

На правах рукописи



БАЗОВКИНА ДАРЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГЕНА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К
КАТАЛЕПСИИ У МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМОРФНЫХ
МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ**

Генетика – 03.00.15

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск

2006

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

Научный руководитель доктор медицинских наук,
Попова Нина Константиновна,
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск;

Официальные оппоненты доктор биологических наук,
Бородин Павел Михайлович,
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г. Новосибирск;

доктор биологических наук,
Гуляева Людмила Федоровна,
Институт молекулярной биологии и биофизики
СО РАН, г. Новосибирск

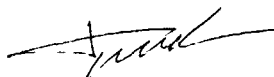
Ведущее учреждение Московский Государственный Университет
им. М. В. Ломоносова, г. Москва

Защита диссертации состоится 25 января 2006г. 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. 630090, г Новосибирск, проспект Лаврентьева, 10, тел (383)-333-12-78, e-mail. dissov@bionet.nsc.ru

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

Автореферат разослан 16» декабря 2005г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



А.Д. Груздев

2006А
248

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность проблемы

Основной задачей нейрогенетики поведения является выявление молекулярных, клеточных и физиологических механизмов трансдукции информации, закодированной в ДНК, в сложный поведенческий признак. Особенно важным является изучение генетической структуры патологий поведения и высшей нервной деятельности.

Катаlepsия (реакция замирания, животный гипноз, мнимая смерть) является одной из форм пассивной защитной реакции замирания, поскольку в естественных условиях она связана со страхом (Gallup, 1977, Klemm, 1989, Dixon 1998). Она представляет собой обездвиженность с пластическим мышечным тонусом и встречается у всех позвоночных, включая млекопитающих (Карманова, 1977). В чрезмерно выраженной форме у человека катаlepsия является синдромом патологического поведения, характерного для некоторых аффективных расстройств и ряда форм психозов (Singelman, Raheja, 1994; Kruger et al., 2003, Taylor, Fink, 2003).

Существуют различные типы катаlepsии. В целом их можно объединить в две большие группы: фармакологические виды катаlepsии, как морфинная (De Ryck et al., 1980) или галоперидоловая (Sanberg, 1980, Patel, Hitzemann, 1999), и наследственные типы реакции замирания. Из последних известны катаlepsия крыс ГК (Барыкина и др., 1983; Kolpakov et al., 1996) и щипковая катаlepsия у мышей.

Интересной для генетических исследований катаlepsии является щипковая катаlepsия (pinch-induced catalepsy) мышей. У некоторых особей этого вида кратковременную реакцию замирания можно вызвать раздражением рефлексогенной зоны шеи (Ornstein, Amir, 1981, Klemm, 1983). Полагают, что эта рефлекторная реакция имеет адаптивное значение и в естественных условиях проявляется у самок при копуляции, у детенышей при их транспортировке матерью и т.д. Выявлены межлинейные различия по скорости развития катаlepsии у мышей (Ornstein, Amir, 1981). Высокая предрасположенность к щипковой катаlepsии по сравнению с мышами других линий была обнаружена у мышей линии СВА (Куликов и др., 1989) у 54% самцов и самок этой линии развивалась стойкая реакция замирания. Для изучения закономерностей наследования предрасположенности животных к катаlepsии был проведен гибридологический анализ признака на мышах двух контрастных линий СВА – с максимальной его выраженностью и некатаlepsической AKR. Анализ показал, что этот признак является аутосомным, рецессивным, моно- или олигогенным с неполной пенетрантностью (Куликов, 1989, Kulikov et al., 1993).

Однако генетическая структура катаlepsии и локализация гена или генов, определяющих данную патологию, до настоящего времени оставалась не выясненной. Большое значение в проявлении катаlepsии исследователи придают дофаминовым (особенно D₂ типа) рецепторам (Klemm, 1989). Работами, проводимыми в Институте цитологии и генетики СО РАН (Куликов et al., 1995, Порова, Kulikov, 1995), показана важная роль серотониновой системы мозга, а именно: ключевой фермент биосинтеза серотонина, триптофангидроксилаза, 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} рецепторы вовлечены в регуляцию катаlepsии у мышей.

Большая часть поведенческих признаков, являющихся количественными, контролируются полигенно и значительно зависят от факторов внешней среды (Мазер, Джинкс, 1985; Васильева, 1999, Стус, 1999). Но при этом можно выделить

главные гены с большим вкладом в изменчивость признака, чем остальные гены (Мазер, Джинкс, 1985) Для изучения генетической структуры количественных признаков был разработан специальный подход - QTL (quantitative trait loci) анализ. Локусы ДНК, для которых методом QTL показано статистически достоверное сцепление с поведенческим признаком, могут включать полигены, участвующие в определении наследственной изменчивости по данному признаку (Plomin et al, 1994; Le Roy, 1999; Moisan, 1999; Roubertoux, 2001). Одними из лучших маркеров для QTL анализа являются микросателлитные последовательности, поскольку они достаточно часто встречаются в геноме и обладают такими свойствами, как полиморфность, кодоминантность (Hearne et al, 1992; Bennett, 2000; Pitel, Riquet, 2000; Schlotterer, 2004).

Так, у мышей был проведен QTL анализ каталепсии, возникающей при введении галоперидола. В результате было показано, что этот тип реакции замирания связан с геном дофаминовых D₂ рецепторов (Patel, Hitzemann, 1999). Такое заключение не являлось неожиданным, поскольку галоперидол по механизму воздействия является блокатором дофаминовых рецепторов, преимущественно D₂ типа. Природа же генетических факторов, контролирующих шипковую каталепсию, до настоящего времени оставалась невыясненной. Сложность картирования шипковой каталепсии у мышей в том, что она относится к альтернативным признакам с неполной пенетрантностью, и для картирования ее генов неприемлемы существующие программы QTL подхода, основанные на регрессионном анализе.

