене *trph2* мышей. Интенсивность драк была снижена у мышей с генотипом 1473G/G по сравнению с животными 1473C/C.

Установлено увеличение активности ТПГ в среднем мозге серебристо-черных лисиц и крыс-пасюков в процессе доместикации.

Выявлена ассоциация слабой выраженности реакции активного избегания со сниженной активностью ТПГ в среднем мозге крыс.

Показана связь наследственной предрасположенности к катаlepsии с повышенной активностью ТПГ в стриатуме мышей и крыс.

Ген, определяющий высокую предрасположенность к катаlepsии, локализован в дистальном фрагменте хромосомы 13 мыши.

Теоретическая и практическая значимость работы. Основным вкладом данного исследования в генетику и нейрогенетику поведения является экспериментальное доказательство генетической ассоциации активности ТПГ в мозге с наследственно детерминированным полиморфизмом по выраженности различных форм защитного поведения. Другим важнейшим теоретическим положением, продемонстрированным в работе, является экспериментальное доказательство того, что в основе селекции на выраженность защитного поведения лежит отбор генетических факторов, регулирующих активность ТПГ в головном мозге.

Показано существование связанной с геном *tph2* (конститутивной) и не связанной с ним (регуляторной) изменчивости активности ТПГ в мозге. Установлена связь конститутивной и регуляторной изменчивости с наследственным полиморфизмом основных типов защитного поведения. Выявление ассоциации C1473G полиморфизма в гене *tph2* с интенсивностью драк у самцов мышей имеет существенное эвристическое значение для понимания молекулярно-генетического механизма регуляции агрессии и жестокости. Показана ассоциация наследственно детерминированных особенностей агрессии на человека, активного избегания и каталепсии с регуляторной, но не конститутивной изменчивостью ТПГ в мозге. Полученные данные указывают на существенную роль генов, контролирующих посттрансляционную модификацию ТПГ, в регуляции наследственного полиморфизма по выраженности этих форм защитного поведения.

Обнаружена линия мышей СВА с чрезвычайно высокой предрасположенностью к каталепсии. Эта линия может использоваться как модель для изучения генетико-молекулярных механизмов естественной защитной реакции замирания. Разработан чувствительный флуориметрический метод измерения активности ТПГ в тканях.

Положения, выносимые на защиту.

1. Выявлены два типа наследственной изменчивости активности ТПГ в мозге: конститутивный и регуляторный. Конститутивная изменчивость обусловлена C1473G полиморфизмом в 11-ом экзоне гена *tph2*, кодирующего ТПГ. Регуляторная изменчивость связана с различиями в механизме обратимого фосфорилировании уже синтезированных молекул фермента.

2. Активность ТПГ в мозге ассоциирована с наследственной изменчивостью по выраженности различных форм защитного поведения у разных видов животных. Конститутивная изменчивость активности фермента ассоциирована с интенсивностью межсамцовой агрессии мышей. Регуляторная изменчивость – с выраженностью агрессии на человека, реакцией активного избегания и каталепсией.

3. Изменчивость порога (уровня, предрасположенности) и интенсивности (числа драк) межсамцовой агрессии мышей в значительной степени определяется генетическими факторами. Однако эти два показателя межсамцовой агрессии регулируются разными генетическими механизмами. В то время как доминирует низкий порог агрессивной реакции, интенсивность драк имеет промежуточный тип наследования. Обнаружена ассоциация числа драк между самцами мышей с полиморфизмом C1473G в гене *tph2*.

4. Селекция серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков на отсутствие агрессии на человека (доместикация) приводит к сходному увеличению активности ТПГ в среднем мозге.

5. Наследственно детерминированное отсутствие реакции активного избегания у крыс линии RLA ассоциировано со сниженной активностью ТПГ в среднем мозге.

6. Предрасположенность к реакции замирания (каталепсии) у мышей контролируется в основном геном, локализованным в дистальном фрагменте хромосомы 13.

7. Наследственная каталепсия у мышей каталептической линии СВА и крыс линии ГК, селекционированной на каталепсию, сопровождается локальным увеличением активности ТПГ в стриатуме.

Апробация работы. Результаты данной работы были представлены и обсуждены на Ученых Сессиях Института цитологии и генетики в 1988, 1991, 2000, 2003 годах, Всесоюзной конференции “Химия, биохимия и фармакология производных индола” (Тбилиси, 1986), Всесоюзной конференции «Медиаторы в генетической регуляции поведения» (Новосибирск, 1986), XV съезде Всесоюзного физиологического Общества им. И.П. Павлова, (Ленинград, 1987), 5-ом съезде ВОГИС (Москва, 1987), конференции “Медиаторы и поведение” (Новосибирск, 1988), 3 школе-семинаре по генетике и селекции животных (Бийск, 1989), Всемирном конгрессе по психиатрической генетике (Новый Орлеан, 1993, США), 4-ой Международной конференции Общества Нейробиологии Поведения (Сантьяго де Компостела, Испания, 1995), XIX съезде Российского физиологического Общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004) и на конференции Российского нейробиологического общества «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2005).

Публикации. Материал диссертации изложен в 54 публикациях в отечественных (31) и международных (23) реферируемых журналах

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание используемых методик, 5 глав результатов исследования, общее обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (771 работа) и список публикаций автора по теме диссертации (54 работы). Работа изложена на 221 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков и 21 таблицу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперименты проведены на мышах 12 инбредных линий A/He, A/Y, AKR/J, BALB/c, C3H/He, CBA/Lac, C57BL/6J, CC57BR, DBA/1, DD, PT и YT. Было проведено три гибридологических анализа 1) на линиях BALB/c (C) и C57BL/6 (B6), включающий реципрокных гибридов $F_1(C \times B6)$ и $F_1(B6 \times C)$, $F_2(B6 \times C) \times (B6 \times C)$ и бэккроссов $BC(C \times B6) \times C$; 2) на линиях AKR (AK) и CBA (CB), включающий реципрокные гибриды $F_1(AK \times CB)$ и $F_1(CB \times AK)$ и $F_2(CB \times AK) \times (CB \times AK)$ и 3) также на линиях AKR и CBA, их реципрокных гибридах F_1 и бэккроссах $BC(CB \times (AK \times CB))$.

Опыты проводили на самцах крыс аутбредных линий Вистар и ГК, прошедших 16-25 поколений селекции на высокую предрасположенность к каталепсии; самцах крыс линий Roman High and Low Avoidance (RHA/Verh и RLA/Verh), селекционированные по выраженности реакции активного избегания в челночной камере, а также самцы серых крыс-пасюков 24-27 поколений селекции на высокую (агрессивные) и низкую (ручные) агрессию на человека.

Часть исследований выполнена на самцах серебристо-черных лисиц из неселекционированной совхозной популяции (дикие) и прошедших 20 поколений селекции на высокую (агрессивные) и низкую (ручные) агрессию на человека.

Поведенческие тесты. Выраженность естественной межсамцовой агрессии мышей изучали на разработанной нами модели «спонтанной агрессивности» и оценивали по 1) уровню агрессивности – проценту агрессивных животных и 2) интенсивности агрессии – числу драк (Куликов, Попова, 1980; Porova, Kulikov, 1986). Проявление шипковой каталепсии у мышей исследовали по стандартной методике и выражали процентом животных, проявляющих не менее трех раз замирание, длящееся более 20 с (Куликов и др., 1989; Kulikov et al., 1993). Поведение крыс в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и свет/темнота изучали по стандартной методике и оценивали числом заходов в открытые рукава лабиринта и освещенный отсек и временем пребывания там (Kulikov et al., 1995).

Аналитические методы. Активность ТПГ в мозге определяли с помощью разработанных нами высоко чувствительной флюориметрии (Куликов и др., 1988) и жидкостной хроматографии высокого давления с электрохимическим детектором (Kulikov et al., 1995) и выражали в пикомолях 5-гидрокситриптофана, образующегося в мин на мг белка (пмоль/мг/мин).

Полиморфизм C1473G в гене *tph2* мыши изучали с помощью ПЦР образцов ДНК с праймерами предложенными Zhang et al (2004). Картирование гена, определяющего высокую предрасположенность к каталепсии, проводили с помощью ПЦР образцов ДНК с 65 полиморфными микросателлитными маркерами, покрывающими 19 аутосом мыши.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетический контроль активности ТПГ в мозге мышей.

Таблица 1 Активность ТПГ в стволе и в полушариях мозга мышей инбредных линий

Линии	Активность ТПГ (пикомоль/мг/мин)	
	Ствол	Полушария
DBA/1	13.8 ± 0.5	3.3 ± 0.3
CC57BR	15.0 ± 0.9	
A/He	16.8 ± 0.5	
BALB/c	17.5 ± 0.5	3.4 ± 0.2
DD	25.1 ± 1.1	10.3 ± 1.8
A/Y	25.5 ± 1.4	
YT	25.7 ± 1.2	
AKR	26.0 ± 1.0	13.0 ± 0.4
C3H/He	27.7 ± 1.2	13.6 ± 1.9
PT	27.8 ± 0.8	
CBA	28.9 ± 0.7	14.0 ± 0.7
C57BL/6	32.0 ± 0.8	11.4 ± 0.6

Выявлены существенные межлинейные различия в активности фермента в полушариях ($F_{6,41} = 42.9$, $p < 0.001$) и в стволе головного мозга ($F_{11,106} = 45.5$, $p < 0.001$, Табл.1). С помощью метода множественных сравнений Шеффе (1980) все линии были разделены на две контрастные группы: у животных линий DBA/1, CC57BR, A/He и BALB/c, принадлежащих к первой группе, активность ТПГ в стволе вдвое, а в полушариях вчетверо ниже, чем у мышей второй группы (DD, A/Y, YT, AKR, PT, C3H/He, CBA, C57BL/6).

Различия между двумя любыми линиями из разных групп достоверны, тогда как линии из одной группы не различаются по данному признаку. Обнаружена высокая межлинейная корреляция между активностью фермента в стволе и полушариях мозга ($r = 0.89$, $p < 0.01$).

Мыши разных линий отличаются также по константе Михаэлиса (K_M) и максимальной активности фермента (V_{max}) (Табл 2). Кинетические характеристики ТПГ, выделенной из ствола мозга мышей первой группы, почти вдвое ниже, чем у фермента, выделенного из мозга животных второй группы. Известно, что в общем случае эти две характеристики зависят от значения каталитической константы, отражающей эффективность фермента как катализатора, - чем более эффективным катализатором является фермент, тем выше значения его K_M и V_{max} (Фершт, 1980).

Таблица 2 Значения максимальной активности (V_{max}) и константы Михаэлиса (K_M) ТПГ из мозга мышей

Линии	V_{max} (пмоль/мг/мин)	$K_M \times 10^4$ М
BALB/c	18.3 ± 0.9	0.9 ± 0.1
CC57BR	24.3 ± 1.5	1.2 ± 0.2
CBA	32.4 ± 3.8	2.3 ± 0.4
DD	35.5 ± 2.2	2.2 ± 0.3
C57BL/6	36.8 ± 2.0	1.8 ± 0.2
C3H/He	38.9 ± 3.3	2.1 ± 0.3

С помощью гибридо-логического анализа, проведенного на двух контрастных линиях BALB/c и C57BL/6, показано промежуточное наследование активности фермента (Рис. 1). Отсутствие реципрокных различий у гибридов первого поколения свидетельствует о контроле данного признака аутосомными генами.