Целью настоящего исследования было выявление генетической структуры шипковой каталепсии у мышей СВА и картирование генов или гена, определяющих у этих животных высокую предрасположенность к каталепсии. Для выполнения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. определить на хромосомах мыши локусы, ответственные за предрасположенность к каталепсии, при помощи полиморфных микросателлитных маркеров;

2. выявить гены-кандидаты и проверить их связь с наследственной предрасположенностью к каталепсии;

3. изучить в процессе селекции на каталепсию изменения параметров этого признака и особенности генотипов селекционированных животных,

4. показать возможность картирования альтернативных поведенческих признаков с неполной пенетрантностью.

Научная новизна.

- впервые проведен генетический анализ наследственной шипковой каталепсии у мышей и определена ее генетическая структура, включающая один майорный ген и несколько полигенов;
- впервые установлено, что ген, определяющий высокую предрасположенность к каталепсии, находится в дистальном фрагменте хромосомы 13 мыши,
- впервые установлено, что селекция на каталепсию приводит к фиксации в потомстве локуса ДНК, полученного от каталептической линии СВА и тесно связанного с геном серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов,
- показана возможность картирования альтернативного признака с неполной пенетрантностью классическим подходом QTL анализа с использованием полиморфных микросателлитных маркеров.

Научно-практическая ценность.

В данной работе установлена генная структура сложного поведенческого признака - щипковой каталепсии у мышей СВА, которая выражается в гипертрофированной форме у этих животных. Поскольку реакция замирания представляет собой важный элемент пассивно-оборонительного поведения, то изучение ее генетического механизма способствует более глубокому пониманию эволюционной значимости каталепсии.

Продемонстрирована возможность картирования альтернативного признака с неполной пенетрантностью классическим подходом QTL анализа с помощью полиморфных микросателлитных маркеров.

Показана тесная связь предрасположенности к каталепсии с участком ДНК мыши, несущим ген 5-HT_{1A} рецепторов нейромедиатора серотонина, что привлекает внимание к более детальному изучению функций этих рецепторов и их роли в формировании поведенческих признаков.

Получены в результате селекции на каталепсию мыши со стабильно высокой долей каталептиков, значительно большей, чем у родительской линии СВА. Возможно дальнейшее использование этих животных в изучении генетических и физиологических факторов каталепсии, а также ее связи с другими формами поведения.

Положения, выносимые на защиту.

1. Высокая предрасположенность к каталепсии у мышей инбредной линии СВА кодируется одним майорным геном, локализованным в дистальном участке хромосомы 13 (между 58 и 75 cM) и рядом не сцепленных с ним полигенов;

2. Вклад главного гена в наследование склонности к реакции замирания составляет 18%, а полигенов – 32%;

3. Селекция на каталепсию приводит к закреплению в потомстве аллеля микросателлитного маркера D13Mit76, полученного от родительской линии СВА и тесно связанного с геном 5-HT_{1A} рецепторов;

4. Наиболее вероятным геном-кандидатом на роль майорного гена каталепсии является ген, кодирующий 5-HT_{1A} рецептор нейромедиатора серотонина.

Апробация работы.

Результаты данной работы были представлены и обсуждены на Ученых Сессиях Института цитологии и генетики СО РАН в 2000, 2003 годах, на XXXIX, XL и XLII международных научных студенческих конференциях “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2001, 2002, 2004), VII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2004), III Съезде генетиков и селекционеров “Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития” (Москва, 2004), Международной школе молодых ученых «Геномика человека и модельных объектов» (Звенигород, 2004), IX зимней школе СГМО (Хельсинки, 2005), V Съезде физиологов Сибири (Томск, 2005), Международной школе по нейрогенетике поведения (Москва, 2005).

Публикации.

Материал диссертации представлен в 9 публикациях, в том числе в 3 статьях в реферируемых журналах.

Структура и объем работы.

Работа изложена на 95 страницах, содержит 13 рисунков, 8 таблиц и включает все необходимые разделы: введение, обзор литературных данных,

материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список использованной литературы (257 ссылок)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Животные. В работе использовались высоко инбредные и контрастные по предрасположенности к каталепсии линии мышей СВА/Лас (каталептическая линия) и AKR/J (некаталептическая линия), поддерживающиеся около 50 лет в виварии ИЦиГ СО РАН, а также их гибриды. Все мыши тестировались на каталепсию в возрасте 2 месяцев. Непосредственно за 2 дня до тестирования животных изолировали в индивидуальные клетки, чтобы снять возможное влияние группового эффекта.

Гибридологический анализ был проведен посредством скрещивания особей СВА и AKR, затем реципрокные гибриды F_1 были скрещены с мышами родительской линии СВА, в результате получили бэккроссов (BC).

Селекционный эксперимент включал отбор и скрещивание бэккроссов-каталептиков из разных семей для предотвращения инбридинга, отбор и скрещивание каталептических мышей первого поколения селекции S_1 из разных семей (также для предотвращения инбридинга). Аналогично получали мышей S_3 (от скрещивания каталептиков S_2) и S_4 (от скрещивания каталептиков S_3). При получении последующих поколений селекции был введен братско-сестринский инбридинг: производился отбор и скрещивание мышей-каталептиков из одной семьи. В настоящее время выведено поколение S_{15} селекции.

Каталепсию вызывали как у самцов, так и у самок, зажимая в течение 5 с кожу шеи, затем животное помещали на две параллельные, разновысокие перекладины, расположенные под углом 45° . При этом передние лапы животного располагались на высоте 23 см от поверхности стола и на 3 см выше задних. Тест на каталепсию считали положительным, если период, в течение которого мышь сохраняла приданное ей неестественное положение, был не менее 20 с. Время теста ограничивали 120 с, после чего животное возвращали в его клетку. Каждый из последовательных 10 тестов проводили с интервалом в 1-2 минуты. Животные, дающие 3 положительных теста из 10, рассматривались как каталептики (Куликов и др., 1989).