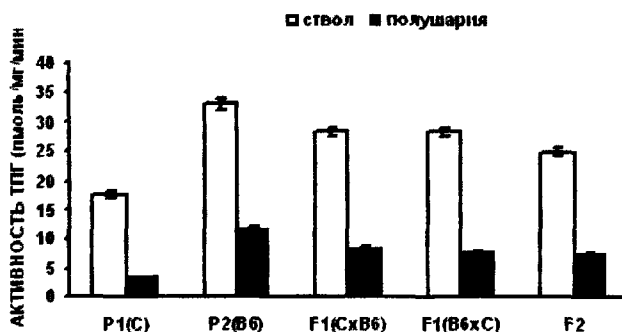


Рис. 1. Активность триптофангидроксилазы (ТПГ) в стволе и полушариях мозга мышей линий BALB/c (C), C57BL/6 (B6) и гибридов

Нами совместно с Э. Х. Гинзбургом проведена статистическая проверка гипотезы о контроле активности фермента в мозге одним двухаллельным локусом. Эта проверка основана на оценке согласия эмпирических распределений активности ТПГ в стволе и полушариях (Рис 2) мозга с теоретическими распределениями, построенными на основании проверяемой гипотезы (Гинзбург, 1984). Материал представлен тремя изогенными совокупностями P_1 (BALB/c), F_1 и P_2 (C57BL/6), которые соответствуют трем генотипам - двум гомозиготам и одной гетерозиготе. Фенотипическое проявление признака - активность ТПГ - задано тремя гауссовскими модификационными распределениями с некоторыми генотипическими значениями и дисперсиями. Совокупность F_2 является генетически гетерогенной и состоит из особей трех генотипов в соответствии с классическим Менделевским соотношением (1:2:1).

Поэтому распределение фенотипов в F_2 представляет суперпозицию модификационных распределений для трех генотипов, взятых с коэффициентами 0,25, 0,5 и 0,25

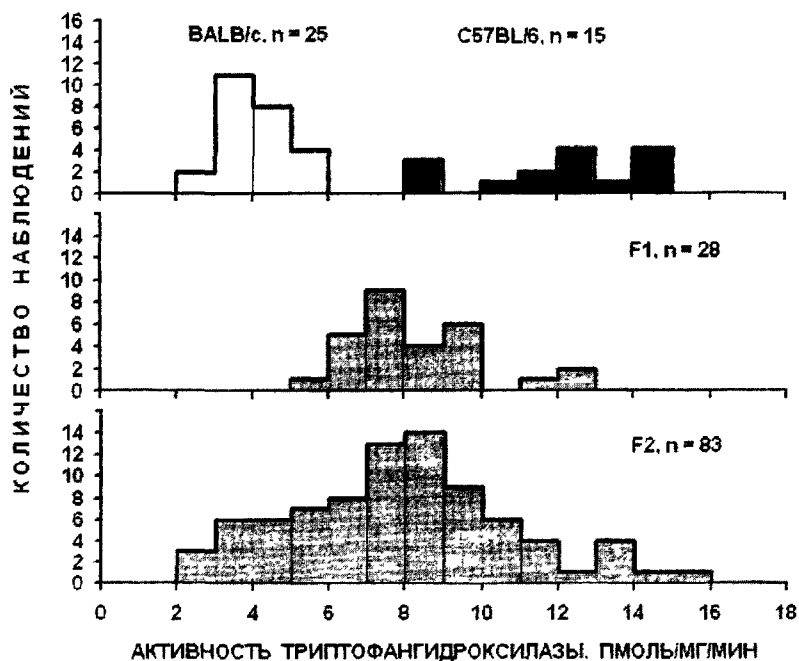


Рис.2. Распределение активности триптофангидроксилазы (ТПГ) в полушариях мозга мышей линий BALB/c, C57BL/6 и их гибридов.

Гипотеза проверялась в два этапа. На первом этапе оценками генотипических значений и дисперсий служили средние и дисперсии признаков у P_1 , F_1 и P_2 (Табл.3, вариант 1). На втором этапе выбирались такие оценки, которые минимизировали функцию χ^2 , построенную на всех четырех распределениях (оценки минимума χ^2) (Табл.3, вариант 2). Оказалось, что при использовании более корректных оценок минимума χ^2 гипотеза о моногенном наследовании согласуется с эмпирическим материалом. Следует отметить, что уточненными оказались только оценки дисперсий, оценки генотипических значений не изменились (Табл.3). Полученный результат означает, что исходя из имеющихся данных и используемого критерия, мы не можем отвергнуть эту гипотезу, а, следовательно, на данном этапе можем использовать ее как рабочую гипотезу.

Таблица 3 Статистическая оценка параметров гипотезы о моногенном контроле активности ТПГ в стволе и полушариях мозга мышей и значения критерия согласия χ^2 в гибридологическом анализе

Варианты	Оцениваемые параметры						χ^2	df	P
	BALB/c		F ₁		C57BL/6				
	γ_1	σ_1^2	γ_2	σ_2^2	γ_3	σ_3^2			
СТВОЛ									
1	175	70	280	184	330	320	390	6	<0.01
2	174	84	277	79	303	355	92	6	>0.1
ПОЛУШАРИЯ									
1	34	07	78	31	114	47	123	3	<0.01
2	34	31	75	12	117	63	08	3	>0.8

Условные обозначения γ - генотипические значения, σ^2 - дисперсии

Для проверки влияния C1473G полиморфизма в гене *trh2* на активность фермента в мозге было изучено распределение аллелей 1473C и 1473G у 10 инбредных линий мышей. Установлено, что 7 из исследованных линий мышей (C57BL/6, CBA, C3H/He, AKR, DD, PT и YT) были гомозиготами по 1473C аллелю, тогда как три линии (BALB/c, A/He и CC57BR) - гомозиготами по 1473G аллелю (Рис.3).

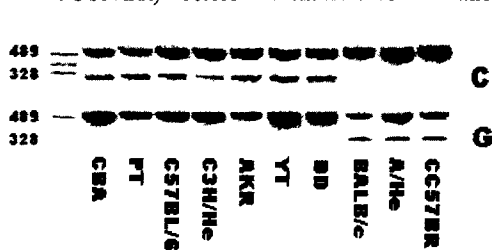


Рис.3. Распределение C1473G полиморфизма в гене *trh2* у мышей 10 инбредных линий. Яркие верхние полосы, присутствующие у всех линий - ПЦР продукты ДНК мыши с контрольными праймерами. Нижние более слабые полосы - продукты ПЦР с праймерами, специфическими для 1473C (C) или 1473G (G) аллелей.

мышей определяются в основном C1473G полиморфизмом в 11-ом экзоне гена фермента. Мыши линии BALB/c являются гомозиготными по 1473G аллелю, в то время как животные линии C57BL/6 - гомозиготны по 1473C аллелю. Следовательно, C1473G полиморфизм определяет моногенное наследование активности фермента в гибридологическом анализе, включающем эти линии и их гибриды (Табл.3). Данный полиморфизм расположен в домене фермента, регулирующем его четвертичную структуру, которая влияет на активность фермента. Изменчивость в активности фермента, связанная с C1473G полиморфизмом, была названа нами конститутивной, поскольку она обусловлена существенными изменениями структуры (конституции) фермента.

Конститутивная изменчивость является главным, но не единственным, источником генетически детерминированной вариальности активности ТПГ в мозге мышей. Действительно, с помощью дисперсионного анализа было обнаружено существенное генетически детерминированное разнообразие в активности фермента у мышей, гомозиготных по 1473C аллелю ($F_{8,94} = 8.82$, $p < 0.001$). Другим механизмом, определяющим активность фермента, является обратимое фосфорилирование молекул

фермента кальций, кальмодулин зависимой протеинкиназой II в присутствии АТФ и ионов кальция. Для выяснения роли обратимого фосфорилирования в механизме генетически детерминированных различий в активности ТПГ в мозге мышей изучалось влияние трехминутной преинкубации при 37°C с АТФ и ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} (фосфорилирование) или с экзогенной щелочной фосфатазой (дефосфорилирование) на активность ТПГ, выделенную из ствола головного мозга мышей линий BALB/c с низкой и C57BL/6 - с высокой активностью фермента.

Преинкубация фермента у мышей линии BALB/c в фосфорилирующих условиях не вызывает изменения его активности. В то же время, преинкубация ТПГ у мышей этой линии со щелочной фосфатазой вызвала достоверное снижение его активности (Рис 4, $p < 0.001$). Иными словами, в стволе головного мозга мышей BALB/c ТПГ уже полностью фосфорилирована. Иная картина наблюдается при изучении фосфорилирования ТПГ из ствола головного мозга мышей линии C57BL/6. Преинкубация фермента в фосфорилирующих условиях заметно повышает ($p < 0.01$), тогда как преинкубация со щелочной фосфатазой – снижает активность ТПГ (Рис 4, $p < 0.01$). Следовательно, ТПГ в мозге мышей линии C57BL/6 в норме не фосфорилирована полностью и ее активность может быть изменена с помощью фосфорилирования/дефосфорилирования фермента.

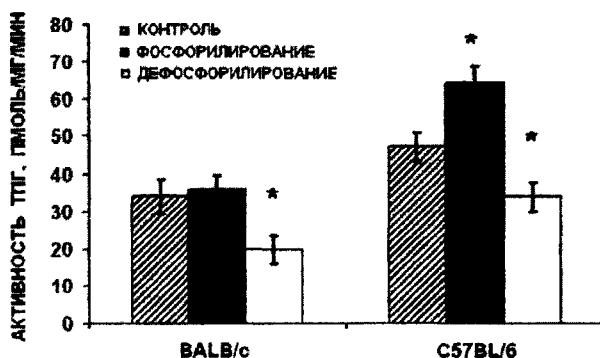


Рис.4. Влияние фосфорилирования и дефосфорилирования на активность ТПГ из ствола головного мозга мышей линий BALB/c и C57BL/6. * $p < 0.01$ по сравнению с активностью нативного фермента (контроль).

Изменчивость, обусловленная наследственными факторами, не сцепленными с геном *tph2*, в том числе обратимым фосфорилированием ТПГ, была нами названа регуляторной изменчивостью.

Одним из ключевых положений исследования является экспериментальная демонстрация двух источников наследственной изменчивости активности ТПГ в мозге конститутивной, связанной с геном *tph2*, и регуляторной, обусловленной другими генами. Основной характеристикой конститутивной изменчивости ТПГ является то, что она синхронно проявляется во всех структурах мозга. Регуляторная изменчивость носит локальный характер и затрагивает, обычно, один из отделов мозга.

Дальнейшая часть работы посвящена выявлению связи конститутивной и регуляторной изменчивости активности ТПП в мозге с наследственно детерминированным полиморфизмом по выраженности таких форм защитного поведения как защита территории (межсамцовая агрессия), вызванная страхом агрессия на человека, реакции активного избегания и реакции замирания (каталепсии).

Ассоциация активности ТПП с полиморфизмом по выраженности межсамцовой агрессии у мышей. У самцов девяти инбредных линий определены как интенсивность, так и уровень спонтанной агрессивности (Рис.5). Отмечены существенные межлинейные различия по числу нападений на чужака ($F_{8,134} = 6.52$, $p < 0.001$) и по проценту агрессивных животных в линии ($F_{8,414} = 6.9$, $p < 0.001$). Наивысшая интенсивность уже возникшей агрессии отмечена для мышей линий C57BL/6 и YТ. Эти животные, начав драться, нападают на чужака в среднем 9 раз за 2 мин теста. Наименьшей агрессивностью характеризовались мыши линии DBA/1, они нападали на чужака в среднем 3 раза за 2 минуты (Рис.5). По уровню агрессивности все 9 исследованных линий можно разделить на две группы. В линиях DBA/1, CC57BR, AKR, C3H/He и C57BL/6 половина самцов нападают на подсаженного чужака, в то время как в линиях BALB/c, A/He, DD и YТ агрессивным является каждый пятый самец (Рис.5).

Не было отмечено межлинейной (генотипической) корреляции между числом драк за время наблюдения и процентом агрессивных животных в линии ($r = -0.01$, $p > 0.05$). Действительно, несмотря на низкую интенсивность агрессии, характерную для животных линий DBA/1 и CC57BR, уровень их агрессивности высок – на чужака нападало около половины животных этих линий. Линии C57BL/6 и YТ, сходные по выраженности уже возникшего агрессивного поведения, резко отличаются по его уровню: в линии C57BL/6 на чужака нападало вдвое больше самцов, чем в линии YТ. Следовательно, интенсивность и уровень характеризуют разные стороны межсамцовой агрессии мышей. Уровень характеризует высоту порога агрессивной реакции, вспыльчивость мышей данной линии, тогда как интенсивность – выраженность начавшего агрессивного поведения.

Изучение закономерности наследования интенсивности и уровня агрессивности проводили на двух контрастных по этой форме поведения линиях – BALB/c (C), характеризующейся сравнительно невысокими величинами интенсивности и уровня спонтанной агрессивности, и C57BL/6 (B6), одной из наиболее агрессивных среди изученных линий, а также на их прямых (СхВ6), обратных (В6хС) гибридах F_1 и бэккроссах (СхВ6)хС (Табл.4). Оказалось, что интенсивность агрессии, характеризующая средним числом драк, на одного дерущегося самца, у реципрокных гибридов F_1 не различалась ($F_{1,71} = 0.18$, $p > 0.05$). Уровень спонтанной агрессивности у этих гибридов также сходен ($\chi^2 = 3.65$, $p > 0.05$). Поэтому при дальнейшем статистическом анализе они были объединены как реципрокные гибриды F_1 , характеризующиеся средним числом драк (5.77 ± 0.45) и уровнем спонтанной агрессивности, равным 70%.

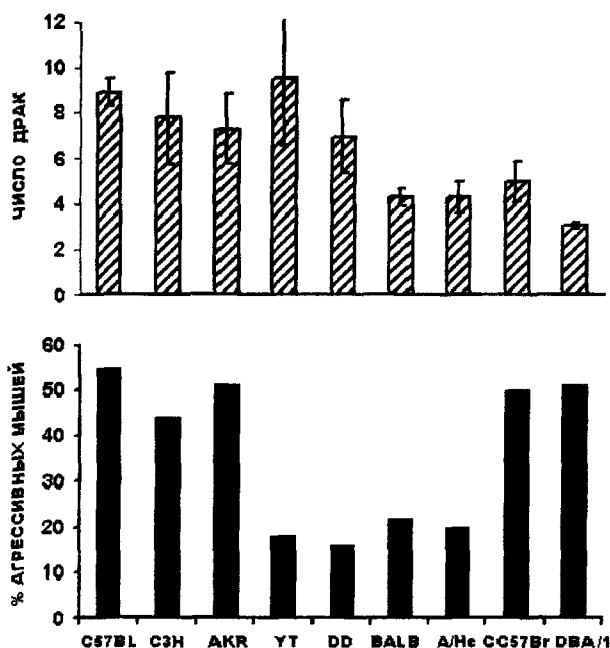


Рис.5. Интенсивность агрессии (число драк) и уровень агрессивности (% агрессивных мышей) самцов мышей 9 инбредных линий.

Таблица 4 Интенсивность и уровень агрессивности самцов мышей линий BALB/c (C), C57BL/6(B6) и их гибридов

Генотип	Число животных	Число драк	% агрессивных мышей
BALB/c	101	39 ± 0.6	21
C57BL/6	52	89 ± 0.6	55
F1(CxB6)	46	56 ± 0.6	61
F1(B6xC)	27	60 ± 0.7	85
BC(CxB6)xC	75	51 ± 0.5	55

Установлено, что уровень спонтанной агрессивности у животных линии BALB/c существенно ниже по сравнению с таковым у мышей линии C57BL/6 ($\chi^2 = 17.3$, $p < 0.001$), реципрокных гибридов F₁ ($\chi^2 = 40.1$, $p < 0.001$) и бэккроссов ($\chi^2 = 20.2$, $p < 0.001$). В то же время, уровень агрессивности у животных линии C57BL/6 не отличался достоверно от такового у гибридов первого поколения и бэккроссов. Иными словами, доминирует высокий уровень агрессивности. Иное наблюдается при сравнении родительских линий и их гибридов по интенсивности спонтанной агрессии. Число нападений на чужака у реципрокных гибридов первого поколения составляет 5.74 ± 0.47 и очень близко к средней арифметической значений признака у родительских линий (равной 5.6, $p > 0.05$). В то же время, интенсивность драк у F₁ достоверно выше по

сравнению с BALB/c ($F_{112} = 5.61$, $p < 0.001$) и значительно ниже по сравнению с C57BL/6 ($F_{123} = 17.7$, $p < 0.001$). Следовательно, наблюдается промежуточное наследование числа драк, отражающего интенсивность уже начавшегося агрессивного поведения.

В таблице 5 представлены полиморфные варианты гена *trh2*, а также значения активности ТПГ в стволе головного мозга, интенсивности агрессии и уровня агрессивности у 8 инбредных линий мышей. Обнаружена высокая межлинейная корреляция между активностью ТПГ и числом драк ($r = 0.89$, $p < 0.01$). Дисперсионный анализ показал существенный вклад C1473G полиморфизма в гене *trh2* в проявление интенсивности спонтанной агрессии: число нападений на чужака у мышей с генотипом C/C составляет 8.4 ± 0.5 , а с генотипом G/G существенно меньше 4.4 ± 0.4 ($F_{16} = 20.0$, $p < 0.01$). В то же время, не выявлена корреляция между активностью ТПГ в стволе мозга и уровнем агрессивности ($r = 0.35$, $p > 0.05$). Влияние полиморфизма в гене *trh2* на процент агрессивных животных также не обнаружено ($F_{16} = 0.2$, $p > 0.05$).

Таблица 5. Полиморфные варианты гена *trh2*, значения активности ТПГ в стволе мозга, числа драк и процента агрессивных самцов мышей 8 инбредных линий

Линия	<i>trh2</i>	Активность ТПГ (пмоль/ мг/мин)	Число драк	% агрессивных мышей
CC57BR	G/G	15.0 ± 0.9	5.0 ± 0.9	50
A/He	G/G	16.8 ± 0.5	4.3 ± 0.7	20
BALB/c	G/G	17.5 ± 0.5	4.3 ± 0.4	22
DD	C/C	25.1 ± 1.1	7.0 ± 1.6	16
YT	C/C	25.7 ± 1.2	9.5 ± 2.9	18
AKR	C/C	26.0 ± 1.0	7.3 ± 1.5	51
C3H/He	C/C	27.7 ± 1.2	7.8 ± 2.0	44
C57BL/6	C/C	32.0 ± 0.8	8.9 ± 0.6	55

Таким образом, конститутивная изменчивость активности ТПГ в мозге, обусловленная C1473G полиморфизмом, ассоциирована с наследственной вариабельностью интенсивности межсамцовой агрессии мышей. Не обнаружено ассоциации активности ТПГ с уровнем агрессивности, что является еще одним доказательством того, что интенсивность и уровень агрессии контролируются разными генетическими и молекулярными механизмами.

Активность ТПГ в мозге животных, различающихся по выраженности агрессии на человека. Многие дикие животные испытывают естественный страх перед человеком, стремятся избежать контакта с ним, а когда бегство невозможно, яростно себя защищают. Такой вид агрессии можно рассматривать как разновидность агрессии, вызванной страхом (Куликов, Попова, 1991). Длительный процесс одомашивания значительно подавляет у животного чувство страха перед человеком (Трут, 1978). Имеются многочисленные доказательства того, что процесс одомашивания - глобальное биологическое явление, включающее перестройку поведения на генетическом уровне. Потомки одомашнированных особей уже при первом контакте с человеком демонстрируют менее выраженное агрессивное поведение по сравнению с их дикими предками (Беляев, 1972; Трут, 1978). Согласно гипотезе, сформулированной Н.К. Поповой (1980), в ходе процесса одомашивания происходит отбор животных с определенным типом функционирования серотониновой системы мозга. В работе изучено влияние одомашивания серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков на активность ТПГ головного мозга.

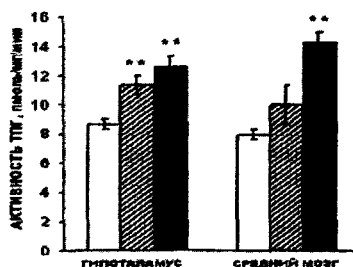


Рис.6. Активность ТПГ в гипоталамусе и среднем мозге агрессивных (белые столбики), диких (штрикованные столбики) и ручных (черные столбики) серебристо-черных лисиц.

** $p < 0.01$ по сравнению с агрессивными

Наименьшая активность фермента обнаружена в гипоталамусе и среднем мозге у лисиц из популяции, селекционируемой в течение 20 поколений на высокую агрессию на человека (агрессивные), а наибольшая – у животных, прошедших 20 поколений селекции на отсутствие агрессии на человека (доместичированные) (Рис 6). Различия в активности ТПГ между агрессивными и доместичированными животными были высоко достоверны в среднем мозге ($t_0 = 4.4$, $p < 0.01$) и гипоталамусе ($t_{11} = 3.6$, $p < 0.01$). Особи из неселекционируемой совхозной популяции (дикие), характеризующиеся трусливо-оборонительным типом поведения (60%), имели промежуточное значение активности фермента в среднем мозге и гипоталамусе.

Не выявлено достоверных различий по максимальной активности ТПГ в среднем мозге у исследуемых групп лисиц. Однако наблюдается значительное снижение константы Михаэлиса фермента у ручных животных по сравнению с дикими и агрессивными лисицами (Табл 6). Поскольку величина константы Михаэлиса обратно пропорциональна сродству фермента к субстрату (триптофану), можно утверждать, что в процессе доместикации происходит увеличение сродства ТПГ к триптофану. Увеличение сродства и является причиной высокой активности ТПГ в мозге у доместичированных животных. Действительно, при низкой концентрации триптофана в мозге скорость синтеза серотонина будет в значительной степени определяться сродством ТПГ к триптофану. Это увеличение сродства ТПГ к триптофану является естественной причиной наблюдаемого увеличения уровня серотонина в мозге у доместичированных животных по сравнению с агрессивными. Наиболее вероятной причиной уменьшения константы Михаэлиса ТПГ в среднем мозге ручных лисиц может быть обратимое фосфорилирование фермента. Действительно, фосфорилирование ТПГ вызывает резкое уменьшение константы Михаэлиса (Boadle-Biber, Phan, 1986).

Таблица 6. Значения максимальной активности (V_{max}) и константы Михаэлиса (K_M) ТПГ из среднего мозга различающихся по выраженности агрессии на человека серебристо-черных лисиц

Группа	V_{max} (пмоль/мг/мин)	$K_M \times 10^6$ М
Ручные	81 ± 0.4	$100 \pm 20^{**}$
Дикие	118 ± 0.9	72.0 ± 21.0
Агрессивные	97 ± 1.1	84.0 ± 24.0

** $p < 0.01$ по сравнению с агрессивными и дикими

В эксперименте, проведенном на серых крысах-пасюках, прошедших 24-27 поколений на высокую агрессию (агрессивные) и на отсутствие агрессии (ручные) на человека, также было показано увеличение активности ТПГ в среднем мозге ручных животных по сравнению с агрессивными ($t = 3.6$, $p < 0.01$, Рис 7). Однако в гипоталамусе активность ТПГ у ручных и агрессивных пасюков не различалась. Увеличение активности фермента в среднем мозге можно рассматривать как наиболее вероятную

причину повышенного содержания серотонина в мозге ручных животных по сравнению с агрессивными (Naumenko et al., 1989; Porova et al., 1991)



Рис.7. Активность ТПГ в гипоталамусе и среднем мозге агрессивных (белые столбики) и ручных (черные столбики) серых крыс-пасюков.

* $p < 0.01$ по сравнению с агрессивными.