Выделение ДНК проводили по Маниатис с соавт. (1984) в модификации, разработанной в лаборатории, очистку ДНК проводили фенольно-хлороформным методом.

Выбор микросателлитных маркеров. Было выбрано 65 микросателлитных маркеров, полиморфных между линиями СВА и AKR, т.е. для каждого из этих маркеров аллели типа СВА и AKR максимально четко дифференцировались после электрофоретической обработки. Данные маркеры равномерно покрывали все 19 аутосом мыши с интервалом не более 25 cM.

ДНК-типирование проводилось методом ППР с последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции в агарозном и полиакриламидном гелях.

Тестирование функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов серотонина у мышей проводили, определяя с помощью электронного термометра KUT Couple Thermometr выраженность гипотермии, вызванной введением 8-OH-DRAT , агониста 5-HT_{1A} рецепторов. У мышей измеряли ректальную температуру тела, затем внутрибрюшинно вводили 8-OH-DRAT (в дозе 1 мкг/кг) и через 20 минут

спова измеряли температуру тела. Функциональную активность рецепторов оценивали по изменению температуры тела до и после введения препарата.

Статистическая обработка результатов. Частоты распределения каталептиков сравнивали с помощью нормального распределения после преобразования долей в арксинусы по Фишперу. Функциональная активность 5-HT_{1A} рецепторов и время замирания выражались как $M \pm m$ после обработки данных однофакторным ANOVA анализом.

Исследование локализации генов, кодирующих предрасположенность к каталепсии, было осуществлено методами одномаркерного анализа и интервального картирования, разработанных для альтернативных признаков с неполной пенетрантностью. При *одномаркерном анализе*, проведенном на бэккроссах-каталептиках, сцепление между предрасположенностью к каталепсии (выражаемой в процентах каталептиков) и каждым маркером оценивалось независимо от других маркеров. Проверка отклонения распределения числа гомо- (N_{cc}) и гетерозигот (N_{ca}) от их случайного распределения (1:1) проводилась с помощью критерия χ^2 с одной степенью свободы.

$$\chi^2 = (N_{cc}-N)^2/N + (N_{ca}-N)^2/N, \text{ где } N = (N_{cc} + N_{ca})/2.$$

Вводилась поправка Бонферрони на множественное сравнение (Lynch, Walsh, 1998): $P = P_0/n$, где n – число используемых маркеров. Одномаркерный анализ позволяет определить хромосому, на которой находится ген, кодирующий признак.

Картирование гена каталепсии на данной хромосоме проводили с помощью *интервального оценивания* посредством двух независимых статистических подходов. В первом методе по Brodtkin et al. (2002) использовались только бэккроссы-каталептики. Исследуемая хромосома с помощью набора полиморфных маркеров разбивается на ряд интервалов размером 10-15 cM. Число гомо- и гетерозиготных особей подсчитывается для каждого маркера и каждого интервала между двумя соседними маркерами. Для подсчета числа гомо- и гетерозигот для интервала между соседними маркерами рекомбинантные особи предварительно удаляются. Случай, когда исключение рекомбинантных особей приводит к увеличению χ^2 , расценивается как доказательство локализации гена, кодирующего признак, в данном интервале (Brodtkin et al., 2002).

Второй подход опирается на классический метод максимального правдоподобия, разработанный для парных признаков, и использует данные по всем бэккроссам каталептикам и некаталептикам. Выдвигаются две статистические гипотезы. Согласно гипотезе H_0 , предрасположенность к каталепсии определяется некоторым числом диспергированных в геноме полигенов, каждый из которых вносит свой небольшой вклад в развитие признака. Гипотеза H_1 предполагает, что реакция замирания контролируется рядом полигенов и одним майор-геном, пенетрантность которого сопоставима по величине с суммарной пенетрантностью многочисленных полигенов.

Все множество бэккроссов по каждому из проверяемых маркеров было разбито на четыре фенотипические группы: 1) гомозиготы – каталептики, 2) гомозиготы – некаталептики, 3) гетерозиготы каталептики и 4) гетерозиготы – некаталептики. Проверку соответствия предсказаний численностей каталептиков и некаталептиков для гипотез H_1 и H_0 наблюдаемым численностям особей в четырех фенотипических группах проводили с помощью метода минимума χ^2 (Крамер,

1975) и метода максимального правдоподобия (Le Roy, 1999), которые позволяют не только тестировать гипотезу, но и оценить ее параметры (позиция и пенетрантность главного гена, пенетрантность полигенов)

Значения параметров подбираются таким образом, чтобы минимизировать величину χ^2 или максимизировать величину L. Поиск минимума или максимума функций проводился по алгоритму Хука-Дживса при помощи программы, реализованной на языке BASIC (Bunday, 1984).

Оценку числа степеней свободы (df) для критерия χ^2 проводили как

$df = \text{число маркеров} \times 3 - \text{число оцениваемых параметров}$

Коэффициент для первого члена формулы, равный 3, определяется условием нормировки для четырех наблюдаемых групп для каждого маркера.

Доверительный интервал для положения гена, определяющего каталепсию, был построен при использовании принципа one-LOD (Lander, Botstein, 1989; Lynch, Walch, 1998).

Для животных BC, поколений S_1 и S_2 вычислялись концентрации аллелей маркеров хромосомы 13 с помощью значений концентраций соответствующих генотипов по формулам:

$$[c] = (N_{c/c} + 0.5 \times N_{c/a}) / (N_{c/c} + N_{c/a} + N_{a/a}),$$

$$[a] = N_{a/a} + 0.5 \times N_{c/a} / (N_{c/c} + N_{c/a} + N_{a/a}),$$

где $[c]$ – концентрация аллеля c , полученного от СВА, $[a]$ – концентрация аллеля a , полученного от АКР, $N_{c/c}$, $N_{c/a}$ и $N_{a/a}$ – полученные в эксперименте числа c/c , c/a и a/a генотипов.

Гипотезу об отсутствии эффекта селекции по поведению на распределение гомо- и гетерозигот c/c , c/a и a/a у мышей S_1 и S_2 проверяли сравнением экспериментальных результатов с теоретическими значениями (подсчитанными по закону Харди-Вайнберга, исходя из предположения об отсутствии селекции) с помощью χ^2 теста с 2-мя степенями свободы

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Доля каталептиков у мышей линий СВА, АКР и их гибридов F_1 и бэкрсов.

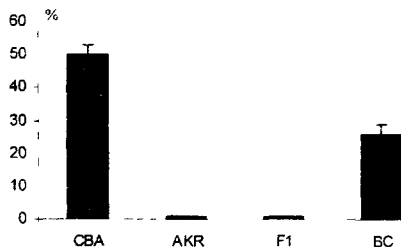


Рис 1 Процент каталептиков среди мышей линий СВА, АКР и их гибридов F_1 и бэкрсов (BC)

Процент каталептиков в линии СВА (50%, Рис 1) хорошо согласуется с полученными ранее данными (54%, Kulikov et al., 1993) ($\chi^2 = 1.93$, $p > 0.1$) и указывает на то, что предрасположенность к катаlepsии стабильно наследуется в поколениях линии СВА. По этому признаку не было обнаружено половых различий ($\chi^2 = 1.94$, $p > 0.16$). По доле каталептиков у бэккроссов не было выявлено ни половых ($\chi^2 = 1.7$, $p > 0.19$), ни реципрокных различий ($\chi^2 = 0.01$, $p > 0.9$), поэтому для дальнейшего исследования данные по самцам и самкам для бэккроссов анализировались совместно. Полученное распределение каталептиков и некаталептиков среди бэккроссов согласовывалось с ожидаемым (74, $\chi^2 = 0.35$, $p > 0.05$), подсчитанным исходя из предположения о наличии менделевского расщепления 1.1 и 50%-ой пенетрантности исследуемого признака.

2. Локализация гена предрасположенности к катаlepsии методом одномаркерного анализа.

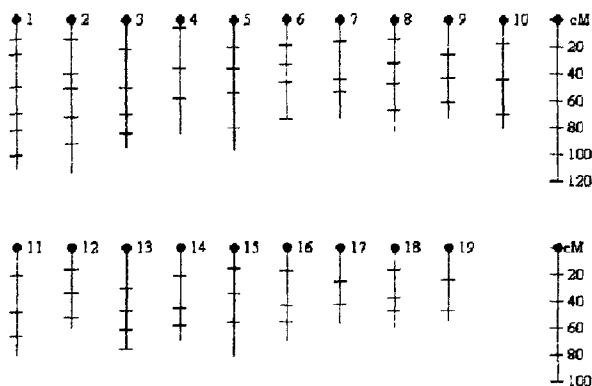


Рис 2 Локализация на 19 аутосомах мыши 65 полиморфных микросателлитных маркеров, выбранных для картирования предрасположенности к катаlepsии при скрещивании животных линий СВА и АКР

Список полиморфных маркеров: 1 - D1Mit221, D1Mit234, D1Mit216, D1Mit164, D1Mit424, D1Mit151, 2 - D2Mit417, D2Mit380, D2Mit206, D2Mit493, D2Mit142, 3 - D3Mit307, D3Mit77, D3Mit258, D3Mit87, 4 - D4Mit211, D4Mit178, D4Mit125, 5 - D5Mit13, D5Mit151, D5Mit10, D5Mit31; 6 - D6Mit107, D6Mit188, D6Mit105, D6Mit14, 7 - D7Mit227, D7Mit31, D7Mit238, 8 - D8Mit4, D8Mit193, D8Mit242, D8Mit121, 9 - D9Mit129, D9Mit269, D9Mit277, 10 - D10Mit106, D10Mit42, D10Mit103, 11 - D11Mit271, D11Mit36, D11Mit224, 12 - D12Mit221, D12Mit4, D12Mit167, 13 - D13Mit64, D13Mit202, D13Mit76, D13Mit78, 14 - D14Mit83, D14Mit92, D14Mit97, 15 - D15Mit85, D15Mit122, D15Mit171, 16 - D16Mit146, D16Mit76, D16Mit189, 17 - D17Mit115, D17Mit153, 18 - D18Mit60, D18Mit182, D18Mit154, 19 - D19Mit63, D19Mit10. Рядом с аутосомами указаны их номера с 1 по 19.

Генотип бэккроссов-каталептиков был определен для каждого из 65 микросателлитных маркеров, полиморфных между линиями СВА и АКР и равномерно покрывающих все 19 аутосом с интервалом не более 25 сМ (Рис 2)

Критическое значение χ^2 при уровне значимости, равном 0,05, для проверки гипотезы о сцеплении, скорректированное на число маркеров, равное 65 ($P = P_0/65$), было 11,3 (Куликов и др., 2003; Куликов, Базовкина, 2003). Получили, что гипотеза об отсутствии сцепления строго отвергается только для одного маркера D13Mit78 ($\chi^2 = 17,78$, $p < 0,002$), локализованного в теломерном фрагменте (75 сМ) хромосомы 13 (Рис.3)

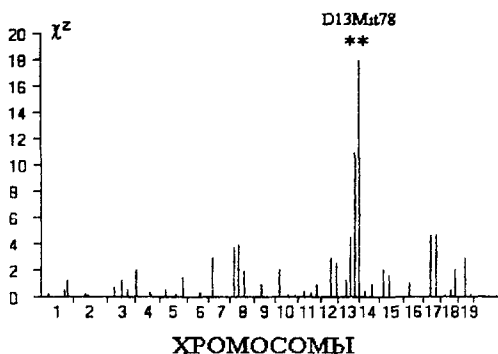


Рис 3 Значения критерия χ^2 для проверки сцепления предрасположенности к катаlepsии с полиморфными микросателлитными маркерами у бэккроссов, проявляющих катаlepsию. Номера и относительные размеры хромосом отложены по оси абсцисс