Таким образом, в процессе одомашнивания животных двух разных видов серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков – наблюдается гомологичное увеличение активности ключевого фермента биосинтеза серотонина – ТПГ – в среднем мозге у животных с наследственно запрограммированным дружелюбным типом поведения. Это увеличение активности ТПГ, по-видимому, является основной причиной ранее выявленного возрастания уровня серотонина в ряде отделов мозга у ручных лисиц и крыс-пасюков.

Судя по тому, что увеличение активности ТПГ не велико, проявляется локально в среднем мозге и, по крайней мере, у лисиц связано с изменением сродства фермента, можно предположить, что оно носит скорее регуляторный характер и связано с накоплением в ходе процесса одомашнивания аллелей генов-модификаторов, активирующих ТПГ. Отбор на высокую агрессию на человека, напротив закрепляет аллели, снижающие активность фермента.

Активность ТПГ в мозге крыс, различающихся по выраженности реакции активного избегания. Активное избегание является самым распространенным и эффективным видом защиты от неблагоприятных природных факторов, хищников и агрессивных сородичей (Dixon, 1998). Реакция активного избегания лежит в основе большинства лабораторных тестов на тревожность (тест приподнятого крестообразного лабиринта) и на депрессию (выученная беспомощность) (Willner, 1990).

Классической моделью для изучения генетических и молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию реакции активного избегания, являются линии Римских крыс, селекционированные на высокую (RHA) и низкую (RLA) выраженность реакции избегания в челночной камере. У крыс линии RLA очень трудно выработать условную реакцию избегания удара электрического тока, тогда как крысы RHA очень быстро обучаются покидать отсек челночной камеры сразу после предъявления условного сигнала. В работе мы исследовали поведение в тестах приподнятого крестообразного лабиринта и свет/темнота, которые считаются наиболее распространенными тестами на тревожность, а также активность ТПГ в структурах мозга у крыс линий RHA и RLA.

Крысы линии RHA реже заходили в открытые рукава приподнятого крестообразного лабиринта ($F_{1,24} = 7.2$, $p < 0.05$) и проводили там меньше времени ($F_{1,24} = 8.4$, $p < 0.01$) по сравнению с животными линии RLA (Рис 8). Сходная картина наблюдалась в тесте свет/темнота. Будучи помещенные в светлый отсек животные этих линий одинаково быстро (в течение 10-15 с) перебегали в темный отсек. Различий между крысами RHA и RLA по латентному времени перемещения в темный отсек не обнаружено. Однако крысы RHA, попав в темный отсек, оставались в нем в течение всего теста и очень редко покидали его. В то же время крысы RLA достоверно чаще покидали темный отсек ($F_{1,24} = 11.2$, $p < 0.001$) и более длительное время пребывали в светлом отсеке ($F_{1,24} = 9.2$, $p < 0.01$) (Рис 9).

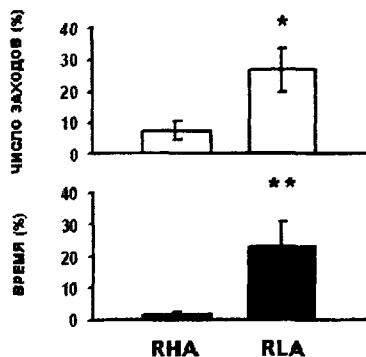


Рис.8. Число заходов в открытые рукава приподнятого крестообразного лабиринта и время пребывания там у крыс RHA и RLA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с RHA.

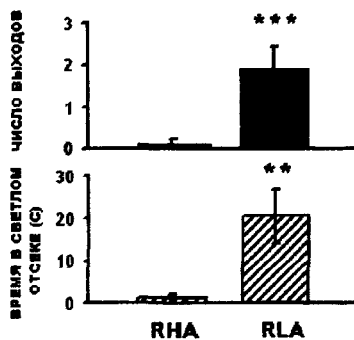


Рис.9. Число выходов в светлый отсек и время пребывания там в тесте свет/темнота у крыс RHA и RLA. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ по сравнению с RHA.

Полученные результаты хорошо согласуются с ранее опубликованными данными (Chaouloff et al., 1994). Наблюдаемое увеличение числа заходов в открытые рукава лабиринта и в светлый отсек у крыс RLA не является следствием их повышенной двигательной активности. Напротив, крысы RLA менее подвижны по сравнению с животными RHA (Castanon et al., 1992). Возможной интерпретацией полученных данных является предположение, что высокое число заходов в открытые рукава и светлый отсек и времени пребывания там является проявлением отсутствия нормальной защитной реакции избегания у крыс RLA. Действительно, открытые и освещенные пространства вызывают нормальную реакцию страха у крыс и животных RHL с нормально выраженной защитной реакцией избегать появляться в открытых рукавах крестообразного лабиринта и в светлом отсеке.

Значения $V_{\max}$ и K_M фермента в коре, гиппокампе и гипоталамусе не различались у животных RHA и RLA ($p > 0.05$, Табл. 7). В то же время, максимальная активность ТПГ в среднем мозге крыс линии RHA существенно выше, чем у RLA ($F_{1,10} = 21.6$, $p < 0.001$). Однако константа Михаэлиса ТПГ у крыс RHA также превышала таковую у RLA ($F_{1,10} = 4.9$, $p < 0.05$). В настоящее время не ясен молекулярный механизм этого генетически детерминированного снижения активности ТПГ в среднем мозге крыс RLA. Маловероятно, что оно связано с изменением в степени его фосфорилирования, поскольку уменьшение максимальной активности фермента сопровождается увеличением его сродства к субстрату. Вероятнее всего, в ходе селекции наблюдается изменение наследственных механизмов, регулирующих экспрессию гена *tpb2* локально в среднем мозге. О регуляторном характере изменчивости активности ТПГ в среднем мозге крыс свидетельствуют следующие факты: 1) слабая выраженность этих изменений, 2) их локализация исключительно средним мозгом и 3) длительная изоляция вызывает значительное повышение активности ТПГ в среднем мозге у RLA крыс (Kulikov et al., 1995).

Таблица 7 Значения максимальной активности (V_{max} , пмоль /мг/мин) и константы Михаэлиса (K_M , $\times 10^{-6}$ М) ТПГ в отделах мозга крыс RHA и RLA.

Структура	Параметр	RHA	RLA
Средний мозг	V_{max}	244 ± 14	$169 \pm 8^{***}$
	K_M	95 ± 14	$61 \pm 6^*$
Кора	V_{max}	124 ± 10	120 ± 10
	K_M	158 ± 21	135 ± 14
Гиппокамп	V_{max}	96 ± 12	97 ± 3
	K_M	198 ± 25	172 ± 28
Гипоталамус	V_{max}	163 ± 11	135 ± 9
	K_M	245 ± 20	244 ± 18

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с RHA

Таким образом, в результате селекции крыс на отсутствие реакции активного избегания происходит увеличение числа заходов в открытые рукава крестообразного лабиринта и в светлый отсек в тесте свет/темнота. Эти изменения в поведении не связаны с каким-либо анксиолитическим эффектом селекции на уменьшение реакции избегания, а, скорее всего, являются проявлением отсутствия реакции активного избегания у крыс RLA. В процессе отбора на сниженную реакцию активного избегания наблюдается накопление аллелей генов-модификаторов, снижающих активность ТПГ в среднем мозге крыс RLA по сравнению с RHA.

Следует отметить, что подобная положительная ассоциация реакции активного избегания с активностью ТПГ в среднем мозге была отмечена у крыс линий SHR и Lewis (Kulikov et al., 1997).

Генетическая ассоциация ТПГ с выраженностью реакции замирания (катаlepsии). Катаlepsия (тоническая неподвижность, животный гипноз, мнимая смерть) рассматривается как эффективная пассивно-оборонительная реакция в ответ на внешнюю угрозу со стороны хищника или агрессивного сородича (Попова, 2004, Dixon, 1998). Действительно, затаивание животного уменьшает вероятность быть обнаруженным хищником и снижает интенсивность атак со стороны агрессивного соперника. В работе исследовалась генетическая регуляция predisposition к катаlepsии у мышей и ассоциация активности ТПГ в мозге с генетически детерминированными различиями в predisposition к катаlepsии у мышей и крыс.

Катаlepsия исследована у мышей 9 инбредных линий и выявлены существенные межлинейные различия по predisposition к реакции замирания ($\chi^2_8 = 40.5$, $p < 0.001$, Рис 10). Катаlepsию невозможно вызвать ни у одного животного линий AKR, C57BL/6, DBA/1 и C57BR. Незначительный процент каталептиков (10-20%) обнаружен в линиях DD, BALB/c, A/He и C3H/He. И только в одной из исследованных линий, CBA, обнаружено 56% животных-каталептиков, время замирания которых превышало минуту.

Не выявлено половых различий в проявлении катаlepsии у мышей CBA ($\chi^2 = 1.94$, $p > 0.05$) и у мышей AKR (катаlepsии не было обнаружено ни у одного самца и ни у одной самки AKR). Поэтому при изучении генетического контроля predisposition к катаlepsии данные, полученные на самках и самцах, объединялись.

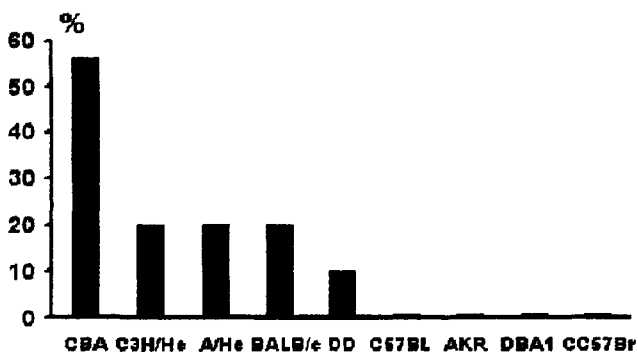


Рис.10. Процент каталептиков у мышей 9 инбредных линий.

У мышей линии CBA число каталептиков в потомстве родителей-каталептиков (57% самцов и 75% самок) не отличался от такового в потомстве родителей-некаталептиков (50% самцов, $t_{19} = 0.26$, $p > 0.05$ и 78% самок, $t_{25} = 0.27$, $p > 0.05$). Этот результат служит доказательством генетической однородности линии CBA. Процент каталептиков в этой линии отражает генетически детерминированную пенетрантность признака.

Поскольку каталепсия является пассивно-оборонительной реакцией, вовлеченной в механизм защиты от нападения агрессивного сородича во внутривидовых взаимоотношениях, связанных с установлением иерархии, можно предположить, что на проявление каталепсии будет существенно влиять индивидуальный опыт социальных взаимоотношений. Мы, совместно с Н.Н. Кудрявцевой, исследовали влияние опыта побед и поражений в разработанной ею модели сенсорного контакта на выраженность каталепсии у самцов CBA. В клетках, разделенных пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, содержались по два самца в условиях постоянного сенсорного контакта. При ежедневном (в течение 15 дней) удалении перегородки на 10 мин происходили агонистические столкновения, в которых у побеждавших животных вырабатывался агрессивный тип поведения, а у проигравших – субмиссивный (подчиненный) тип. Контролем служили мыши, рассаживаемые поодиночке для снятия группового эффекта. Было установлено, что мыши с субмиссивным типом поведения проявляли хорошо выраженную каталепсию и не отличались от контроля, тогда как ни у одного из 12 самцов с выраженным агрессивным типом поведения не удалось вызвать реакции замирания ($\chi^2 = 11.5$, $p < 0.001$).

Следующим этапом исследования было изучение закономерностей наследования предрасположенности к шипковой каталепсии, проведенное на мышах двух контрастных по данному признаку линий CBA(CB) и AKR(AK), F_1 (CBxAK), F_1 (AKxCB), и F_2 (CBxAK)x(CBxAK).

Таблица 8 Наследование процента каталептиков в гибридологическом анализе

Генотип	Число животных	% каталептиков
СВА	27	56
AKR	26	0
F ₁	70	0
F ₂	106	16

Не было обнаружено ни одного каталептика среди 70 (35 самцов и 35 самок) реципрокных гибридов F₁ (Табл 8), что свидетельствует о рецессивном характере наследования высокой предрасположенности к каталепсии у мышей В то же время, среди 106 мышей F₂ от скрещиваний F₁ было

обнаружено 17 животных каталептиков (Табл 8) С учетом неполной (56%) пенетрантности признака, такое количество каталептиков очень близко к ожидаемому при моногенном контроле предрасположенности к каталепсии ($106 \times 0.56 \times 0.25 = 14.3$, $\chi^2 = 0.64$, $p > 0.05$).

Следующим этапом анализа наследования признака было проведение возвратных скрещиваний самцов-каталептиков из F₂ с самками каталептической линии СВА Семьи отцов-каталептиков оказались однородными по доле каталептиков в них ($\chi^2_3 = 7.8$, $p > 0.05$) Это позволяет предполагать, что все животные-каталептики в F₂ изогенны по признаку Таким образом, полученные результаты свидетельствуют 1) о полной рецессивности признака в F₁, 2) о расщеплении 1:3 в F₂ и 3) об изогенности животных-каталептиков в F₂ Это позволяет сформулировать гипотезу о том, что каталепсия наследуется как один аутосомный локус с неполной пенетрантностью

Для проверки данной гипотезы прежде всего необходимо как можно точнее вычислить величину пенетрантности признака. Доля каталептиков в линии СВА, равная 0.56, может служить только ее грубой оценкой, поскольку она сделана на небольшой выборке Разумно использовать для получения более точной оценки пенетрантности данные по числу каталептиков в линии СВА, в F₂, в семьях отцов-каталептиков и отцов-некаталептиков Общее количество животных в эксперименте было 212 В таблице 9 поэтапно представлена процедура вычисления частот генотипов и фенотипов, исходя из гипотезы о моногенном контроле признака Полученная методом наибольшего правдоподобия уточненная оценка пенетрантности равна 0.54, что лишь незначительно отличается от грубой оценки Ожидаемые численности каталептиков в исследованных группах хорошо согласуются с их эмпирическими значениями, поэтому гипотеза о моногенном наследовании каталепсии не отвергается

Одиннадцать лет спустя гибридологический анализ наследования каталепсии был повторен, но с использованием бэккроссов, полученных при скрещивании гибридов первого поколения между AKR и СВА на СВА Получено 296 бэккроссов (161 самец и 135 самок), из которых 79 (26.7%) проявляли выраженную каталепсию, что очень хорошо согласуется с расщеплением 1:1 при пенетрантности признака равной 51% ($\chi^2 = 0.35$, $p > 0.05$) Следовательно, на основании имеющихся экспериментальных данных можно с высокой вероятностью утверждать, что аномально высокая предрасположенность к каталепсии, наблюдаемая у мышей линии СВА, контролируется одним аутосомным геном, рецессивные аллели которого (высокая предрасположенность) присутствуют у животных линии СВА

Таблица 9 Проверка гипотезы о моногенном наследовании каталепсии у мышей по данным гибридологического анализа

Параметр	СВА		F ₂		СВАхF ₂ /К		СВА х F ₂ /Н	
Генотипы	c/c	c/c	c/+	+/+	c/c	c/c	c/+	c/+
Частоты	1	0 25	0 5	0 25	1	(2-W)/4-W	2/4-W	2/4-W
генотипов								
Фенотипы	К	Н	К	Н	К	Н	К	Н
Частоты	W	1-W	W/4	1-W/4	W	1-W	(2-W)хW/4-W	4-3W+W ² /4-W
фенотипов								
Эмпирические численности	15	12	17	89	17	21	12	29
Ожидаемые численности	15	12	14	92	21	17	10	31

$W = 0.54$, $\chi^2 = 2.9$, $df = 3$, $p > 0.05$

Условные обозначения c – аллель каталепсии, + – аллель нормального поведения, W – пенетрантность, К – каталептики, Н – некаталептики

На следующем этапе исследования мы картировали главный ген, регулирующий предрасположенность к каталепсии, с помощью набора полиморфных микросателлитных маркеров. Поскольку информации о размерах микросателлитных маркеров у линии СВА не имелось в существующих базах данных, на первом этапе исследования был проведен поиск маркеров, различающихся по размеру у мышей СВА и AKR. Для этого ДНК мышей этих линий была генотипирована с 256 парами праймеров, покрывающих все 19 аутосом мыши, и было выявлено 93 (37%) полиморфных маркеров. Для картирования гена каталепсии, из этих 93 полиморфных маркеров было выбрано 65 равномерно покрывающих 19 аутосом (Рис 11). Далее 77 бэккроссов ВС(СВх(СВхАК)), проявляющих каталепсию, были генотипированы с этими 65 полиморфными маркерами.

Согласно моногенной гипотезе, сформулированной выше, каталепсия будет проявляться только у бэккроссов гомозиготных по аллелю каталепсии, полученному от СВА. При тесном сцеплении между геном каталепсии и полиморфным микросателлитным маркером среди бэккроссов-каталептиков число животных, гомозиготных по СВА-аллелю маркера, будет достоверно превышать число гетерозиготных по этому маркеру особей. Равенство частот гомо- и гетерозигот по маркеру у бэккроссов-каталептиков будет свидетельствовать об отсутствии сцепления. В качестве меры превышения числа гомозигот над числом гетерозигот был выбран стандартный тест χ^2 с одной степенью свободы. Критическое значение χ^2 при уровне значимости, равном 0.05, для проверки гипотезы о сцеплении, скорректированное на число маркеров (равное 65) было 11.3 (Куликов и др., 2003; Куликов, Базовкина, 2003).

Оказалось, что нулевая гипотеза об отсутствии сцепления строго отвергается только для одного маркера D13Mit78 ($\chi^2 = 17.8$, $p < 0.001$), локализованного в теломерном фрагменте (75 сМ) хромосомы 13 (Рис 12). Действительно, из 77 исследованных бэккроссов-каталептиков 57 особей (74%) несли оба аллеля этого маркера, полученные от СВА. Ближкое к критическому значению χ^2 (10.92, $p < 0.058$) было получено для маркера D13Mit76, расположенного на расстоянии 61 сМ на хромосоме 13. Для других маркеров, локализованных проксимальнее на хромосоме 13 или на других 18 аутосомах, значения χ^2 были ниже критического (не более 5.0).

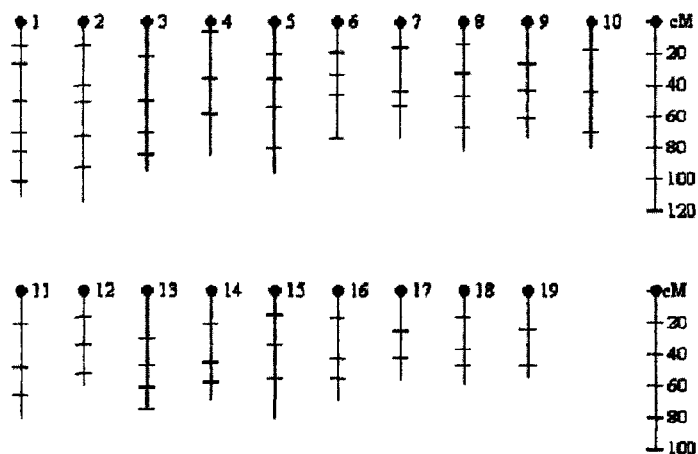


Рис.11. Локализация 65 полиморфных микросателлитных маркеров, выбранных для картирования главного гена, контролирующего предрасположенность к каталепсии, при скрещивании мышей линий CBA и AKR.

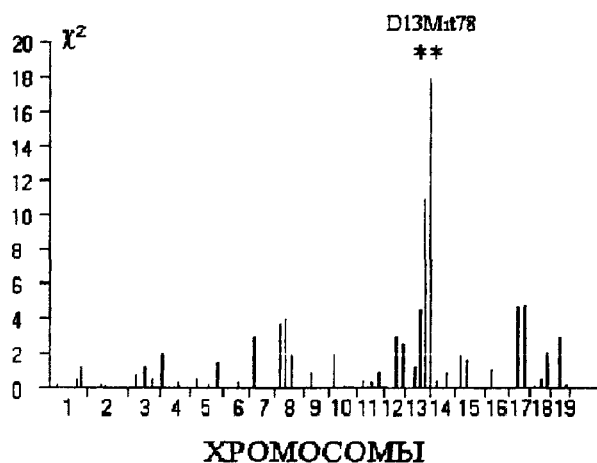


Рис. 12. Значения критерия χ^2 для проверки сцепления предрасположенности к каталепсии с полиморфными микросателлитными маркерами у бэкриссов между линиями CBA и AKR, проявляющих каталепсию. Номера и относительные размеры хромосом отложены по оси абсцисс. ** $p < 0.01$

Полученные данные позволяют выявить и однозначно локализовать в теломерном фрагменте хромосомы 13 главный ген, ответственный за различия по выраженности в предрасположенности к катаlepsии между СВА и АКР. Наличие значительного числа особей, гетерозиготных по маркеру D13Mit78, сцепленному с геном катаlepsии (20 из 77), и, тем не менее, проявляющих выраженную катаlepsию, свидетельствует о том, что имеются и другие гены, вовлеченные в детерминацию катаlepsии, которые и определяют оставшуюся вариабельность признака.

Не было обнаружено сцепления предрасположенности к катаlepsии с маркером D9Mit129, локализованным на расстоянии 2 сМ от гена D₂ рецептора дофамина. Следовательно, генетико-молекулярный механизм регуляции естественной оборонительной реакции, какой является щипковая катаlepsия, отличается от механизма, определяющего чувствительность к катаlepsигену галоперидолу, тесно сцепленную с геном D₂ рецептора (Kanes et al., 1996; Patel, Hitzemann, 1999).

Не выявлено сцепления предрасположенности к катаlepsии с маркером D10Mit103, локализованным на хромосоме 10, на расстоянии 8 сМ от гена *tph2*. Следовательно, маловероятно, что наблюдаемая высокая склонность к реакции катаlepsического замирания у мышей СВА вызвана мутацией в гене *tph2*.

Несмотря на то, что исследования, проведенные на мышах, не обнаружили сцепления предрасположенности к катаlepsии с геном *tph2*, определяющим активность ТПГ в головном мозге, участие фермента в детерминации наследственно обусловленной изменчивости в предрасположенности к катаlepsии исключить нельзя.

Удобной моделью для изучения ассоциации между активностью фермента и наследственной катаlepsией являются крысы линии ГК, селекционированные из популяции крыс Вистар на высокую выраженность катаlepsии. Не было обнаружено различий в активности фермента в среднем мозге и гиппокампе у крыс линии Вистар и животных линии ГК с наследственно обусловленной высокой предрасположенностью к катаlepsии (Рис.13). В то же время, активность ТПГ была достоверно выше в стриатуме крыс ГК (13.6 ± 0.7 пмоль/мг/мин, $F_{1,18} = 6.1$, $p < 0.05$) по сравнению с Вистар (11.2 ± 0.7 пмоль/мг/мин).

Измерение кинетических характеристик ТПГ из мозга крыс ГК и Вистар показало, что наблюдаемое увеличение активности фермента в стриатуме крыс ГК обусловлено снижением величины константы Михаэлиса (K_M) и увеличением сродства фермента к субстрату, а не увеличением его удельной активности (V_{max}) ($F_{1,23} = 4.5$, $p < 0.05$, Табл. 10).