**** $p < 0,01$**

Близкое к критическому значению χ^2 (10,92, $p < 0,058$) было получено для маркера D13Mit76, расположенного в положении 61 сМ на хромосоме 13. Для других маркеров, локализованных более проксимально на хромосоме 13 или на других 18 аутосомах, значения χ^2 были ниже критического (не более 5,0) (Рис 3)

Несмотря на достоверное значение критерия χ^2 моногенной модели предрасположенности к катаlepsии противоречит наличие 20 гетерозигот среди 77 каталептиков, наблюдаемых при ДНК-типировании с маркером D13Mit78. Разумным будет принятие модели наследования катаlepsии, включающей майорный ген в теломерном участке хромосомы 13 и несколько полигенов, вовлеченных в регуляцию признака и определяющих его оставшуюся вариабельность, т.е. наличие среди бэккроссов гетерозигот по маркеру D13Mit78

С маркером D9Mit129, расположенным на расстоянии 2 сМ от гена дофаминовых D_2 рецепторов, не было обнаружено сцепления для ВС ($\chi^2 = 0,12$, $p > 0,05$). Следовательно, генетико-молекулярный механизм регуляции естественной оборонительной реакции, какой является щипковая катаlepsия, отличается от

механизма, определяющего тесно сцепленную с геном D₂ рецептора чувствительность к каталептогену галоперидолу, (Kanes et al., 1996, Patel, Hitzemann, 1999), и ген D₂ рецепторов не является майорным геном наследственной шипиковой каталепсии у мышей

Стоит также отметить, что при анализе результатов не было выявлено сцепления предрасположенности к каталепсии с маркерами D7Mit227 и D10Mit103, локализованными на хромосомах 7 и 10, на расстоянии 8 сМ от генов, кодирующих гены триптофангидроксилазы tph1 и tph2, соответственно. Не был установлен факт наличия сцепления признака каталепсии с маркером D14Mit92, расположенным на хромосоме 14 мыши (Hsieh et al., 1990) на расстоянии 3,5 сМ от гена 5-HT_{2A} рецепторов. Таким образом, гены триптофангидроксилазы и серотониновых 5-HT_{2A} рецепторов не могут претендовать на роль главного гена шипиковой каталепсии.

3. Локализация гена предрасположенности к каталепсии методом интервального оценивания.

Стандартные программы для точного картирования гена на хромосоме, такие как MAPQTL (Van Ooijen, 2004), предполагают, что признак имеет непрерывное (обычно нормальное) распределение. Поэтому эти программы не пригодны для картирования признаков с альтернативным распределением и с неполной пенетрантностью (Brodkin et al., 2002). Для более точного картирования главного гена каталепсии на хромосоме 13 был использован два независимых подхода. метод, предложенный Brodtkin et al (2002) для такого альтернативного признака как процент агрессивных мышей, и классический метод максимального правдоподобия, разработанный для парных признаков

3.1. Картирование гена каталепсии по методу Brodtkin et al. (2002).

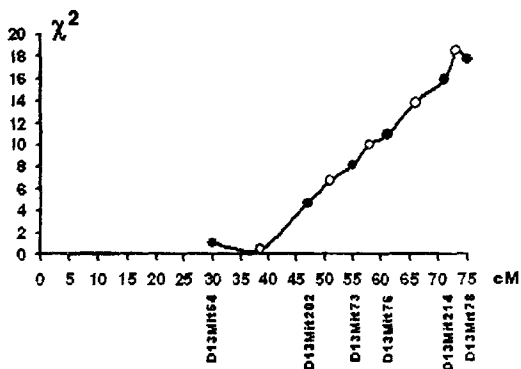


Рис 4 Величины критерия χ^2 для проверки сцепления предрасположенности к каталепсии с маркерами (черные кружки) и интервалами (белые кружки) на хромосоме 13 (по методу Brodtkin et al., 2002)

На дистальном участке хромосомы 13 мыши между 30-75 сМ было выбрано 6 полиморфных микросателлитных маркеров D13Mit64 (30 сМ), D13Mit202 (47 сМ), D13Mit73 (55 сМ), D13Mit76 (61 сМ), D13Mit214 (71сМ) и D13Mit78 (75 сМ), расположенных на участке от 30 до 75 сМ хромосомы 13 (Рис 4)

Эти маркеры разбили исследуемую область хромосомы на 5 интервалов. В среднем расстояние между двумя соседними маркерами (размер интервала) равнялось 9 сМ, наименьший интервал получился между маркерами D13Mit214 и D13Mit78 (4сМ), наибольший - между D13Mit64 и D13Mit202 (17 сМ), такое разбиение давало достаточно высокое разрешение. С этими маркерами были ДНК-типированы бэккроссы-катаlepsики. Оценивались два параметра: 1) величина соответствия между наблюдаемым и ожидаемым (1:1) распределением гомо- и гетерозигот для каждого маркера и 2) величина соответствия между наблюдаемым и ожидаемым (1:1) распределением двойных гомо- и гетерозигот для обоих маркеров для каждого из 5 интервалов после удаления рекомбинантных особей. При оценке обоих параметров использовался критерий χ^2 (Рис 4)

Только для одного интервала между маркерами D13Mit214 и D13Mit78 величина χ^2 превысила значения критерия для граничных маркеров D13Mit214 ($\chi^2 = 15,91$) и D13Mit78 ($\chi^2 = 17,78$), достигнув значения 18,51. Такое увеличение величины χ^2 можно рассматривать как доказательство того, что ген, кодирующий предрасположенность к катаlepsии, локализован в интервале от 71 до 75 сМ хромосомы 13, т. е. между маркерами D13Mit214 и D13Mit78.