Такое увеличение сродства фермента к субстрату без изменения его максимальной активности позволяет предполагать, что оно обусловлено обратимым фосфорилированием ТПГ в стриатуме ГК. Преинкубация фермента из стриатума ГК с щелочной фосфатазой вызывает снижение его активности с 8.5 ± 1.0 до 4.9 ± 0.5 пикомоль/мг/мин ($t_9 = 4.5$, $p < 0.01$, Рис.14А). Активность ТПГ в стриатуме ГК после дефосфорилирования становится близкой к нативной активности фермента в этой структуре у крыс Вистар (5.8 ± 0.5 пмоль/мг/мин, $F_{1,18} = 3.2$, $p > 0.05$). В то же время, щелочная фосфатаза не влияет на активность фермента в стриатуме крыс Вистар ($t_9 = 1.3$, $p > 0.05$, Рис.14А). Выявлено значительное межлинейное различие в действии щелочной фосфатазы на активность ТПГ в стриатуме ГК и Вистар ($F_{1,18} = 9.0$, $p > 0.01$).



Рис. 13. Активность ТПГ в структурах мозга крыс Вистар (белые столбики) и ГК (черные столбики).
* $p < 0.05$ по сравнению с Вистар.

Таблица 10 Значения $V_{\max}$ и K_m ТПГ из стриатума и среднего мозга Крыс ГК и Вистар

Генотип	Стриатум		Средний мозг	
	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$	K_m
Вистар	18.5 ± 1.4	0.18 ± 0.03	146.7 ± 7.0	0.28 ± 0.03
ГК	15.7 ± 0.7	$0.10 \pm 0.01^*$	137.5 ± 7.4	0.36 ± 0.03

$p < 0.05$ по сравнению с Вистар

Активность ТПГ из стриатума крыс ГК и Вистар при фосфорилирующих условиях увеличивается до одного и того же уровня (14.6 ± 1.4 пмоль/мг/мин у ГК и 14.6 ± 1.0 пмоль/мг/мин у Вистар), но это увеличение более выражено у Вистар, чем у ГК ($F_{1,18} = 4.5$, $p < 0.05$). В то же время, активность фермента из среднего мозга крыс ГК и Вистар увеличивается до одного и того же уровня при фосфорилировании и снижается до близких значений при дефосфорилировании (Рис 14Б). Полученный результат является экспериментальным доказательством ключевой роли обратимого фосфорилирования фермента в механизме наследственно детерминированного увеличения активности ТПГ в стриатуме крыс ГК по сравнению с Вистар.

Другим экспериментальным доказательством связи активности ТПГ с выраженностью каталепсии у крыс является угнетающее влияние необратимого ингибитора ТПГ п-хлорфенилаланина на проявление каталепсии у крыс ГК. Препарат вводили в/б в физиологическом растворе в дозе 300 мг/кг. Контрольной группе крыс вводили физиологический раствор. Длительность каталептического замирания измеряли через 72 часа после введения, затем животных декапитировали и активность фермента определяли в стриатуме и среднем мозге. Однократное введение п-хлорфенилаланина вызывает шестикратное уменьшение времени замирания у крыс ГК по сравнению с животными этой линии, которым ввели физиологический раствор ($F_{1,21} = 90.3$, $p < 0.001$, Рис 15). п-Хлорфенилаланин вызывал значительное снижение активности фермента в стриатуме ($F_{1,21} = 141.6$, $p < 0.001$) и среднем мозге ($F_{1,21} = 44.9$, $p < 0.001$, Рис 15).

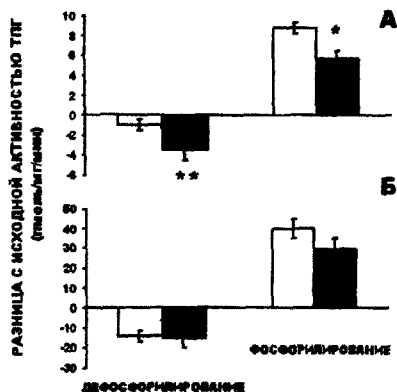


Рис. 14. Изменения в активности ТПГ из стриатума (А) и среднего мозга (Б) крыс Вистар (белые столбики) и ГК (черные столбики) после фосфорилирования и дифосфорилирования. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с Вистар.

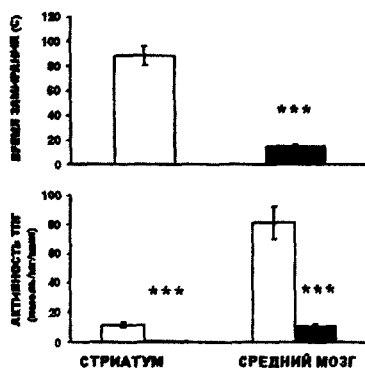


Рис. 15. Влияние однократного введения п-хлорфенилаланина (300 мг/кг, в/б) на время каталептического замирания и активность ТПГ в мозге крыс ГК. Светлые столбики - контроль, черные - п-хлорфенилаланин. *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

Положительная ассоциация наблюдается между предрасположенностью к катаlepsии и активностью ТПГ в стриатуме мышей инбредных линий (Рис.16). Самая высокая активность фермента в этой структуре мозга была выявлена у мышей каталептической линии СВА. При этом активность фермента в стриатуме мышей СВА существенно выше, чем у животных любой из остальных пяти некаталептических линий (Рис.16). Не обнаружена ассоциация предрасположенности к катаlepsии с С1473G полиморфизмом в гене *tph2*. Действительно, из пяти некаталептических линий три были гомозиготны по 1473С аллелю (AKR, C57BL/6, DD), а две – по 1473G аллелю (CC57BR, BALB/c). Это подтверждает обнаруженное нами отсутствие сцепления между катаlepsией и геном *tph2* в гибридологическом анализе.

Данные по влиянию социального статуса в модели сенсорного контакта на активность ТПГ в стриатуме подтверждают ассоциацию предрасположенности к щипковой катаlepsии с высокой активностью фермента в стриатуме (Рис.17). Закрепление у самцов СВА агрессивного типа поведения сопровождается достоверным снижением активности фермента в стриатуме по сравнению с контролем (17.8 ± 0.9 пмоль/мг/мин у контроля и 12.8 ± 1.8 пмоль/мг/мин у агрессивных, $F_{1,18} = 7.5$, $p < 0.05$, Рис.17А). В то же время, активность ТПГ в стриатуме не различалась у контрольных животных и мышей с закрепленным субмиссивным типом поведения (16.8 ± 2.0 пмоль/мг/мин, $F_{1,18} = 0.3$, $p > 0.05$, Рис.17А). Не было обнаружено влияния социального статуса на активность фермента в среднем мозге самцов СВА (Рис.17Б). Как было показано выше, выработка субмиссивного типа поведения не влияла на предрасположенность к катаlepsии, тогда как закрепление агрессивного типа поведения полностью подавляло катаlepsию у самцов СВА. Сопоставляя данные по влиянию социального статуса на активность ТПГ в мозге и на катаlepsию у мышей линии СВА, можно сделать вывод о том, что для проявления катаlepsии у мышей необходима высокая активность ТПГ в стриатуме.

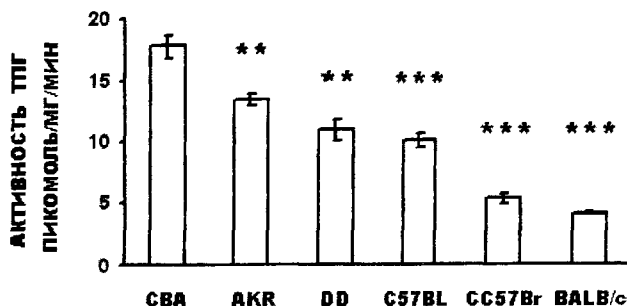


Рис.16. Активность ТПГ в стриатуме у мышей 6 инбредных линий.
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с CBA.

Следующим доказательством положительной связи активности ТПГ в стриатуме с выраженностью каталепсии у мышей служит эксперимент по изучению действия на эти показатели другого ингибитора ТПГ, п-хлорметамфетамина. Через три часа после введения препарата в дозе 15 мг/кг 32 самцам CBA, проявляющим выраженную каталепсию, наблюдается полное подавление каталепсии ($t_{31} = 11.1$, $p < 0.001$, Рис.18). Введение физиологического раствора не влияло на выраженность каталепсии у 15 самцов CBA ($t_{14} = 0.31$, $p > 0.05$). Это подавление каталепсии сопровождается достоверным снижением активности фермента в стриатуме ($F_{1,10} = 5.3$, $p < 0.05$, Рис.18).

Таким образом, выявлена функциональная связь между повышенной активностью ТПГ локально в стриатуме и выраженностью естественной каталепсии у мышей и крыс. Действительно, селекция крыс на выраженность каталепсии сопровождается увеличением активности фермента в стриатуме. У мышей наибольшая активность ТПГ выявлена в стриатуме единственной каталептической линии CBA. Наконец, воздействия, снижающие активность фермента (введение ингибиторов ТПГ, выработка агрессивного поведения у мышей) оказывают выраженный антикаталептический эффект у мышей и крыс.

Установлено, что наследственно детерминированное локальное повышение активности ТПГ в стриатуме у мышей и крыс является регуляторным и обусловлено действием генов-модификаторов. Возникает закономерный вопрос о природе генов-модификаторов, регулирующих активность ТПГ в стриатуме. В области возможной локализации гена, определяющего склонность к каталепсии у мышей, расположен ген, кодирующий 5-HT_{1A} рецептор (58 см). Следовательно, ген 5-HT_{1A} рецептора может рассматриваться как вероятный кандидат на роль гена, регулирующего активность ТПГ. Действительно, рецепторы этого типа являются ауторецепторами и регулируют спайковую активность серотонинового нейрона. Имеются экспериментальные доказательства важной роли рецепторов этого типа в регуляции наследственной каталепсии у крыс (Kulikov et al., 1994) и мышей (Попова и др., 1994). Наследственную регуляцию естественной каталепсии можно представить следующей схемой: изменения в гене 5-HT_{1A} рецептора вызывают локальное увеличение активности ТПГ в стриатуме, которое, в свою очередь, ведет к усилению передачи в серотониновых синапсах в этой структуре, что облегчает развитие реакции замиранья.

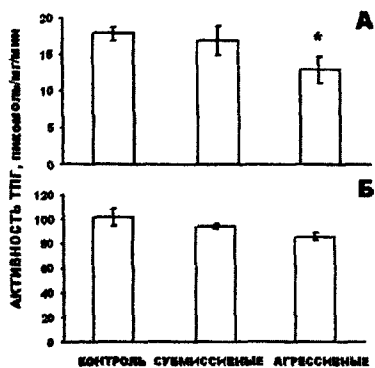


Рис.17. Активность ТПГ в стриатуме (А) и среднем мозге (Б) у самцов СВА с закрепленным субмиссивным и агрессивным типами поведения в социальном контакте. Контроль - животные, содержащиеся в изоляции.

* $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

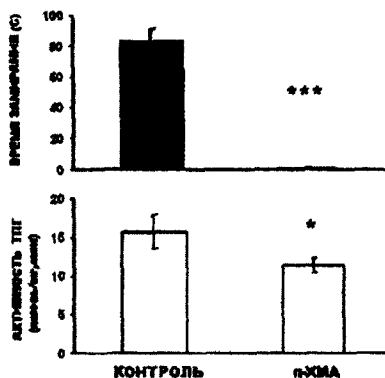


Рис. 18. Влияние п-хлорамфетамина (п-ХМА, 15 мг/кг, в/б) на время замирания и активность ТПГ в стриатуме у самцов СВА. Контроль вводили физиологический раствор. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из важнейших проблем современной генетики поведения, нейрогенетики и нейробиологии является выявление молекулярной цепи декодирования информации, записанной в ДНК, в сложный поведенческий признак. Учитывая ключевую роль медиатора головного мозга серотонина в регуляции многих форм поведения, особое внимание исследователей привлекает связь полиморфизма в гене *tph2* , кодирующем ключевой фермент биосинтеза серотонина триптофангидроксилазу, с проявлением наследственно детерминированных особенностей поведения и психики. В последние два года за рубежом проводятся интенсивные исследования по выявлению генетической ассоциации между полиморфизмом в гене *tph2* и риском депрессивных психозов и суицида у человека. Однако связь полиморфных вариантов в гене *tph2* , используемых в исследованиях этих авторов, с активностью фермента в мозге остается не выясненной, что затрудняет понимание и интерпретацию полученных результатов.

В работе использован принципиально иной, а именно функциональный подход, к решению данной задачи. Сущность этого подхода заключается в изучении генетико-молекулярных механизмов регуляции активности ТПГ в мозге и в выявлении ассоциации наследственного полиморфизма по активности фермента с выраженностью генетически детерминированных особенностей проявления защитного поведения.

Существенным вкладом нашего исследования в нейрогенетику является детальное изучение молекулярного механизма регуляции наследственного разнообразия по активности ТПГ в мозге. Впервые установлено существование двух основных типов наследственной изменчивости активности ТПГ в мозге, названных нами конститутивной и регуляторной. Основным различием этих типов изменчивости является то, что конститутивная обусловлена мутацией самого гена *trh2*, тогда как регуляторная связана с активностью ряда генов-модификаторов. Мы выявили ключевую роль C1473G полиморфизма в 11-ом экзоне гена *trh2* в детерминации активности фермента в мозге мышей. В настоящее время C1473G полиморфизм остается единственным известным примером конститутивной изменчивости активности ТПГ в мозге.

Регуляторный тип изменчивости активности ТПГ в мозге встречается чаще и был нами обнаружен у представителей трех видов млекопитающих – мышей, крыс и серебристо-черных лисиц. Регуляторная изменчивость может включать различные молекулярные механизмы, наиболее изученным из которых является обратимое фосфорилирование молекул ТПГ. Показан существенный вклад обратимого фосфорилирования в определение наследственной изменчивости активности ТПГ в мозге мышей и крыс. На основании полученных результатов было высказано предположение о роли фосфорилирования в регуляции активности ТПГ в мозге серебристо-черных лисиц. Проведенные эксперименты на мышах показали отсутствие сцепления между конститутивной и регуляторной изменчивостью активности ТПГ в мозге. Это служит доказательством, что регуляторная изменчивость обусловлена действием генов-модификаторов.

Фундаментальным вкладом проведенного исследования в генетику поведения и нейрогенетику является экспериментальное доказательство ассоциации наследственного полиморфизма по активности ТПГ в мозге с генетически детерминированными особенностями основных типов защитного поведения, а именно защита территории (и социального статуса), вызванная страхом агрессия, реакция активного избегания и реакция зачирания. Эти формы защитного поведения входят в комплекс поведенческих адаптаций абсолютно необходимых для выживания в естественных условиях и, следовательно, являются продуктом длительной эволюции.

Выявлен единственный случай ассоциации конститутивной изменчивости с поведением – снижение интенсивности драк у самцов мышей гомозиготных по 1473G аллелю по сравнению с животными гомозиготными по 1473C. Эта ассоциация соответствует литературным данным о положительной связи активности ТПГ с интенсивностью драк (Welch, Welch, 1968, Benkert et al., 1973, Malick, Barnett, 1976, Porova et al., 2001), а также о колокализации гена *trh2* и гена *Aggr1*, регулирующего агрессивное поведение мышей (Brodkin et al., 2002), в дистальном фрагменте хромосомы 10 мыши.

Во всех остальных исследованных случаях выявлена ассоциация наследственно детерминированной изменчивости защитного поведения с регуляторной изменчивостью активности ТПГ в мозге.

Селекция серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков на отсутствие агрессии на человека сопровождается гомологичным увеличением активности ТПГ локально в среднем мозге. Наиболее вероятным механизмом этого увеличения активности является усиление фосфорилирования фермента, которое, по-видимому, контролируется генами, не сцепленными с *trh2*. Можно предположить, что в ходе селекции на ручной тип поведения происходит накопление аллелей, усиливающих фосфорилирование фермента в среднем мозге, приводящее к подавлению агрессивной реакции на человека. Ассоциация агрессии на человека со сниженной активностью ТПГ является генетическим доказательством того, что этот тип защитного поведения контролируется другими молекулярными механизмами, чем межсамцовая агрессия, ассоциированная с высокой активностью фермента. Серотонин мозга и ключевой

фермент его биосинтеза, ТПГ, играют существенную роль в детерминации наследственных различий по выраженности этих форм поведения, но действуют они в противоположных направлениях. Более того, в регуляции межсамцовой агрессии мышей значительную роль играет ген *tph2*, тогда как различия в агрессии на человека у мышей обусловлены изменениями в генах-модификаторах.

Выявлена положительная связь активности ТПГ в мозге с выраженностью реакции активного избегания у крыс. Направленная селекция на слабую выраженность реакции избегания приводит к наследственно обусловленному снижению активности ТПГ в среднем мозге. Активность ТПГ значительно меньше в мозге крыс линий SHR с низкой выраженностью реакции активного избегания по сравнению с активностью фермента у животных Lewis с высокой выраженностью реакции избегания.

Реакция каталептического замирания является еще одним видом поведения, ассоциированным с генетически детерминированным уровнем активности ТПГ в мозге. Реакция замирания является одной из форм пассивного оборонительного поведения. Не смотря на то что, внешне каталепсия проявляется как отсутствие какой-либо оборонительной реакции - агрессии или избегания, сама неподвижность является активной (Klemm, 1990). Нами предложена схема регуляции естественной (природной) реакции замирания, включающая два нейробиологических механизма: 1) запуск реакции замирания, контролируемый серотином, и 2) регуляцию мышечного тонуса, осуществляемую дофаминовой и серотониновой системами. Одним из достижений проведенного нами исследования является установление ключевой роли серотониновой системы мозга в механизме запуска реакции замирания. Предрасположенность к естественной каталепсии у крыс и мышей связана с регуляторным локальным увеличением активности ТПГ в стриатуме.

Существует еще одна естественная адаптация довольно близкая к каталепсии – зимняя спячка млекопитающих (гибернация). Некоторые животные (суслики, бурундуки, хомяки, сурки, медведи) с наступлением холодов впадают в оцепенение, температура их тела снижается и энергетические затраты резко снижаются. Эта адаптация позволяет животным выжить в период бескормицы. Н.К. Поповой с соавторами (1978) впервые была показана ключевая роль серотонина мозга в механизме зимней спячки сусликов. При засыпании еще у нормотермных животных наблюдается резкое увеличение активности ТПГ в гиппокампе, стриатуме и среднем мозге. Эта повышенная активность фермента сохраняется у гибернирующих животных. При пробуждении наблюдается постепенное снижение активности фермента в среднем мозге (Pорова et al., 1993).

Таким образом, приведенные в работе данные демонстрируют, что связь активности ТПГ с выраженностью основных типов защитного поведения присуща многим видам млекопитающим и сложилась в результате эволюции защитного поведения. В основе формирования защитной реакции лежит закрепление определенного типа функционирования серотониновой системы мозга. Это положение является экспериментальным подтверждением и развитием гипотезы Н.К. Поповой о том, что в основе отбора на выраженность агрессивного поведения лежит отбор на определенный тип функционирования медиаторных систем мозга (Попова и др., 1980).

Центральным звеном в процессе формирования оборонительного поведения является система генов, контролирующая активность ключевого фермента биосинтеза серотонина – ТПГ. Это не кажется удивительным, если учесть роль фермента в процессе синтеза серотонина. При этом формирование различных типов защитного поведения сопровождается направленными изменениями конститутивных и/или регуляторных характеристик фермента. Более того, можно с большой вероятностью предположить, что в ходе естественной эволюции оборонительного поведения шел скрытый отбор генов и аллелей, регулирующих активность ТПГ.

В конце 2004 года – начале 2005 года появился ряд статей об ассоциации мутаций в гене *tph2* с риском депрессивных психозов (Breidenthal et al , 2004; De Luca et al., 2004; Harvey et al , 2003, 2004, Zill et al , 2004; Zhang et al , 2005) Представленные в работе данные демонстрируют, что связь ТПГ и аффективными психозами может быть значительно сложнее. Полагают, что животные с генетически измененной реакцией активного избегания (Driscoll, 1992; Жуков, 1997) или замирания (Колпаков и др , 2004) могут быть использованы для изучения генетико-молекулярных механизмов аффективных психозов. Выявление ассоциации между нарушением реакций избегания и замирания и регуляторной изменчивостью активности ТПГ в мозге, позволяет сделать практически важный вывод о необходимости более глубокого изучения генетического механизма регуляторной изменчивости активности ТПГ для поиска генов, определяющих наследственную предрасположенность к депрессии.

ВЫВОДЫ

1 Выявлены два основных генетико-молекулярных механизма, регулирующих изменчивость активности триптофангидроксилазы в мозге: 1) C1473G полиморфизм в 11-ом экзоне гена *tph2* - замена нуклеотида С на G в этом сайте приводит к значительному снижению активности фермента и 2) различия в механизме обратимого фосфорилировании молекул фермента.

2. Наследственный полиморфизм по выраженности основных видов защитного поведения (защиты территории, вызванной страхом агрессии, реакции активного избегания и реакции замирания) тесно ассоциирован с активностью ТПГ в головном мозге у животных разных видов.

3 Изменчивость порога (уровня, предрасположенности) и интенсивности (числа драк) межсамцовой агрессии мышей в значительной степени определяется генетическими факторами. Однако эти два показателя межсамцовой агрессии контролируются разными генетическими механизмами. В то время как доминирует низкий порог агрессивной реакции, интенсивность драк имеет промежуточный тип наследования. Обнаружена ассоциация числа драк между самцами мышей с полиморфизмом C1473G в гене *tph2* . Не обнаружено связи между C1473G полиморфизмом и генетически детерминированной выраженностью порога межсамцовой агрессии.

4. Селекция серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков на отсутствие агрессии на человека (доместикация) приводит к сходному увеличению активности ТПГ в среднем мозге.

5. Наследственно детерминированное отсутствие реакции активного избегания у крыс линии RLA ассоциировано со сниженной активностью ТПГ в среднем мозге по сравнению с животными линии RHA с нормальной реакцией активного избегания.

6. Изменчивость выраженности реакции замирания (катаlepsии) у мышей в значительной степени определяется генетическими факторами. Высокая предрасположенность к реакции замирания у мышей линии CBA контролируется в основном одним аутосомным рецессивным локусом. С помощью набора полиморфных микросателлитных маркеров главный ген, кодирующий высокую предрасположенность к катаlepsии, локализован в дистальном фрагменте хромосомы 13.