Однако метод, предложенный Brodtkin с соавт. (2002), не позволяет оценить достоверительный интервал локализации главного гена, определяющего предрасположенность к катаlepsии, на хромосоме 13. Из характера кривой можно ожидать, что достоверительный интервал может быть значительно шире.

3.2. Картирование гена катаlepsии методом максимального правдоподобия и минимума χ^2 .

Более точная локализация гена катаlepsии проводилась интервальным картированием с использованием классического метода максимального правдоподобия (Рис.5).

Максимальная величина отношения правдоподобия гипотезы H_1 по отношению к гипотезе H_0 (LOD) для маркеров хромосомы 13 равнялась 8,38, что было выше обычно принимаемого порогового значения, равного 3. Таким образом, для последующего анализа принимается гипотеза, постулирующая локализацию гена катаlepsии на хромосоме 13. χ^2 -тест также отвергает гипотезу H_0 о полигенном наследовании предрасположенности к катаlepsии ($\chi^2 = 59,6$, $df = 17$, $p < 0,001$), но подтверждает гипотезу H_1 , постулирующую модель наследования этого признака, включающую один майорный ген и несколько полигенов ($\chi^2 = 23,5$, $df = 15$, $p > 0,05$). При этом вклад майорного гена в предрасположенность к катаlepsии оценивается как 18%, а полигенов – 32%. Следовательно, суммарная пенетрантность признака, определяемая совместным действием главного гена и всех полигенов, которые находятся в гомозиготном состоянии у мышей СВА, равна $0,18 + 0,32 = 0,5$. Эта величина равна пенетрантности катаlepsии у мышей СВА.

Методы максимального правдоподобия и минимума χ^2 локализуют главный ген катаlepsии в положении 73 сМ на хромосоме 13 мыши. Достоверительный 95%

интервал для этого гена находится в районе с 58 до 75 сМ хромосомы 13 (Рис.5) и включает интервал, полученный по методу Brodtkin с соавт (2002)

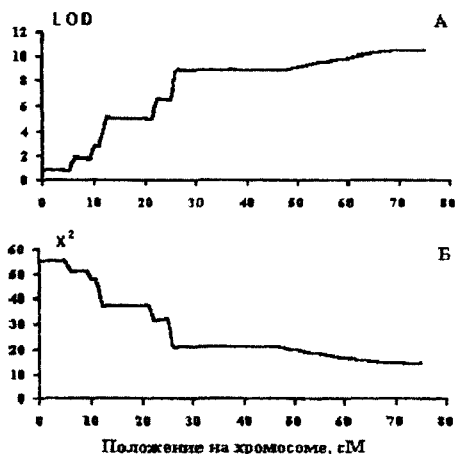


Рис 5 Локализация главного гена катаlepsии интервальным оцениванием, основанным на методах максимального правдоподобия (А) и минимума χ^2 (Б), с использованием 6 маркеров хромосомы 13 мыши

Три независимых статистических подхода, примененных на бэккроссах: одномаркерный анализ, интервальное оценивание методом Brodtkin et al (2002) и классический метод максимального правдоподобия и минимума χ^2 для парных признаков подтверждают модель наследования катаlepsии, включающую один главный ген и множество не сцепленных с ним полигенов, и локализуют ген катаlepsии между 58 и 75 сМ хромосомы 13 мыши. Из базы данных MGI (<http://www.informatics.jax.org>) известно около 30 различных генов, находящихся между 58 и 75 сМ хромосомы 13 мыши. Но в качестве возможных генов-кандидатов (т.е. генов, продукты которых так или иначе вовлечены в регуляцию нейромедиаторных процессов) разумно рассматривать только четыре из них два гена, кодирующие интегрины α_1 (65 сМ) и α_2 (64 сМ), ген ростового фактора фибробластов 10 (FGF-10) (75 сМ) и ген серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов (58 сМ). Однако до сих пор нет никаких сведений в литературе о связи катаlepsии с интегринами и ростовыми факторами фибробластов, но имеются данные о вовлечении 5-HT_{1A} рецепторов в регуляцию катаlepsии. Так, активация 5HT_{1A} рецепторов агонистами приводит к выраженному ингибированию катаlepsии, вызванной нейролептиками (Broekkamp et al 1988; Neal-Beliveau et al 1993) и наследственной катаlepsии у крыс ГК (Kulikov et al, 1994) и мышей СВА (Porova et al., 1994). Было также показано, что крысы ГК имеют пониженную плотность 5HT_{1A} рецепторов в стриатуме (Porova et al 1997), что немаловажно, поскольку

стриатум является структурой мозга, участвующей в развитии реакции замирания (Di Chiara, Morelli 1984)

4. Динамика выраженности каталепсии в ходе селекции на данный признак.

Селекция на каталепсию, начатая с поколения бэкрсов, привела к быстрому повышению доли каталептиков у гибридов (Рис.6) Так, процент каталептических животных в первом поколении селекции S_1 (35 %) достоверно выше, чем у бэкрсов (27%, $\chi^2 = 41$, $p < 0,05$) (Рис 6) У мышей S_3 процент каталептиков составил 71%, то есть стал достоверно выше, чем у СВА (50%, $p < 0.001$) Наблюдается некоторое снижение процента каталептиков у мышей S_5 и S_6 , что вероятно, объясняется введением братско-сестринского инбридинга У последующих поколений селекции доля каталептиков остается стабильно высокой Так, у последнего полученного на сегодняшний день поколения S_{15} число каталептиков составляет около 80% Быстрый ответ на селекцию подтверждает представление о наличии одного майорного гена каталепсии

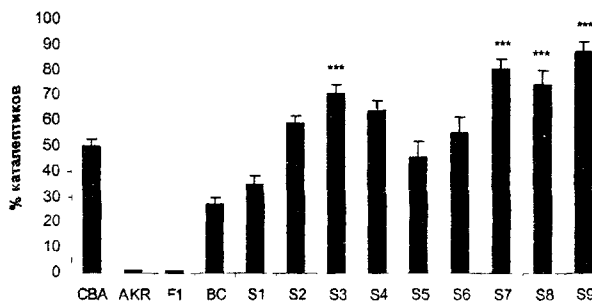


Рис 6 Динамика изменения доли каталептиков в процессе селекции мышей на предрасположенность к каталепсии где S_1 - S_9 - поколения селекции

*** $p < 0.001$ по сравнению с СВА

Что касается, времени замирания, то в ходе селекции этот параметр достоверно не изменялся Так, средний показатель времени замирания у мышей поколения S_8 составил 44.8 ± 4.5 сек, в то время как у животных-каталептиков СВА - 43.7 ± 9.9 сек.