7. Высокая выраженность наследственной катаlepsии у мышей катаlepsической линии CBA и крыс линии ГК, селекционированной на катаlepsию, сопровождается локальным увеличением активности ТПГ в стриатуме. У мышей линии CBA это увеличение не сцеплено с геном *tph2* . У крыс линии ГК увеличение активности ТПГ в стриатуме обусловлено обратимым фосфорилированием молекул фермента в этой структуре.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Куликов А.В., Попова Н.К. Изучение генетического контроля "спонтанной" агрессивности мышей // Генетика, 1980. Т.16, С.526-531.
2. Куликов А.В., Макаренко В.С. Полуавтоматическое измерение интенсивности агрессивного поведения у мышей // Журн. Высш. Нервн. Деят., 1980. Т.30. С.868-870.
3. Куликов А.В. Изучение закономерностей наследования интенсивности "спонтанной" агрессивности мышей // Изв. СО РАН, Сер. Биол.Наук, 1980. Вып.3. С.69-73.
4. Kulikov A.V., Popova N.K. Aggressiveness in mice // Soviet Genet., 1980. V.16. P.339-343.
5. Куликов А.В. Быстрый неизотопный метод определения активности триптофангидроксилазы в головном мозге // Вопр. Мед. Химии., 1982. Т.28. Вып.1. С.135-138.
6. Гинсбург Э.Х., Куликов А.В. Проверка моногенных гипотез в гибридном анализе количественных признаков // Генетика, 1983. Т.19. С.571-576.
7. Куликов А.В., Попова Н.К. Генетический контроль активности триптофангидроксилазы в головном мозге мышей // Генетика, 1983. Т.19. С.784-788.
8. Попова Н.К., Куликов А.В. Корреляция агрессивности поведения и активности триптофангидроксилазы // Журн. Высш. Нервн. деят., 1983. Т.33. С.589-591.
9. Куликов А.В., Попова Н.К. Активность триптофангидроксилазы в головном мозгу мышей // Нейрохимия, 1983. Т.2. С.421-425.
10. Popova N., Kulikov A., Nikulina E., Kudryavtzeva N. Genetico-physiological and neurochemical bases of complex forms of behavior // Mouse News Lett., 1983, V.69. P.41.
11. Попова Н.К., Кудрявцева Н.Н., Куликов А.В. Наследование уровня серотонина у мышей первого поколения при скрещивании разных инбредных линий // Генетика, 1984. Т.20. С.233-238.
12. Корякина Л.А., Куликов А.В., Фигурнова М.Ю., Попова Н.К. Действие холода на серотониновую систему мозга и уровень кортикостероидов в крови мышей различных линий // Физиол. Журн. СССР, 1985. Т.71. С.422-427.
13. Куликов А.В., Корякина Л.А., Попова Н.К. Взаимодействие генетической и средовой компонент в детерминации активности триптофангидроксилазы в мозге мышей при стрессе // Генетика, 1985. Т.21. С.1680-1684.
14. Попова Н.К., Куликов А.В., Колпаков В.Г., Барыкина Н.Н., Алехина Т.А. Изменения в серотониновой системе мозга крыс, генетически предрасположенных к катаlepsии // Журн. Высш. Нервн. Деят., 1985. Т.35. С.742-746.
15. Kolpakov V., Kulikov A., Barykina N., Alekhina T., Popova N. Catalepsy and increased tryptophan hydroxylase activity in rat striatum // Biogenic Amines, 1985. V.2. P.131-136.
16. Popova N., Kulikov A. Genetic analysis of "spontaneous" intermale aggression in mice // Aggressive Behav., 1986. V.12. P.425-431.
17. Popova N.K. Kulikov A.V. Genetic analysis of spontaneous aggression in mice // J.Genetic abstracts, 1987. V.19, P.87-92.

18. Kolpakov V., Gilinsky M., Alekhina T., Barykina N., Nikulina E., Voitenko N., Kulikov A., Shtilman N. Experimental studies on genetically determined predisposition to catatonia in rats as a model of schizophrenia // *Behav. Processes*, 1987. V.14, P.319-341.
19. Куликов А.В., Воронова Э.М., Жанаева Е.Ю. Чувствительный флюориметрический метод определения активности триптофангидроксилазы в структурах мозга // *Вопр. Мед. Химии.*, 1988. Т.34. Вып.2. С.120-123.
20. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю. Закономерности наследования каталепсии у мышей. III-я школа-семинар по генетике и селекции животных // *Изв. СО АН СССР, Сер. Биол. Наук*, 1989. Вып.2. С.21.
21. Попова Н.К., Куликов А.В. Нейрохимический подход к генетики поведения // *Изв. СО АН СССР, Сер. Биол. Наук.*, 1989. Вып.2. С.24.
22. Куликов А.В., Жанаева Е.Ю., Попова Н.К. Изменения активности триптофангидроксилазы в мозге серебристо-черных лисиц и серых крыс-пасюков в ходе селекции по поведению // *Генетика*, 1989. Т.25. С.346-350.
23. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. Генетический контроль каталепсии у мышей // *Генетика*, 1989. Т.25. С.1402-1408.
24. Куликов А.В., Кудрявцева Н.Н., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. Связь между активностью триптофангидроксилазы в головном мозге и проявлением каталепсии у мышей // *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, 1989, Т.108. № 9. С.269-271.
25. Popova N., Kulikov A., Nikulina E., Kozlachkova E., Maslova G. Serotonin metabolism and serotonergic receptors in Norway rats selected for low aggressiveness to man // *Aggressive Behav.*, 1991. V.17. P.207-213.
26. Popova N., Voitenko N., Kulikov A., Avgustinovich D. Evidence for the involvement of central serotonin in mechanism of domestication of silver foxes // *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1991. V.40. P.751-756.
27. Куликов А.В., Попова Н.К. Формы агрессивного поведения и их генетическая детерминация // В.кн.: *Успехи современной генетики* / Дубинин Н.(ред.). М.:Наука, 1991. Вып.17. С.131-151.
28. Kulikov A., Kozlachkova E., Popova N. The activity of tryptophan hydroxylase in brain of hereditary predisposed to catalepsy rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1992. V. 43. P.999-1003.
29. Popova N., Nikulina E., Kulikov A. Genetic analysis of different kinds of aggressive behavior // *Behav. Genetics*, 1993. V.23. P.491-497.
30. Kulikov A., Kozlachkova E., Maslova G., Popova N. Inheritance of predisposition to catalepsy in mice // *Behav. Genetics*, 1993. V. 23. P.379-384.
31. Popova N., Voronova I., Kulikov A. The involvement of brain tryptophan hydroxylase into the mechanism of hibernation // *Pharmacol. Biochem. Behav*, 1993. V.46. P.9-13.
32. Kulikov A., Kolpakov V., Maslova G., Kozintsev I., Popova N. Effect of selective 5-HT_{1A} agonists and 5-HT₂ antagonists on inherited catalepsy in rats // *Psychopharmacology*, 1994. V.114. P.172-174.
33. Kulikov A., Karmanova I., Kozlachkova E., Voronova I., Popova N. The brain tryptophan hydroxylase activity in the sleep-like states in frog. // *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1994. V.49. P.277-279.
34. Попова Н.К., Войтенко Н.Н., Куликов А.В., Никулина Э.М., Вишневская Г.Б., Трапезов О.В. Влияние плейотропного действия однолокусной (pp) и двулокусной (aarr) мутаций генов окраски норки на метаболизм серотонина в мозге // *Генетика*, 1994. Т.30. С.1513-1516.

35. Попова Н.К., Куликов А.В., Августинович Д.Ф., Вишнинецкая Г.Б., Колпаков В.Г. Участие 5-HT_{1A} серотониновых рецепторов головного мозга в регуляции наследственной катаlepsии // Бюлл. Эксп. Биол. Мед., 1994. Т.118. № 12. С.633-635.
36. Kulikov A, Kozlachkova E, Kudryavtseva N, Popova N. Correlation between tryptophan hydroxylase activity in the brain and predisposition to pinch-induced catalepsy in mice // Pharmacol. Biochem. Behav., 1995. V.50. P.431-435.
37. Popova N, Kulikov A. On the role of brain serotonin in expression of genetic predisposition to catalepsy in animal models // Am. J. Med. Genetics (Neuropsychiatric Genetics), 1995. V.60. P.214-220.
38. Kulikov A, Castanon N, Mormede P, Chaouloff F. Central tryptophan hydroxylase activity, and 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor, and 5-HT transporter binding in grouped and isolated Roman RHA and RLA rats: relationships with behaviours in two models of anxiety // Psychopharmacology, 1995. V.121. P.385-395.
39. Chaouloff F, Kulikov A, Sarrieau A., Castanon N, Mormede P. Male Fisher 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationship with the hippocampal serotonergic system // Brain Res., 1995. V.693. P.169-178.
40. Куликов А.В., Воронова И.П. Роль обратимого фосфорилирования в генетически детерминированном полиморфизме по активности триптофангидроксилазы мозга // Бюлл. Эксп. Биол. Мед., 1995. Т.119. № 1. С.67-68.
41. Kulikov A, Popova N. Association between intermale aggression and genetically defined tryptophan hydroxylase activity in the mouse brain // Aggressive Behav., 1996. V. 22. P.111-117.
42. Попова Н.К., Куликов А.В., Августинович Д.Ф., Шиганцов С.Н., Особенности серотониновой системы мозга и тревожность у мышей линий C57BL и CBA // Журн. Высш. Нервн. Деят., 1996. Т.46. С.348-354.
43. Попова Н.К., Августинович Д.Ф., Шиганцов С.Н., Куликов А.В. Распределение серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов в мозге крыс, генетически предрасположенных к развитию катаlepsии // Журн. Высш. Нервн. Деят., 1996. Т.46. С.578-582.
44. Попова Н.К., Куликов А.В., Августинович Д.Ф., Барыкина Н.Н. Участие серотонергической системы в экспрессии генетической предрасположенности к катаlepsии у крыс и мышей // Росс.Физиол. Журн., 1997. Т.83. С. 66-72.
45. Попова Н.К., Куликов А.В., Августинович, Войтенко Н.Н., Трут Л.Н. Влияние домашней селекции серебристо-черных лисиц на основные ферменты метаболизма серотонина и серотониновые рецепторы // Генетика, 1997. Т.33. С. 370 - 374.
46. Kulikov A., Aguerre S., Berton O., Ramos A., Mormede P. Chaouloff F. Central serotonin synthesis and pre- and postsynaptic 5-HT receptors in the SHR and Lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety // J. Pharmacol. Exp. Ther., 1997. V.281. P.775-784.
47. Popova N.K., Voitenko N.N., Kulikov A.V., Nikulina E.M., Trapezov O.V. The pleiotropic action of the one-locus *pp* and two-loci *aapp* coat color genes on the metabolism of brain neurotransmitters in mink (*Mustela vison*). // Scientifur, 1998. V.22. P. 211- 217.
48. Popova N.K., Voitenko N.N., Kulikov A.V., Nikulina E.M., Trapezov O.V. The pleiotropic effects of the one-locus *pp* and two-loci *aapp* coat color genes on the metabolism of brain neurotransmitters in the mink (*Mustella vison*). // Reproductive physiology in fur animals: a current research, 2000. P.41-49.
49. Куликов А.В., Базовкина Д.В. Проверка гипотез о сцеплении в гибридологическом анализе альтернативных поведенческих признаков с неполной пенетрантностью // Генетика, 2003. Т.39. С.1066-1072.

50. Куликов А.В., Базовкина Д.В., Муазан М.П., Мормэд П. Картирование гена предрасположенности к каталепсии с помощью полиморфных микросателлитных маркеров // Докл. РАН, 2003. Т.293. С.134-137
51. Куликов А.В. Наследственная каталепсия. К вопросу о генетико-молекулярных механизмах каталепсии у мышей // Генетика, 2004. Т.40. С.779-786
52. Колпаков В.Г., Куликов А.В., Алехина Т.А., Чугуй В.Ф., Петренко О.И., Барыкина Н.Н. Кататония или депрессия? Линия крыс ГК – генетическая животная модель психопатологии // Генетика, 2004. Т.40. С.827-834
53. Куликов А.В., Осипова Д.В., Науменко В.С., Попова Н.К. Полиморфизм С1473G в гене триптофангидроксилазы и выраженность агрессивного поведения мышей // Докл. РАН, 2005. Т.402. С.571-573.
54. Kulikov A.V., Osipova D.V., Naumenko V.S., Popova N.K. Association between Trp2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains // Genes Brain Behav., 2005 (in press)

Подписано к печати 29 июля 2005 г.

Формат бумаги 60 x 90 Печ. л. 2. Уч. изд. л. 1.4.

Тираж 110 экз. Заказ 93.

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10.

№20548

РНБ Русский фонд

2006-4

20617