5. Изменение концентрации генотипов и соответствующих аллелей СВА и АКР у мышей в ходе селекции на каталепсию.

Бэкрсовы.

У мышей поколения BC были вычислены концентрации с-аллеля, полученного от линии СВА и а-аллеля, полученного от линии АКР, для трех из шести полиморфных микросателлитных маркеров хромосомы 13 D13Mit202, D13Mit76 и D13Mit78, расположенных на хромосоме, соответственно, в позициях 47, 61 и 75 сМ Концентрации с и а аллелей были подсчитаны, исходя из

полученных в эксперименте распределения чисел *c/c* и *c/a* генотипов. Достоверных различий в значениях концентраций аллелей для этих маркеров найдено не было.

Мыши поколения селекции S_1 и S_2 .

Были вычислены ожидаемые по закону Харди-Вайнберга концентрации генотипов для маркеров D13Mit202 и D13Mit76 у животных поколения S_1 селекции. Вычисления производились, исходя из значений концентраций *c*- и *a*-аллелей у бэккроссов. Ожидаемые концентрации сравнивались с полученными в реальном эксперименте. Получили, что селекция влияет на распределение генотипов для маркера D13Mit76 ($\chi^2=12,6$, $p<0,01$), что свидетельствует о наличии сцепления предрасположенности к каталепсии с этим маркером. В то же время селекция не оказала никакого воздействия на концентрации генотипов для маркера D13Mit202 ($\chi^2 = 1,5$). Это подтверждает отсутствие достоверного сцепления каталепсии с данным маркером.

У мышей S_2 также сравнивались концентрации генотипов для маркера D13Mit76: реальные и теоретические, подсчитанные по закону Харди-Вайнберга (исходя из концентраций *c*- и *a*-аллелей у мышей S_1). χ^2 -тест показал влияние селекции на распределение генотипов, а значит, и наличие сцепления склонности к реакции замирания с маркером D13Mit76 и для мышей S_2 поколения селекции ($\chi^2 = 14,5$, $p<0,01$).

Таким образом, отсутствие влияния селекции на соотношение концентраций аллелей и генотипов маркера D13Mit202 показано на мышах S_1 и S_2 поколениях. В то же время у этих же животных было зарегистрировано достоверное повышение доли *c/c* генотипа и относительное сокращение доли *c/a* и *a/a* генотипов для маркера D13Mit76 по сравнению с распределением, ожидаемым по закону Харди-Вайнберга. Это, соответственно, сопровождалось увеличением концентрации *c*-аллеля, полученного от линии СВА и снижением *a*-аллеля, полученного от линии AKR. Наблюдалась явная динамика в повышении концентраций *c/c* генотипа и, соответственно, *c*-аллеля (поскольку у мышей S_2 значения этих параметров были выше, чем у мышей S_1) в процессе селекции на каталепсию.

Мыши поколения S_8 и S_{12} .

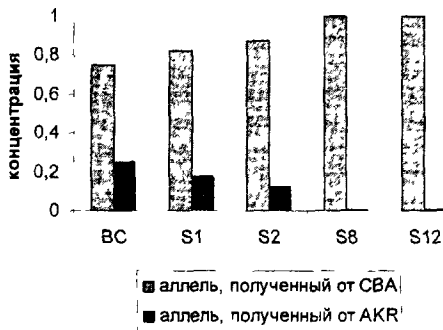


Рис 7. Изменение в ходе селекции на каталепсию концентраций СВА и АКР аллелей для маркера D13Mit76 у бэккроссов, S_1 , S_2 , S_8 и S_{12} поколений селекции.

У мышей S_8 и S_{12} анализ ДНК, проведенный с использованием маркера D13Mit76, не выявил ни одного аллеля родительской линии AKR (Рис 7), что продолжает динамику увеличения c -аллеля и понижения a -аллеля, показанную для животных S_1 и S_2 и связанную с селекцией мышей на высокую предрасположенность к катаlepsии. Элиминация a -аллеля и фиксирование c -аллеля в процессе селекции подтверждает полученные на бэккроссах данные о сцеплении катаlepsии с теломерным участком хромосомы 13 мыши.

6. Изучение функциональной активности 5-HT_{1A} рецепторов у мышей линий CBA, AKR и S_{12} поколения селекции.

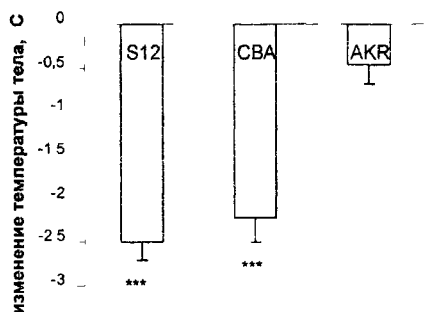


Рис 8 Влияние агониста 5-HT_{1A} рецепторов на температуру тела мышей родителских инбредных линий AKR, CBA и S_{12} поколения селекции на катаlepsию. Данные представляют изменения температуры тела до и через 20 мин после введения 8-OH-DPAT в дозе 1мг/кг.

*** $p < 0,001$ по сравнению с AKR

Введение агониста серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов 8-OH-DPAT показало достоверную разницу гипотермического эффекта у родителских линий ($p < 0,001$). У мышей CBA понижение температуры тела через 20 минут после инъекции составило $2,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$, в то время как у особей AKR – всего лишь $0,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Вместе с этим, эффект препарата на животных S_{12} был схожим с его воздействием на мышей CBA, т.е. достоверно отличающимся от AKR у гибридов температура тела понизилась на $2,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (Рис.8).

Поскольку введение данного препарата служит тестом на функциональную активность серотониновых 5-HT_{1A} рецепторов, то можно сделать вывод о том, что с одной стороны, активность рецепторов этого типа существенно различается у родителских линий CBA и AKR. С другой стороны, мыши, селекционированные на катаlepsию, наследуют активность рецепторов по CBA типу, что хорошо согласуется с тем фактом, что у этих животных зафиксирован полученный от линии CBA фрагмент хромосомы 13, несущий ген 5-HT_{1A} рецепторов. Все вышесказанное говорит о том, что селекция на предрасположенность к замиранию связана с состоянием 5-HT_{1A} рецепторов, тест на функциональную активность 5-HT_{1A} рецепторов, проведенных на родителских линиях и селекционных мышах, можно

считать физиологическим доказательством вовлечения гена этих рецепторов в регуляцию наследственной щипковой каталепсии

Таким образом, наилучшая модель, описывающая генетический контроль предрасположенности к щипковой каталепсии существует майор-ген, локализованный между 58 и 75 сМ хромосомы 13 мыши и вносящий существенный 18% вклад в наследование реакции замирания. Судя по всему, этим главным геном является ген 5-HT_{1A} рецепторов. Аллель этого гена, характерный для мышей СВА, определяет у этих животных и их гибридных потомков, селекционированных на каталепсию, и предрасположенность к стойкому замиранию, и высокую функциональную активность 5-HT_{1A} рецепторов. Кроме майорного имеются полигены, оказывающие второстепенное влияние на проявление каталепсии, суммарный их вклад оценивается как 32%. Не исключено, что гены триптофангидроксилазы, дофаминовых D₂ и серотониновых 5-HT_{2A} рецепторов, отвергнутые нами в процессе обсуждения результатов в качестве майорного гена, как раз являются такими полигенами. Такой тип наследования, включающий один главный и несколько минорных генов, характерен для многих поведенческих признаков (Мазер, Джинкс, 1985).

ВЫВОДЫ.

1. Определен характер наследования щипковой каталепсии, высокая предрасположенность к этому признаку у мышей инбредной линии СВА кодируется одним майорным геном и рядом не сцепленных с ним полигенов, причем вклад главного гена составляет 18%, а полигенов – 32%.

2. При помощи QTL анализа с использованием микросателлитных маркеров майорный ген щипковой каталепсии у мышей локализован в интервале между 58 и 75 сМ хромосомы 13.

3. Отмечено быстрое увеличение доли каталептиков ответ на селекцию по каталепсии, что подтверждает результаты QTL анализа о наличии одного главного гена каталепсии.

4. Селекция на каталепсию привела к закреплению в потомстве аллеля микросателлитного маркера D13Mit76, полученного от родительской линии СВА.

5. Показано отсутствие сцепления признака щипковой каталепсии мышей с микросателлитными маркерами, локализованными вблизи генов, кодирующих дофаминовые D₂ рецепторы, триптофангидроксилазу и серотониновые 5-HT_{2A} рецепторы, что позволяет не рассматривать каждый из данных генов в качестве майорного гена высокой склонности мышей к каталепсии.

6. Наиболее вероятным геном-кандидатом на роль майор-гена каталепсии является ген, кодирующий 5-HT_{1A} рецептор нейромедиатора серотонина, расположенного в положении 58 сМ на хромосоме 13 мыши на расстоянии 3 сМ от микросателлитного маркера D13Mit76.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Куликов А.В., Базовкина Д.В. Проверка гипотез о сцеплении в гибридологическом анализе альтернативных поведенческих признаков с неполной пенетрантностью // Генетика 2003 Т 39 № 8 С 1066-1072.
2. Куликов А.В., Базовкина Д.В., Муазан М.П., Мормэд П. Картирование гена предрасположенности к катаlepsии у мышей с помощью полиморфных микросателлитных маркеров // Докл РАН 2003 Т.293 №1 С.134-137.
3. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. Селекция на предрасположенность к катаlepsии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей // Генетика 2005 Т 41 №9 С 1222-1228
4. Базовкина Д.В. Сцепление наследственной предрасположенности к катаlepsии с теломерным участком хромосомы 13 мыши // Материалы XXXIX международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, 2001 «Биология» С 42-43
5. Базовкина Д.В. Проверка гипотезы о сцеплении локуса предрасположенности к катаlepsии у мышей с генами 5-HT_{1A}, D₂ рецепторов и триптофангидроксилазы. // Материалы XL международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, 2002 «Биология» С 37
6. Кондаурова Е.М., Базовкина Д.В. Изменения поведения мышей в ходе селекции на катаlepsическую реакцию // Материалы XLII международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, 2004 «Биология» С 51-52
7. Кондаурова Е.М., Базовкина Д.В. Изменения поведения в ходе селекции мышей на катаlepsию // Седьмая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей "Человек и его здоровье". изд СПбГЭТУ "ЛЭТИ" г Санкт-Петербург, 2004 С 126
8. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. Селекция на предрасположенность к катаlepsии усиливает депрессивноподобное поведение у мышей // Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда. Бюлл Сиб Мед., 2005. т 4 (приложение 1) С 103
9. Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. Selective breeding for catalepsy in mice effects on the allele concentration of microsatellite D13Mit76 linked to the 5-HT_{1A} receptor gene. // International Summer School in Behavioral Neurogenetics, Moscow, 2005. P.54

Подписано к печати 06 12 2005
Формат бумаги 60 x 90 1/16 Печ л. 1. Уч изд л 0,7
Тираж 100 экз. Заказ 174.

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

2006A
248

12 - - 248